

## OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA RAPD EN LA RAZA VACUNA BLANCA CACEREÑA

### OPTIMIZATION OF RAPD TECHNIQUE IN BLANCA CACEREÑA BOVINE BREED

Parejo, J.C., M.E. Sansinforiano, A. Rabasco, M. Martínez-Trancón,  
J.L. Fernández-García y J.A. Padilla\*

Genética y Mejora Animal. Facultad de Veterinaria. Departamento de Zootecnia. Universidad de Extremadura. Avda. Universidad s/n. 10071. Cáceres. España.

#### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Optimización. RAPD-PCR vacuno.

#### ADDITIONAL KEYWORDS

Optimization. RAPD-PCR cattle.

#### RESUMEN

Se determinan las condiciones bajo las cuales los resultados RAPD para ADN genómico de la raza vacuna Blanca Cacerena son fiables y reproducibles. Tales condiciones servirán como punto de partida para próximos estudios poblacionales.

#### SUMMARY

In this work, we have found the optimal RAPD values to analyze genomic DNA Blanca Cacerena cattle breed, which produce valid and reliable results. It will be used as starting point in future population studies.

#### INTRODUCCIÓN

La técnica RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA* (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990), utiliza la PCR con un cebador de secuencia corta

y arbitraria, amplificando patrones de bandas característicos para cada combinación de cebador y ADN molde. Frecuentemente se han detectado polimorfismos entre patrones de individuos, poblaciones o especies diferentes (Bailey y Lear, 1994; Gwakisa, Kemp y Teale, 1994 y Kantanen *et al.*, 1995), útiles como marcadores genéticos que se transmiten de forma Mendeliana (Williams *et al.*, 1990).

Esta técnica está indicada para estudios que requieran gran capacidad de procesamiento (Bailey y Lear, 1994), y el hecho de que pueda aplicarse a mezclas de ADN representativas de poblaciones, aumenta su rapidez para identificar marcadores poblacionales (Kemp y Teale, 1992).

Sin embargo, uno de los principales problemas de la técnica radica en la relativa complejidad de los patrones de bandas resultantes y en su alta dependen-

\*Petición de separatas y correspondencia

cia de las condiciones de la reacción, pudiendo producirse artefactos que deriven en una sobreestimación de la variabilidad genética (Ellsworth, Rittenhouse y Honeycutt, 1993). De estas limitaciones se deduce la necesidad de someter esta técnica a un proceso de puesta a punto, en el que se definan las condiciones bajo las cuales los patrones obtenidos sean fiables y reproducibles.

En este trabajo, se han determinado las condiciones óptimas para el análisis RAPD en la raza vacuna Blanca Cacerña, raza en peligro de extinción, como trabajo preliminar para la determinación de variabilidad genética en los escasos efectivos que quedan de la raza. Paralelamente se han utilizado otras tres razas presentes en la región (Charolesa, Avileña y Retinta) para comparar y corroborar los resultados obtenidos en la Blanca Cacerña.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La extracción del ADN se realizó a partir de 10 ml de sangre completa de 3 machos y 7 hembras de cada raza siguiendo la metodología descrita por Sambrook *et al.* (1989). Se obtuvieron

ADN *pool* raciales mezclando iguales cantidades de ADN de cada individuo.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador *UNO-Thermoblok* (Biometra) en reacciones de 100  $\mu$ l, utilizando: tampón de reacción y ADN-Polimerasa ("Primezyme", Biometra), desoxirribonucleótidos trifosfato (Pharmacia), solución 10 mM de  $MgCl_2$ , y dos cebadores: CCBC 002 (5'-GCCGTCCGAG-3') y CCBC 003 (5'-CAGCCTCGGC-3') (Pharmacia). Cada reacción se realizó por duplicado y se repitió en experimentos independientes. En las **tablas I y II** se recogen los valores probados de los componentes de la reacción y de las condiciones de amplificación, respectivamente.

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago pBR328 cortado con BglII y HinfI (Boehringer Mannheim).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN:

Al igual que los resultados obtenidos

**Tabla I.** Rango de valores ensayados para los componentes de la reacción RAPD. Los valores indicados con asterisco corresponden a los valores óptimos obtenidos. (Values tested for the components in the RAPD reaction. The asterisks show the optimal values obtained).

Componentes	Valores iniciales	Rango de valores probados						Unidades
ADN-Pol.	2,5	0,5	1	1,5*	2	2,5		Uds
ADN	200	50	100	200*	300	400		ng
$MgCl_2$	1,5	1,5	2,5	3,5*	4,5	5,5	6,5	mM
Cebador	2	1	1,5	2*	2,5	3		$\mu$ M
dNTPs	200	100	150	200*	250	300		$\mu$ M (c/u)

## OPTIMIZACIÓN DE RAPD EN VAGUNO

**Tabla II.** Valores modificados de temperatura, tiempo y número de ciclos en las condiciones de amplificación de la reacción RAPD. Los valores indicados con asterisco corresponden a los valores óptimos obtenidos. (Modified values of temperature, time, and number of cycles in the RAPD reaction. The asterisks show the optimal values obtained).

Fases modificadas						Ciclos
Desnaturalización inicial		Hibridación		Extensión		Número de ciclos
Temperatura °C	Tiempo	Temperatura °C	Tiempo	Temperatura °C	Tiempo	
94*	10'	35	2'	72*	2'	25
	3''		2'		1'45"	30
	0'		1'45''*		1'30''*	35
		40*	1'30"	72*	1'15"	40*
			1'15"		1'	45
			1'		45	45
			45		2'	45"
		50	2'			

por Innis y Gelfand (1990), las ampliificaciones realizadas con diferentes cantidades de ADN polimerasa pusieron de manifiesto que 1 unidad es insuficiente para una correcta amplificación, fijando en 1,5 unidades la cantidad mínima necesaria de enzima.

Utilizando diferentes concentraciones de Mg<sup>2+</sup> en la reacción, observamos que una concentración de 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub> mejoró notablemente el rendimiento de la reacción. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Innis y Gelfand, 1990; Kocher y Wilson, 1991; Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989), indicando que tanto un exceso como un defecto en la concentración de estos iones causan graves problemas a la reacción, pudiendo llegar a inhibirla casi por completo, al contrario de lo descrito por Ellsworth *et al.* (1993) quienes indican que, a partir de un determinado umbral,

el resultado es independiente de la concentración de iones Mg<sup>2+</sup>.

La cantidad de ADN en la mezcla de reacción debe estar relacionada con la concentración de secuencias cebadoras presentes en la misma; cambios en el índice cebador-ADN molde alteran en conjunto la eficiencia de la reacción, originando cambios en el patrón de bandas amplificado (Ellsworth, Rittenhouse y Honeycutt, 1993). El patrón más resolutivo fue obtenido utilizando 2 µM de cebador para 200 ng de ADN molde.

Los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) afectan a la disponibilidad de Mg<sup>2+</sup> libre en la mezcla de reacción (Blanchard *et al.*, 1993). Las pruebas realizadas para la optimización de la concentración de dNTPs, han mostrado que los resultados no varían en un amplio rango de concentraciones, aunque se observaron mayores cantidades de produc-

tos con concentraciones de 200-250  $\mu$ M.

#### CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN:

Las condiciones de amplificación iniciales fueron 10' a 94°C, 40 ciclos de 1' a 94°C, 2' a 35°C y 2' a 72°C, y una extensión final de 10' a 72°C, de forma que ninguna fase fuera limitante.

La eliminación de la primera fase de desnaturalización no causó ningún efecto en los patrones obtenidos, si bien disminuyó la repetibilidad de los resultados. La causa más común de fallos en las reacciones es la desnaturalización incompleta del ADN molde y/o del producto amplificado (Innis y Gelfand, 1990) por lo que decidimos someter a las muestras a una desnaturalización previa de 3' a 94°C, según los resultados obtenidos por Saiki (1990). Bajo estas condiciones se mantuvo la reproducibilidad entre experimentos.

Para una correcta amplificación es necesario optimizar tanto la temperatura como el tiempo de hibridación de los cebadores. La temperatura óptima de hibridación depende del tamaño y contenido en G+C de los cebadores. En nuestro caso, temperaturas de hibridación superiores a 40°C produjeron cambios significativos en los patrones de bandas obtenidos, por lo que fijamos en 40°C la temperatura óptima de hibridación para los dos cebadores utilizados.

Por otra parte, hemos encontrado diferencias en el tiempo mínimo de hibridación en función del ADN molde utilizado, siendo suficiente con 1' para la raza Blanca Cacereña pero necesitando al menos 1'30" para la raza Charolesa; los patrones de amplificación se mantuvieron constantes entre 1'30" y 2' de hibridación. Debido a que el inicio de la extensión ocurre en el mismo momento de la

hibridación (Innis, *et al.*, 1988) aplicar un tiempo de hibridación mayor al estrictamente necesario nos proporciona la seguridad de tener híbridos suficientemente largos y estables, que no se desnaturalicen al subir rápidamente la temperatura a la óptima de extensión de la ADN polimerasa. Por esto, hemos considerado 1'45" como tiempo óptimo de hibridación. No obstante, los parámetros de hibridación habrán de ser revisados siempre que cambie la longitud o composición (% G+C) de los cebadores utilizados.

La fase de extensión se realizó a 72°C, por ser la temperatura óptima para la ADN-polimerasa (Innis y Gelfand, 1990). Nuestros resultados indican que tiempos de 1' son insuficientes para la amplificación de fragmentos mayores de 1 kb, estableciendo el tiempo mínimo necesario 1'15". Este tiempo depende también de la cantidad de enzima presente en la mezcla de reacción, y en este sentido Yu y Pauls (1992) encontraron que en 30" se amplificaban fragmentos de hasta 1,5 Kb, pero con cantidades de ADN polimerasa 5 veces superiores a las utilizadas por nosotros. Teniendo en cuenta la gran cantidad de fragmentos de ADN generados por RAPD en cada ciclo, y procurando mantener un margen de tiempo adecuado para la extensión, hemos considerado que 1'30" es el tiempo óptimo de extensión.

La última prueba realizada fue determinar el número mínimo de ciclos necesarios para la correcta amplificación de los patrones RAPD, observando que se necesitan un mínimo de 40 ciclos para obtener niveles óptimos de amplificación, y que un mayor número de ciclos no mejora el patrón obtenido.

En general, a lo largo del proceso de

## OPTIMIZACIÓN DE RAPD EN VACUNO

optimización, se han observado cambios en los perfiles de amplificación tales como presencia-ausencia de bandas y variación en la intensidad de las mismas, lo que corrobora la necesidad de una previa optimización y estandarización de la técnica.

En este trabajo, hemos definido las condiciones óptimas para las reacciones RAPD y delimitado unos márgenes dentro de los cuales los resultados son válidos y reproducibles. Estas condiciones

así definidas servirán como punto de partida para la aplicación del análisis RAPD a próximos estudios poblacionales en Blanca Cacerña.

### AGRADECIMIENTOS

Trabajo subvencionado por la Consejería de Educación y Juventud de la Junta de Extremadura y el Fondo Social Europeo (Proyecto n° EIB94-07).

### BIBLIOGRAFÍA

- Bailey, E. and T.L. Lear. 1994. Comparison of Thoroughbred and Arabian horses using RAPD markers. *Anim. Genet.*, 25: 105-108.
- Blanchard, M.M., P. Taillon-Miller, P. Nowotny, and V. Nowotny. 1993. PCR buffer optimization with uniform temperature regimen to facilitate automation. *PCR Meth. Appl.*, 2: 234-240.
- Ellsworth D.L., K.D. Rittenhouse and RL. Honeycutt. 1993. Artefactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques*, 14: 214-217.
- Gwakisa, P.S., S.J. Kemp and A.J. Teale. 1994. Characterization of Zebu cattle breeds in tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Anim. Genet.*, 25: 89-94.
- Innis, M.A., K.B. Myambo, D.H. Gelfand and M.A.D. Brow. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of PCR-amplified DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*. 85: 9436-9440.
- Innis, M.A. and D.H. Gelfand. 1990. Optimization of PCRs. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (Eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. pp:3-12. Academic Press, Inc. San Diego.
- Kantanen, J., J. Vilkki, K. Elo and A. Maki-Tanila. 1995. Random amplified polymorphic DNA in cattle and sheep: application for detecting genetic variation. *Anim. Genet.*, 26: 315-320.
- Kemp, S.J. and A.J. Teale. 1992. Random amplified DNA polymorphisms (RADPs) and pooled DNA in bovine genetic studies. Proc. 23rd Conf. Inter. Soc. Anim. Genet. Interlaken, Switzerland. 3-7 August. *Anim. Genet.*, 23 (Suppl. 1): 62. Abstract.
- Kocher T.D. and A.C. Wilson. 1991. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In: T.A. Brown (Ed.) Essential Molecular Biology. A Practical Approach. pp: 185-207. Oxford Univ. Press. New York.
- Saiki, R.K. 1990. Amplification of genomic DNA. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds.) PCR protocols: A guide to methods and applications. pp: 13-20. Academic Press, Inc. San Diego.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2ª Ed.

PAREJO ET AL.

- Cold Spring Harbor Lab. Press. New York.
- Welsh, J., and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 7213-7218.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535.
- Yu, K.F. and K.P. Pauls. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis *Nucleic Acids Res.*, 20: 2606.

*Recibido: 16-12-96. Aceptado: 18-9-97.*

*Archivos de zootecnia vol. 46, núm. 175, p. 284.*