



XXIII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CA-030 (ID: 890)

Autor: Sosa, Fabiana Evangelina

Título: Optimización de condiciones de amplificación y restricción para la identificación de dos polimorfismos asociados a terneza en Bovinos

Director:

Palabras clave: Calpaina, Terneza, Biología Molecular, ADN

Área de Beca: Cs. Agropecuarias

Tipo Beca: Cyt - Pregrado

Periodo: 01/03/2017 al 01/03/2018

Lugar de trabajo: Facultad De Cs. Veterinarias

Proyecto: (13CB02) Estudios bioquímico-moleculares aplicables a la producción y sanidad de carnes.

Resumen:

La calidad de la carne constituye un importante factor de interés económico. El color, el porcentaje de grasa intramuscular, el área de ojo de bife y la palatabilidad son los principales atributos que determinan la calidad de las carnes bovinas. La palatabilidad es una característica compuesta por la combinación de tres factores: sabor, jugosidad y terneza. La terneza de la carne es uno de los factores más importantes que determinan la satisfacción del consumidor. La degradación de proteínas musculares (uno de los procesos que determina el valor final de la terneza) es producida por al menos tres sistemas de enzimas y sus cofactores. Estos son: las catepsinas lisosomales, el sistema de la ubiquitina proteosomal y las enzimas activadas por calcio (calpaínas/calpastatina), siendo este sistema el que tendría un rol principal en el proceso de tiernización. Poco o nada se avanzó en la selección de toros padres por terneza usando el método tradicional (Warner-Bratzler), pues requiere medirla al momento de la faena. Consecuentemente, no ha resultado una herramienta útil o práctica para el mejoramiento del ganado. La información molecular permitirá realizar la selección genotípica prescindiendo de información fenotípica del animal evaluado. Se han identificado diversas mutaciones puntuales –SNPs- (POLIMORFISMO DE NUCLEOTIDO SIMPLE) en los genes de la Calpastatina (CAST) y de la Calpaína (CAPN), que están asociadas a variaciones de la terneza en las subespecies Bos taurus y Bos indicus. Entre ellos se encuentran, en el cromosoma 29, sobre el gen de la Calpaína, los marcadores CAPN316, y CAPN4751. Los marcadores genéticos son utilizados para identificar regiones específicas dentro de los cromosomas, donde están localizados los genes responsables de los rasgos cuantitativos involucrados en la expresión de caracteres económicamente importantes en las especies domésticas; estas regiones son conocidas como locis de rasgos cuantitativos (QTLs). El uso de información de estas regiones en programas de selección de ganado es utilizado en la selección asistida por marcadores genéticos. Acceder a una metodología de Selección Asistida por Marcadores Moleculares (SAM) proveería una nueva herramienta de selección objetiva para el mejoramiento genético de la terneza en los rodeos bovinos de carne. Con el objeto de evaluar marcadores en el GEN que codifica la subunidad mayor de la enzima u- calpaina y con el fin de poder contribuir con una herramienta de gran valor para la selección asistida por marcadores moleculares en reproductores bovinos, se puso en marcha en el SVBM de la facultad de Ciencias Veterinarias la optimización de la técnica de PCR-RFLP para la amplificación e identificación de los SNPs CAPN316 (sustitución C/G en el exón 9) y CAPN4751 (sustitución C/T en el intrón 17). En primer lugar, se extrajo ADN bovino a partir de muestras de sangre anticoagulada con EDTA de 3 reproductores machos conservándose a -20°C hasta su utilización. La amplificación por PCR de un segmento del gen se realizó teniendo en cuenta para ambos marcadores un volumen final de 25μl, contenido: 1X de Buffer de PCR, 1,5 mM MgCl2; 0,25 mM de cada oligonucleótido cebador; 0,2mM de una mezcla equimolecular de dNTP y 1U de Taq ADN polimerasa. Las mezclas se sometieron a las siguientes condiciones de amplificación: desnaturación inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturación a 95°C durante 45 seg, pegado de cebadores a 62,5°C para CAPN316 Y 74°C para CAPN4751 durante 45 seg, extensión a 72°C durante 45 seg y extensión final a 72°C durante 5 min, finalizando con incubación a 4°. Los resultados fueron analizados sometiendo los productos a electroforesis en geles de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV. En el caso de CAPN316, se amplificó un fragmento de 709pb sometido posteriormente a digestión con la enzima BtgI. Para CAPN4751 se amplificó un fragmento de 215pb siendo también sometido a digestión con la enzima Bse DI utilizando los primeros descriptos por Corva et al., 2007. Para finalizar, se realizó la RFLP usando 10μl de los productos de amplificación obtenidos anteriormente para la digestión con las enzimas de restricción, en un volumen final de 20μl, contenido las siguientes concentraciones finales de reactivos, para CAPN316: 1X de buffer de restricción, 1X de BSA y 5U de la enzima BtgI; y para CAPN4751: 1X de buffer de restricción y 20U de la enzima Bse DI. La incubación se realizó a 37°C durante 2 hs y 55°C por 4 hs respectivamente. Como resultado de la digestión enzimática, el tamaño de los fragmentos obtenidos luego de la electroforesis en geles de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV fueron para CAPN316: C/C (homocigota favorable) 371pb, 251pb y 87pb; C/G (heterocigota) 371pb, 251pb, 87pb y 622pb; y G/G (homocigota desfavorable) 622pb y 87pb. Para CAPN4751: C/C 126pb y 89pb; C/T 215pb, 126pb y 89pb; y T/T 215pb.