

AMPLIFICACIÓN DEL GEN SRY PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SEXO EN MUESTRAS DE ADN DE ALPACAS

SRY GENE AMPLIFICATION FOR SEX IDENTIFICATION USING DNA SAMPLES FROM ALPACAS

Arias, ND¹ ; Hung, A ; Huanca, W²

RESUMEN

Se desarrolló un método para el sexaje de Alpacas a través de la amplificación del gen SRY. Se diseñaron oligonucleótidos primers a partir de la secuencia SRY del Guanaco. En la electroforesis en gel de agarosa, una Alpaca macho normal mostró 1 banda SRY, y una Alpaca hembra normal no mostró banda SRY. Luego de la optimización, el procedimiento de PCR para el diagnóstico de sexo fue aplicado a muestras de sangre 10 alpacas. Los sexos diagnosticados mediante el PCR correspondieron con los sexos anatómicos en todos los casos. Así, este estudio demuestra que el presente método se puede aplicar al sexaje de muestras de ADN de Alpaca mediante la amplificación PCR del gen SRY.

ABSTRACT

A method for Alpaca sexing has been developed through amplification of the SRY gene. Oligonucleotide primers were designed according to the SRY sequence from Guanaco. In agarose gel electrophoresis, a normal male alpaca showed a SRY band, and a normal female alpaca showed no SRY band. After optimization, the PCR procedure for sex diagnosis was applied to 10 alpaca blood samples. Sex diagnosed by PCR corresponded with anatomical sex in all cases. Thus, this study demonstrates that the present method can be applied to the DNA samples sexing from Alpacas by PCR amplification SRY gene.

INTRODUCCIÓN

El logro de crías hembras es deseable especialmente cuando el criador busca incrementar la población animal de su hato. Actualmente se han desarrollado tecnologías para diagnosticar y controlar el sexo de las crías nacidas, una de estas tecnologías es el uso de semen sexado y la transferencia de embriones sexados. (Seidel, 2003).

Se han desarrollado métodos para la identificación del sexo amplificando segmentos genómicos ubicados en los cromosomas sexuales del animal usando la metodología del PCR. Así, la región SRY (Sex-determining Region Y chromosome) presente únicamente en el cromosoma Y, fue utilizada para el sexaje de muestras de ADN de llamas (Pomp *et al.*, 1995) (Drew *et al.*, 1999).

Debido a la insuficiente información existente sobre métodos para el diagnóstico del sexo de alpacas, vicuñas y guanacos, empleando ADN (que se puede aislar de sangre, semen, embriones pre-implantacionales u otro tipo de tejido), el presente estudio tuvo por objetivo desarrollar una técnica molecular basada en el PCR, para el sexaje de Alpacas.

¹ Laboratorio de Patología Clínica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria y Zootecnia. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú. E-mail: ninodante@gmail.com

² Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de ADN genómico

Se utilizó un grupo de 10 Alpacas Huacaya de un mes de edad (5 machos y 5 hembras) para la obtención de muestras de sangre. Se procesó individualmente cada muestra siguiendo las instrucciones del manual técnico TM050 (Promega Corporation, 2005) utilizando el kit de purificación de ADN genómico Wizard®.

Diseño de primers

Se utilizó herramientas bioinformáticas disponibles en internet para diseñar un par de primers capaces de amplificar el gen SRY de Alpaca. Ingresando a PubMed Nucleotide (<http://www.pubmed.gov>) encontrándose una secuencia parcial de 173 pares base del gen SRY del Guanaco (GenBank accession U66068), la secuencia se ingresó al Servidor Bioinformático de la Universidad de Bielefeld de Alemania (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/>) usando la herramienta GeneFisher (Giegerich *et al.*, 1996).

Protocolo PCR

Se utilizaron tubos para PCR de 0.2 ml y se trabajó en un volumen de 100 µl para cada reacción PCR. Este consistió en: 10 µl de PCR buffer [10X/µl], 10 µl de MgCl₂ [25 mM/µl], 2 µl de dNTPs mix [10 mM/µl], 2 µl de primer forward [50 pM/µl], 2 µl de primer reverse [50 pM/µl], 65.2 µl de agua PCR miliQ , 0.8 µl de Taq DNA polimerasa [5 U/µl] y 8 µl de ADN genómico de cada animal. Los tubos PCR se colocaron en un ciclador térmico PTC-100 Engine™ (MJ Research Inc., USA) y las muestras fueron sometidas a 94 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 58 °C por 45 segundos y 72 °C por 1 minuto. Finalmente una extensión a 72 °C por 10 minutos.

Los productos PCR (amplicones) fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y teñida con bromuro de etidio, y visualizada bajo luz ultravioleta. Se fotografió los geles usando el sistema UVP de trasluminador ultravioleta y cámara fotográfica digital (Bio Doc-it and Visi Doc-it Systems Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge UK).

Secuenciamiento

Se purificó el producto amplificado por el PCR del gen SRY de una Alpaca macho para conocer su tamaño y secuencia de nucleótidos. Esta fue procesada en un secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Se procesó la información lograda utilizando la herramienta bioinformática Clustal W del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo los parámetros que presentó por defecto GeneFisher, se logró la secuencia de oligonucleótidos primer: 5'-3 CAT TGT ATG GGC TCG TGA (forward) y TTC GAG GAG GCA CAG AG (reverse), para amplificar un producto comprendido entre las bases 23 al 150 de la secuencia U66068.

```
> 1 gtcaagcgcc ccatgaatgc tttcattgta tgggctcgtg atcaaaggcg aaaggtggct
  61 ctagagaatc ccaaaatgca gaactcagag atcagcaagc ggctgggata ccagtggaaa
 121 ttgcttacag aagctgaaaa gcggccgttc ttcgaggagg cacagagact acg
```

FIGURA 1 – Secuencia de nucleótidos gen SRY de Guanaco (GenBank U66068). Las secuencias homólogas a los primers logrados aparecen subrayados.

Se evaluó la repetibilidad de la amplificación del gen SRY usando 10 muestras de ADN pertenecientes a 10 alpacas de sexo fenotípico conocido. Se observa en la figura 2 una banda exclusiva de las muestras correspondientes a alpacas machos. Todas las determinaciones de sexo usando PCR fueron semejantes al sexo fenotípico de las alpacas muestreadas.

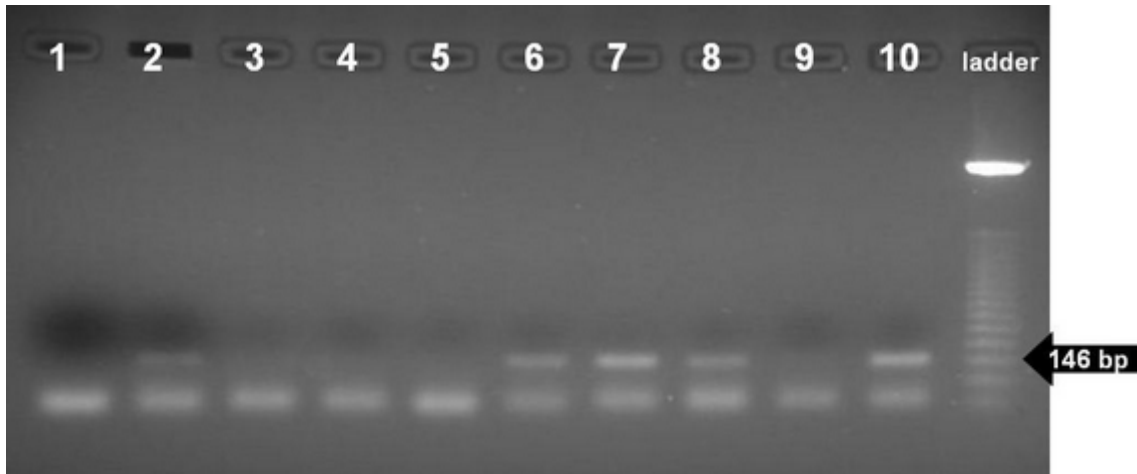


FIGURA 2 – PCR del gen SRY en ADN de Alpacas hembras y machos.

2, 6, 7, 8 y 10: Alpacas macho (XY) SRY+. 1, 3, 4, 5 y 9 Alpacas hembra (XX) SRY-.

El secuenciamiento del producto PCR del gen SRY de Alpaca, identificó una secuencia de 146 pares bases con 100% de homología con la secuencia parcial del gen SRY de Guanaco (U660668). Posteriormente se inscribió la nueva secuencia en el GenBank con el ingreso DQ862123 y la definición “Lama pacos sex-determining region Y gene, partial cds”.

En base al sexaje de llamas a partir de ADN realizadas mediante la amplificación del gen SRY (Pomp *et al.*, 1995) (Drew *et al.*, 1999) se adaptó esta técnica PCR para su uso en alpacas (*Lama pacos*).

El uso de herramientas bioinformáticas logradas principalmente gracias al Proyecto Genoma Humano (Baxevanis, 2001), permitió encontrar mediante el servidor NCBI-National Center of Biotechnology Information de los Estados Unidos. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) una secuencia del gen SRY de Guanaco (NCBI Nucleotide U66068) y el reporte de su aplicación en el sexaje satisfactorio de ADN de Llama (NCBI PubMed 10530329) (Drew *et al.*, 1999). La misma información también puede obtenerse usando los servidores EMBL-European Molecular Biology Laboratory de Alemania (<http://www.embl-heidelberg.de/>) y DDBJ-DNA Data Base of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>).

El uso de la herramienta GeneFisher del Servidor Bioinformático de la Universidad de Bielefeld de Alemania (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/>) permitió el diseño interactivo de primers ingresando la secuencia U66068. También se utilizó la herramienta Clustal W del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) para el alineamiento de las secuencias logradas por el secuenciamiento. Estas herramientas y otras similares permiten el desarrollo acelerado de estudios genómicos (Meyers-Wallen, 2006).

Los resultados del presente estudio muestran la factibilidad de identificar el sexo de la Alpaca a partir de muestras de sangre y sugieren la hipótesis de la factibilidad de la identificación de sexo en muestras de semen o embriones pre-implantacionales. El logro de crías de Alpaca, con el sexo deseado, aprovechando las características productivas favorables de determinado sexo, contribuirá con valor agregado a las tecnologías de inseminación artificial y transplante de embriones en Alpacas.

CONCLUSIONES

Se desarrolló una técnica de PCR para identificar el sexo a partir de muestras de ADN genómico de Alpaca obtenidas de sangre, amplificando parcialmente al gen SRY de Alpaca (DQ862123).

La detección del gen SRY se presenta como una alternativa para el diagnóstico de sexo en muestras de ADN de Vicuña y Guanaco.

LITERATURA CITADA

Baxevanis, A. 2001. Bioinformatics and the internet. En: Bioinformatics, a practical guide to the analysis of genes and proteins. Cap. 1. Ed. John Wiley & Sons, Inc. 1-17

Drew, M., Meyers-Wallen, V., Acland, G., Guyer, C. y Steinheimer, D. 1999. Presumptive Sry-negative XX sex reversal in a Llama with multiple congenital anomalies. *J Am Vet Med Assoc.* Oct 15;215(8):1134-9.

Giegerich, R., Meyer, F. y Schleiermacher, C. 1996. GeneFisher - Software Support for the Detection of Postulated Genes. *Proceedings of the Fourth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology.* 4:68-77.

Meyers-Wallen, V. 2006. Genetics, genomics, and molecular biology of sex determination in small animals. *Theriogenology* 66: 1655–1658

Pomp, D., Good, B. A., Geisert, R. D., Corbin, C. J. y Conley, A. J. 1995. Sex Identification in Mammals with Polymerase Chain Reaction and Its Use to Examine Sex Effects on Diameter of Day 10 or 11 Pig Embryos. *J Anim Sci.* May;73(5):1408-15.

Promega Corporation. 2005. Isolating genomic DNA from whole blood. En: Wizard® genomic DNA purification kit. Technical Manual TM050. Madison, WI. USA. p 5-7.

Seidel, G. 2003. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 59:585-598.