

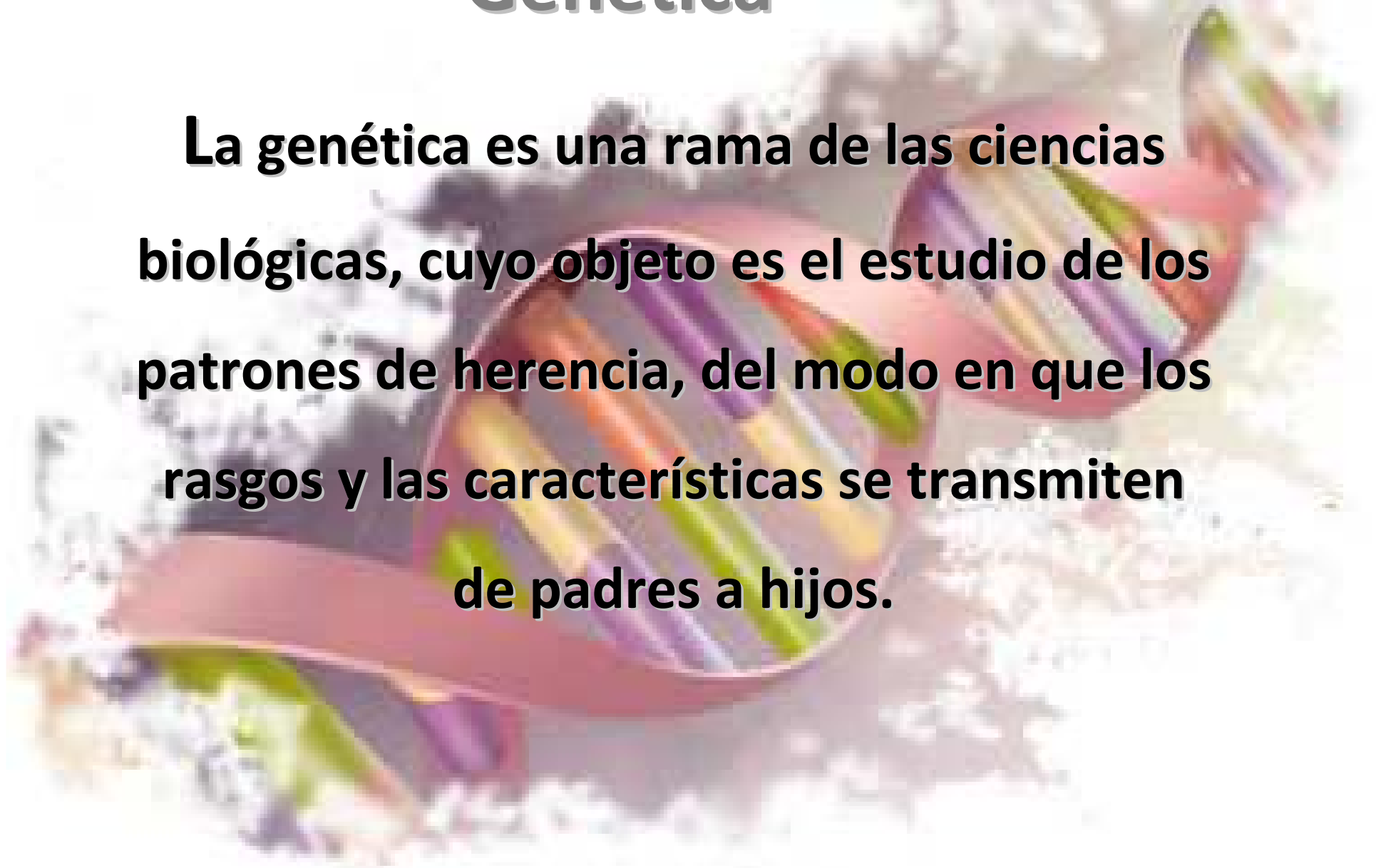


Genética

Mónica María Saldarriaga

Genética

La genética es una rama de las ciencias biológicas, cuyo objeto es el estudio de los patrones de herencia, del modo en que los rasgos y las características se transmiten de padres a hijos.



La genética nos enfrenta a un sin número de dilemas éticos

Alimentos transgénicos



Eugenesia

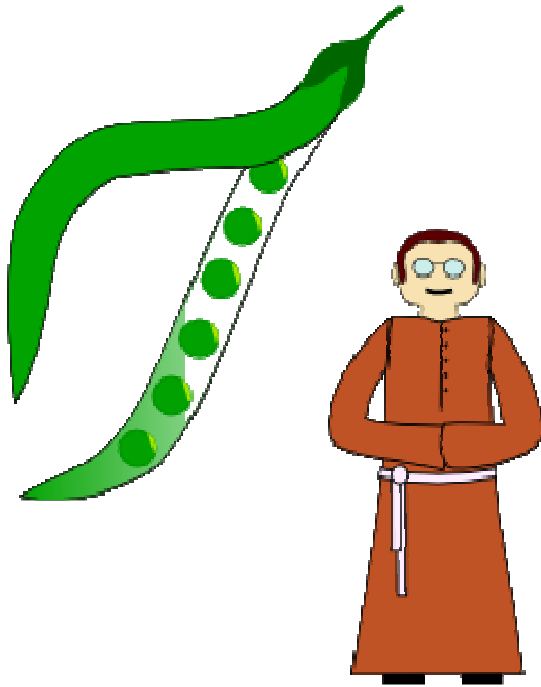


"el buen nacimiento"

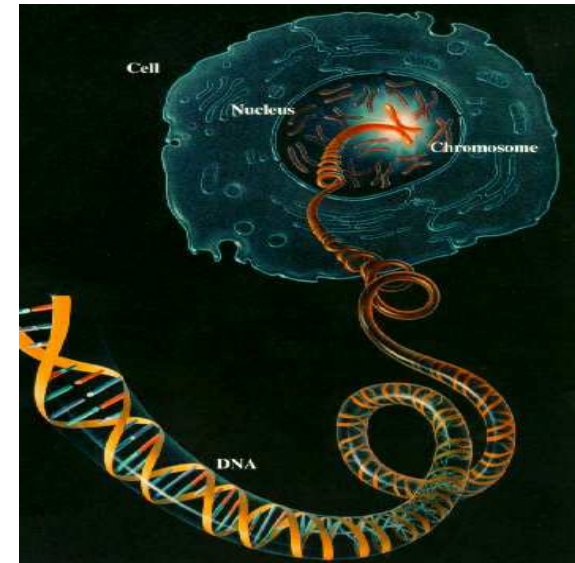


Pérdida de biodiversidad genética

Genética



Enfoque clásico



Enfoque molecular

Por qué estudiar genética?

La genética ocupa una posición central en la biología



ISSN: 0717-2664

REVISTA
CIENCIA Y TECNOLOGIA

Conicyt > Revista > Reportajes

Bovinos transgénicos productores de compuestos biológicos recombinantes "Animales que sanan"

En el mundo existen más de 50 productos biológicos obtenidos mediante tecnología recombinante que transforma bacterias o células haciéndolas capaces de producir proteínas. El proyecto Fondef que dirige Ricardo Felmer busca implementar en Chile este tipo de tecnología, generando bovinos transgénicos productores de sustancias medicinales.



Es muy importante definir y entender:

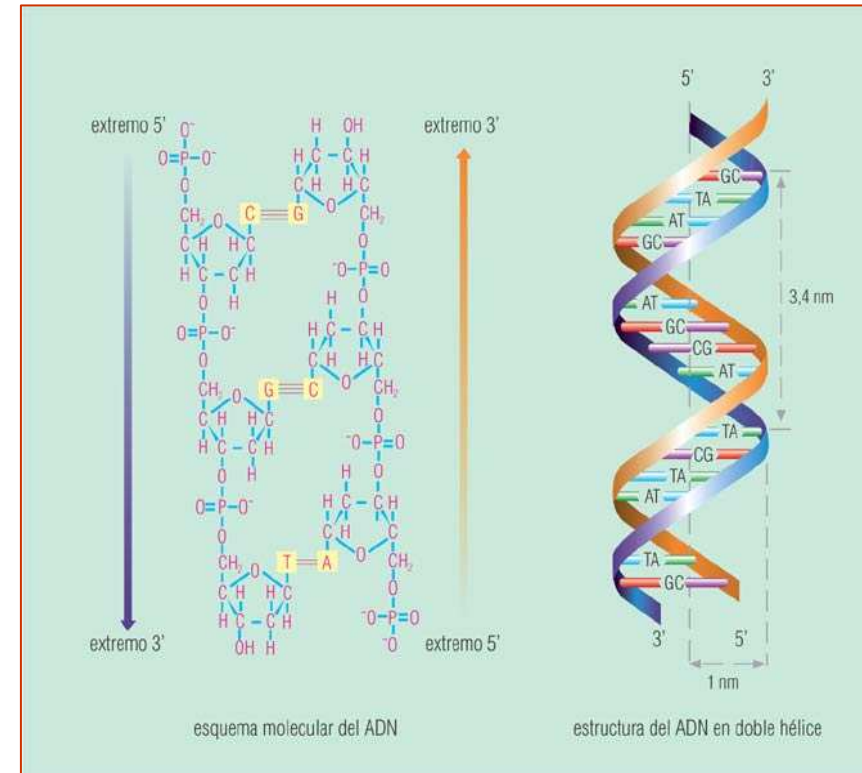
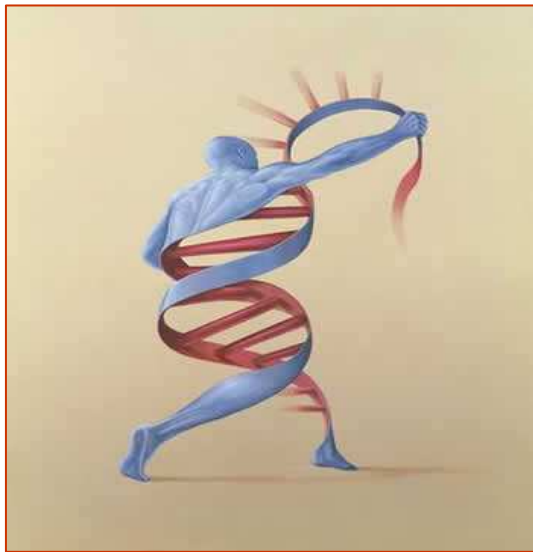
Fenotipo

Características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas o del comportamiento de un individuo o de un grupo de individuos que difieren uno del otro.



Genotipo

La constitución genética de un individuo u organismo, o de un grupo de organismos



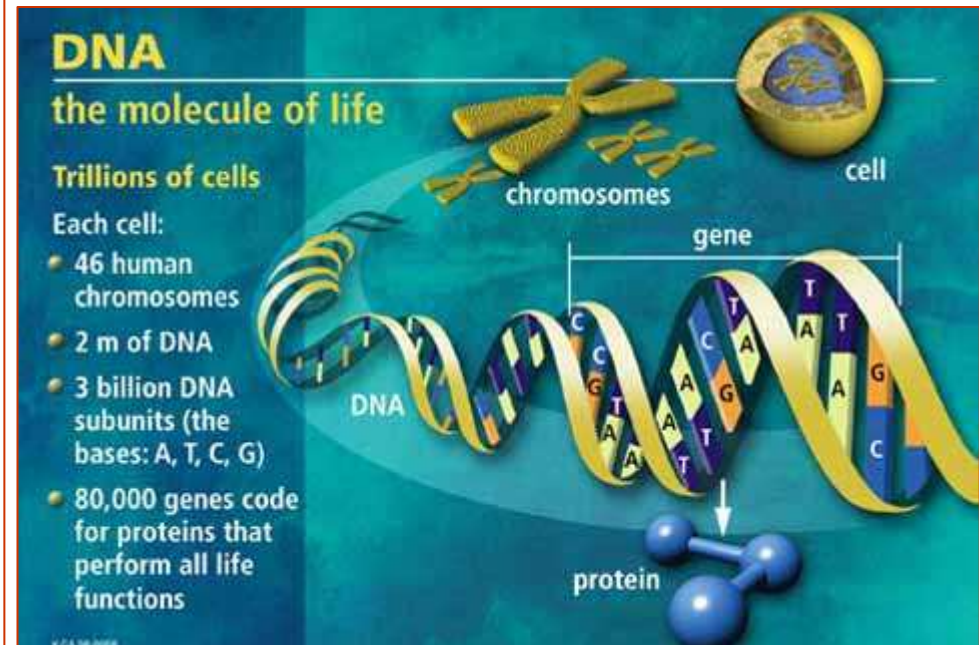
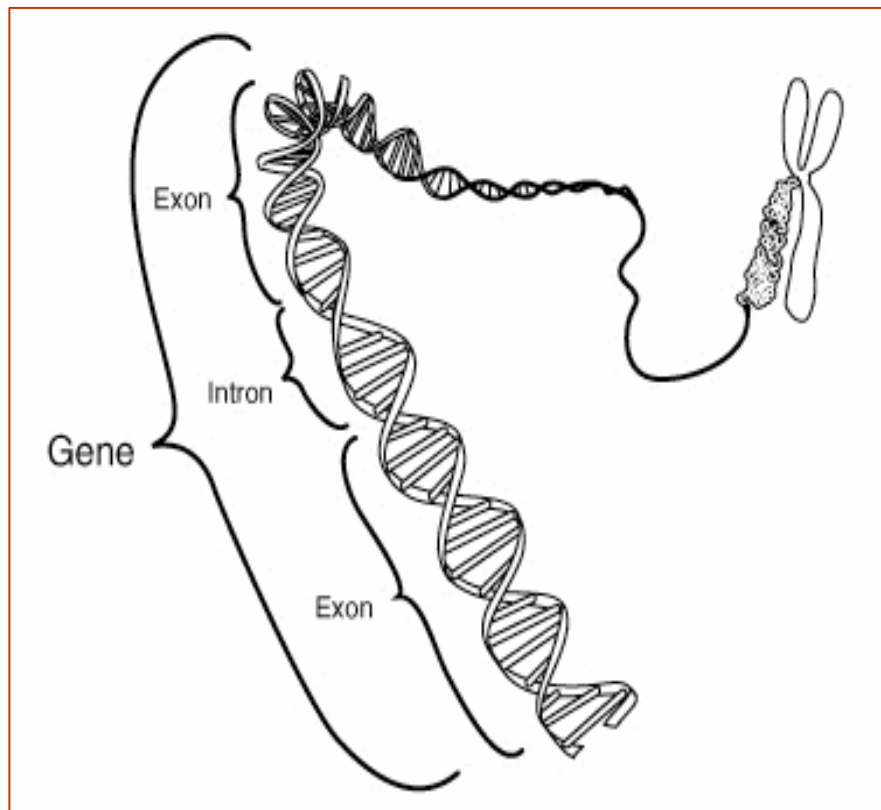
- Diferentes genotipos a menudo difieren en el fenotipo
- Un genotipo dado quizás expresa mas de un fenotipo

Diferentes genotipos pueden manifestar el mismo fenotipo



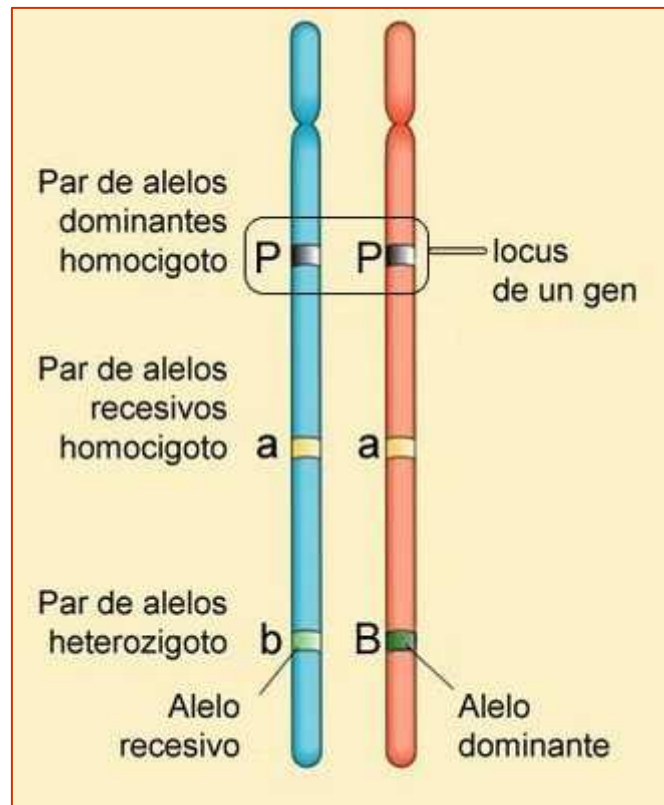
Gen

Secuencia de ácidos nucleicos (DNA o RNA en algunos virus) que codifica para un producto (RNA o polipeptido), que solo o en combinación con otros productos tiene una función distintiva dentro de un organismo.



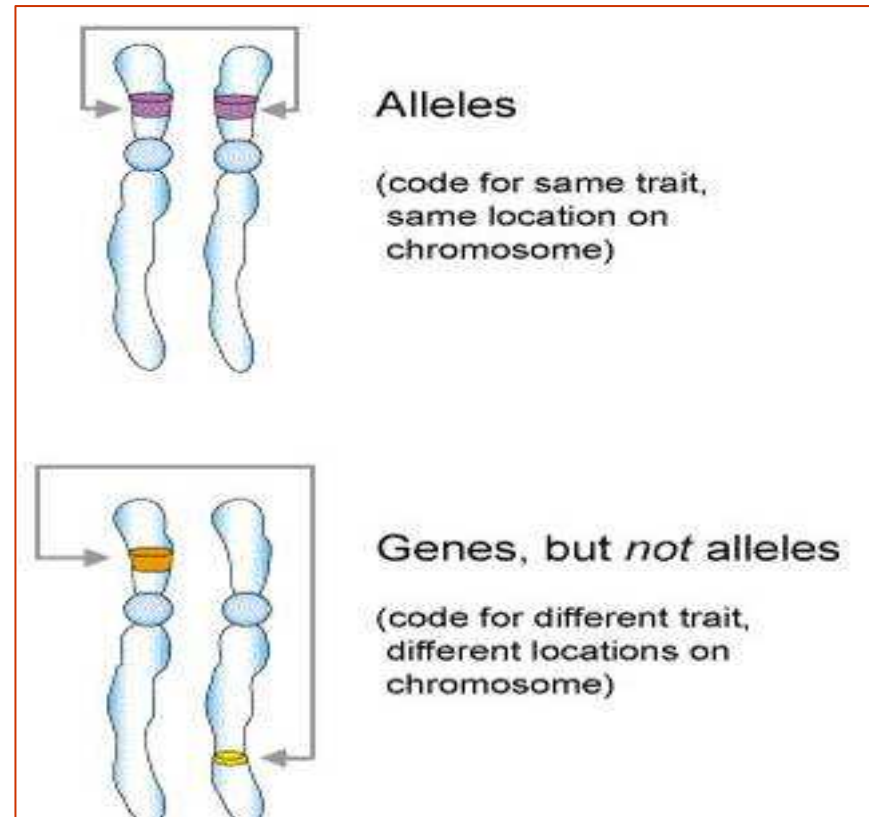
Locus

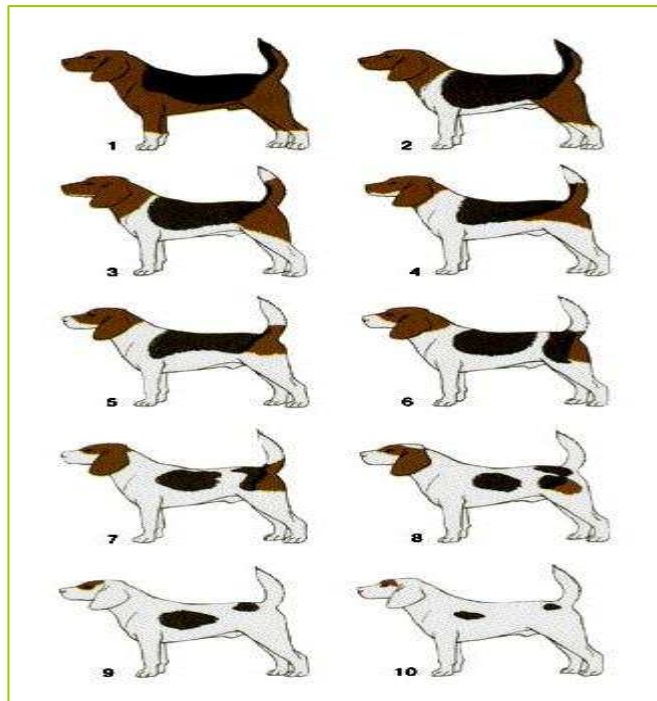
Un sitio sobre un cromosoma, mas específicamente el sitio que ocupa un gen en un cromosoma



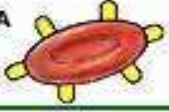
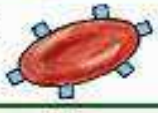
Alelo

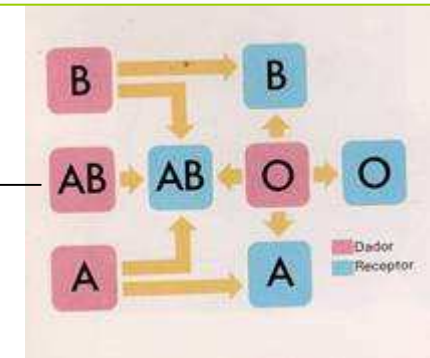
Constituye una variante de un gen





Muchos
fenotipos son
el producto de
un gen con
varios alelos

Fenotipo	Genotipo (Alelos presente)	Polisacáridos de la superficie de los glóbulos rojos	Anticuerpos en el plasma sanguíneo	Reacción con anticuerpos	
				Anticuerpos A	Anticuerpos B
0	ii	— 	 Anticuerpos A  Anticuerpos B	No	No
A	I ^A I ^A , I ^A i	A 	 Anticuerpos B	Sí	No
B	I ^B I ^B , I ^B i	B 	 Anticuerpos A	No	Sí
AB	I ^A I ^B	A, B 	—	Sí	Sí



Los grupos
sanguíneos son
el producto de
un gen con
varios alelos

Mutación

Una alteración del material genético, usualmente de una secuencia de DNA que da origen a nuevos alelos o haplotipos

GEN A

AGCATCCAAGGT
TCGTAGGTTCCA

MUTACIÓN 1

AGCAT**T**CAAGGT
TCGT**A**AGTTCCA

ALELO A'

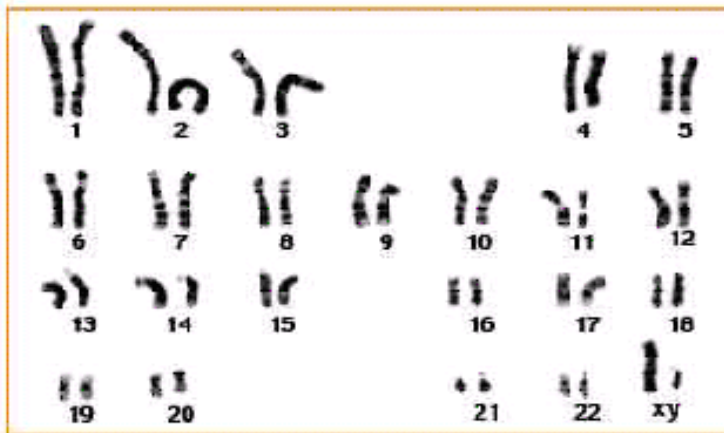
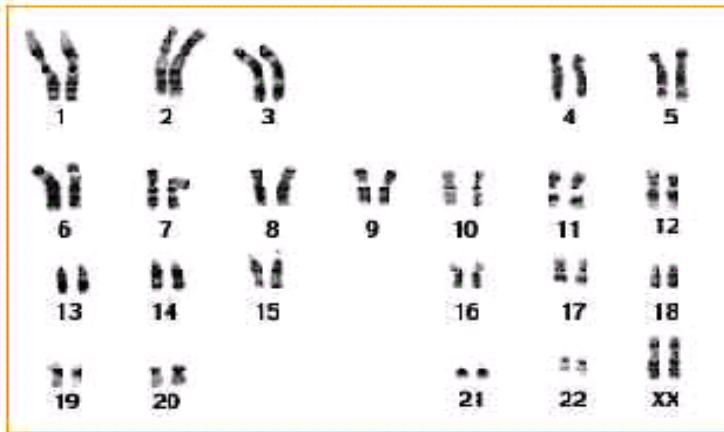
MUTACIÓN 2

AGCATCC**G**AGGT
TCGTAGG**C**TCCA

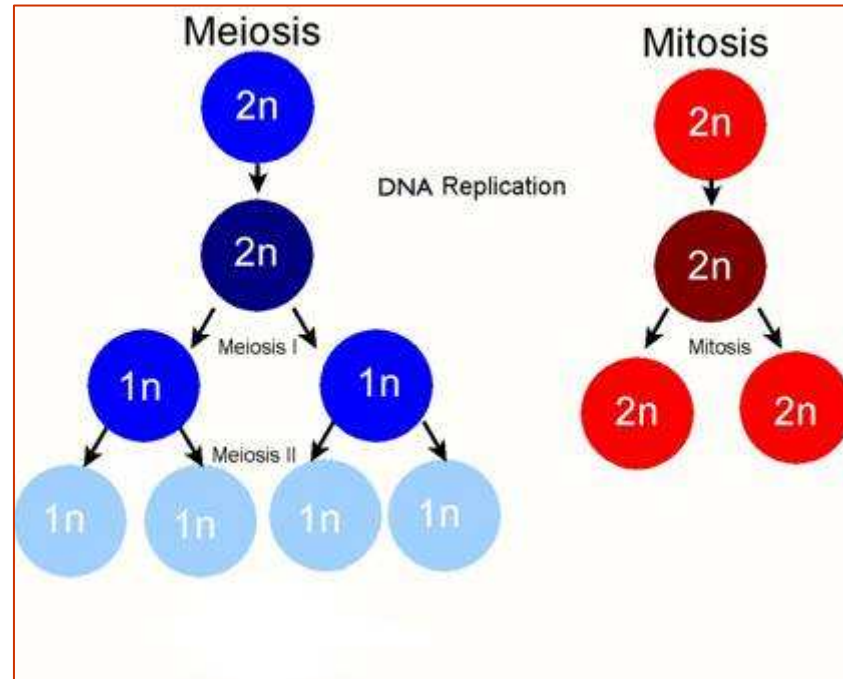
ALELO A''

Copia Génica

Numero representativo de un gen en una muestra o población.



Cariotipo humano



Gen autosómico: Diploide: dos copias del gen

Gameto:haploide: una sola copia del gen

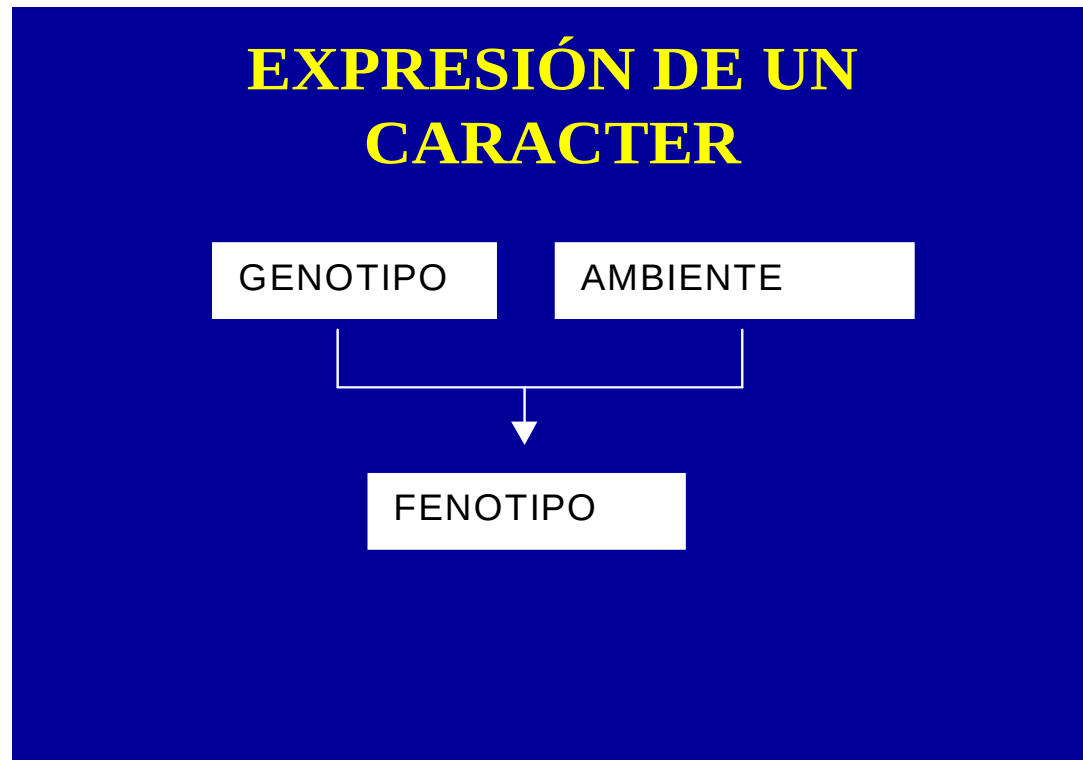
Herencia



La reproducción implica una transmisión de las características propias de los organismos progenitores a su descendencia. Esta transmisión es lo que se conoce como herencia biológica

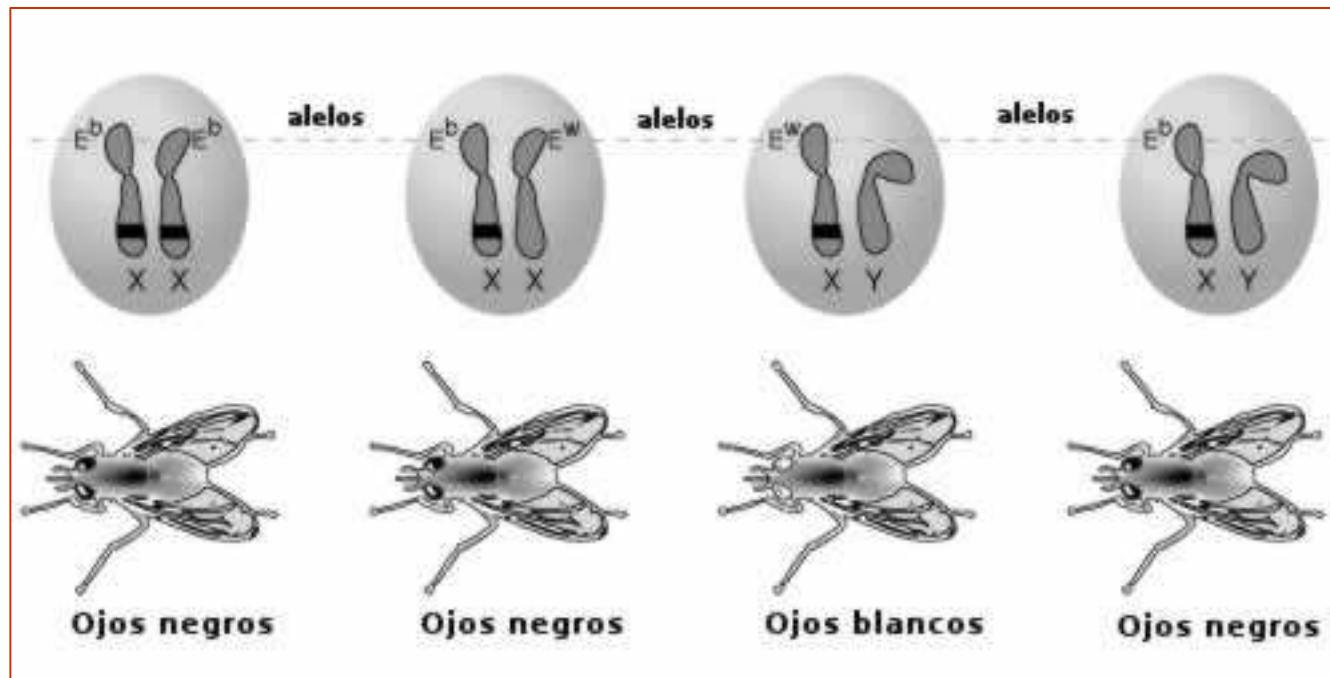
Distinguiendo fuentes de Variación Fenotípica

Las diferencias en el fenotipo pueden deberse a diferencias genéticas, ambientales o ambas



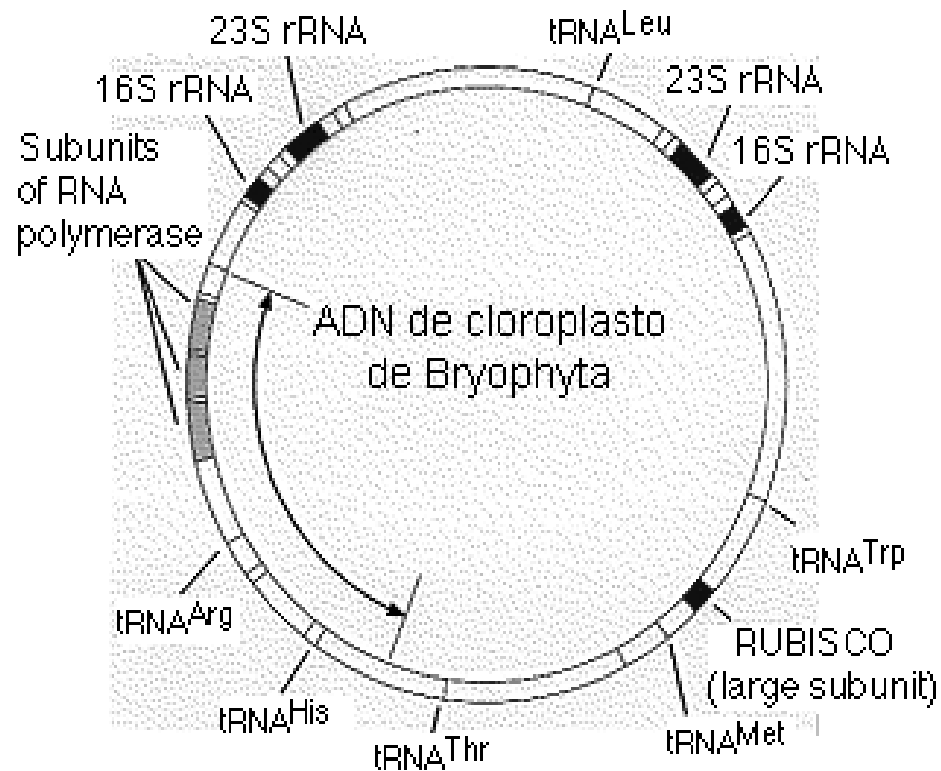
Distinguiendo fuentes de Variación Fenotípica

- Diferencias en genotipo
- Diferencias ambientales
- Efectos maternos

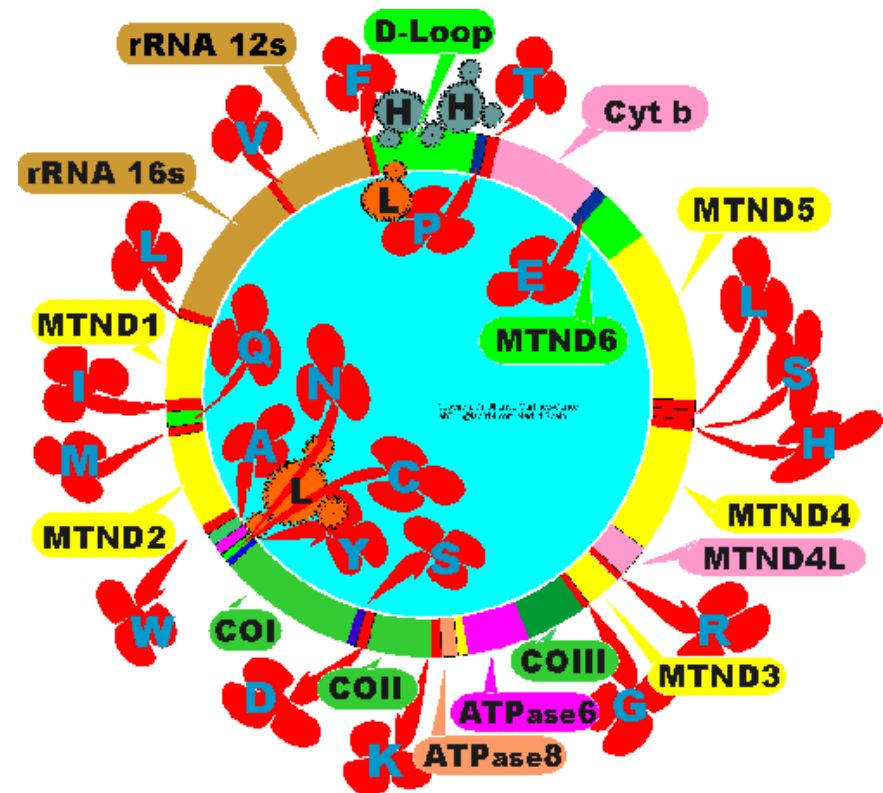


Distinguiendo fuentes de Variación Fenotípica

Diferencias en genotipo



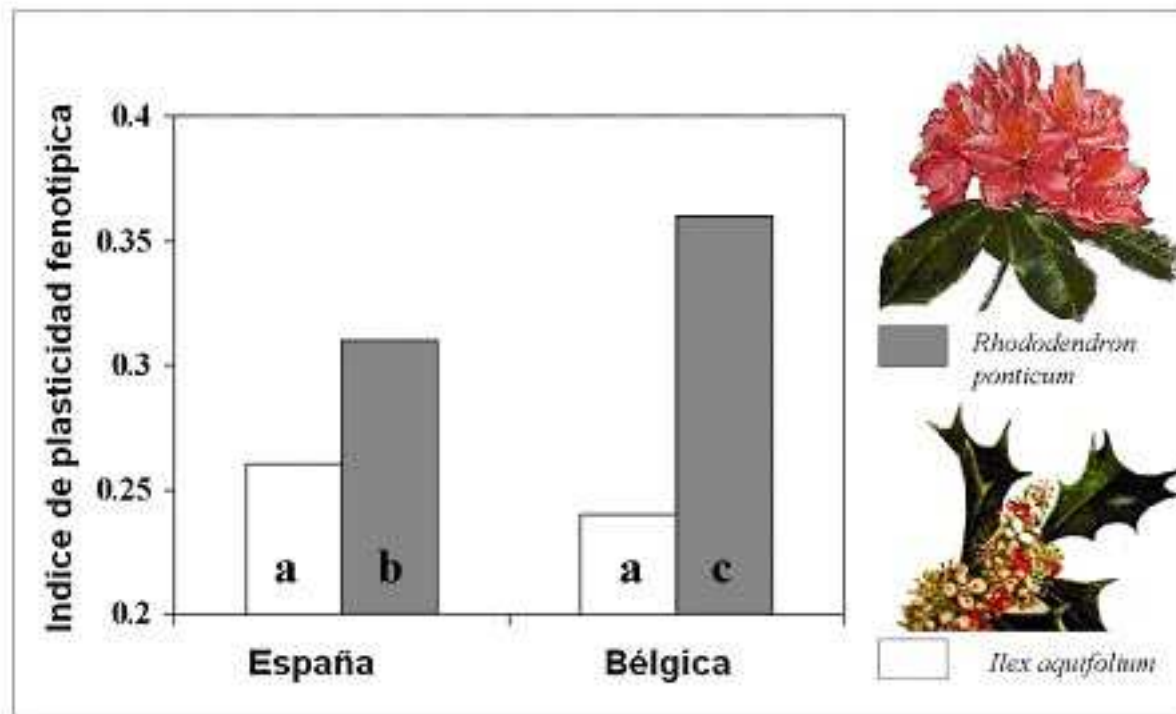
Los genes del cloroplasto son transmitidos principalmente por gametos masculinos



Los genes mitocondriales son transmitidos principalmente por gametos femeninos

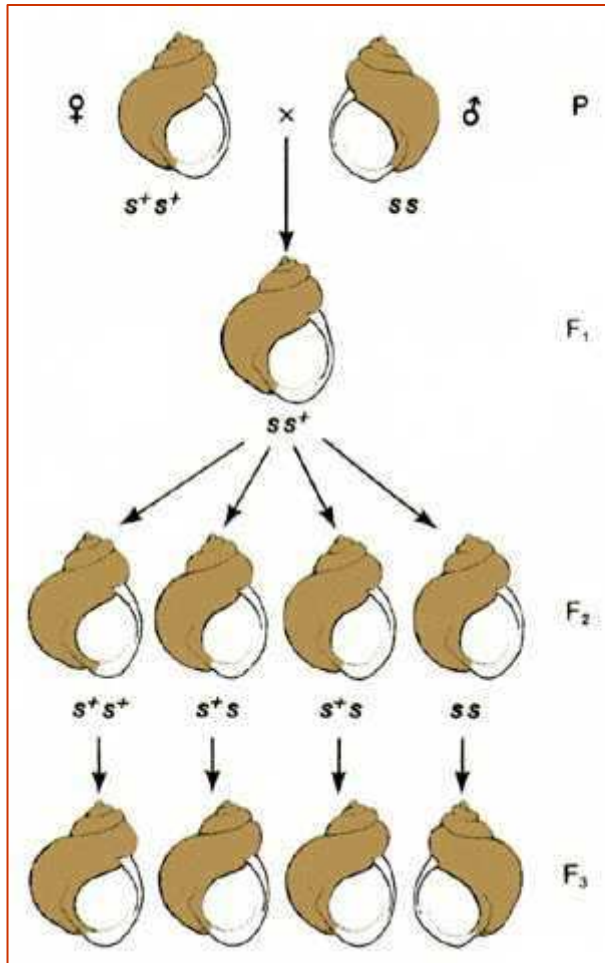
Distinguiendo fuentes de Variación Fenotípica

Diferencias en el ambiente



Plasticidad fenotípica promedio en respuesta a la luz de hojas de *Rhododendron ponticum* (barras grises) y acebo (*Ilex aquifolium*, en blanco) en poblaciones del Sur de España (Cádiz) donde *R. ponticum* es autóctono, y en Bélgica, donde *R. ponticum* es exótico e invasor.

Efecto materno



Caracoles del género *Linnaea*. Sturtevant en 1923, observó que el enrollamiento de la concha de estos caracoles dependía del genotipo de la hembra utilizada en los cruzamientos.

Distinguiendo fuentes de Variación Fenotípica

Las diferencias congénitas no necesariamente son debidas a diferencias genéticas.



Conclusión: la variación fenotípica surge de fuentes genéticas y ambientales

¿Cómo se estudian los genes y sus actividades?

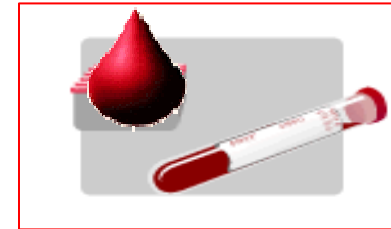
EL ADN y su extracción

¿En que organelos celulares hay DNA?



Aislamiento del ADN

1) El tipo de tejido que se va a emplear como fuente de ADN.



Para seleccionar un tejido como fuente de ADN debe reunir dos condiciones:

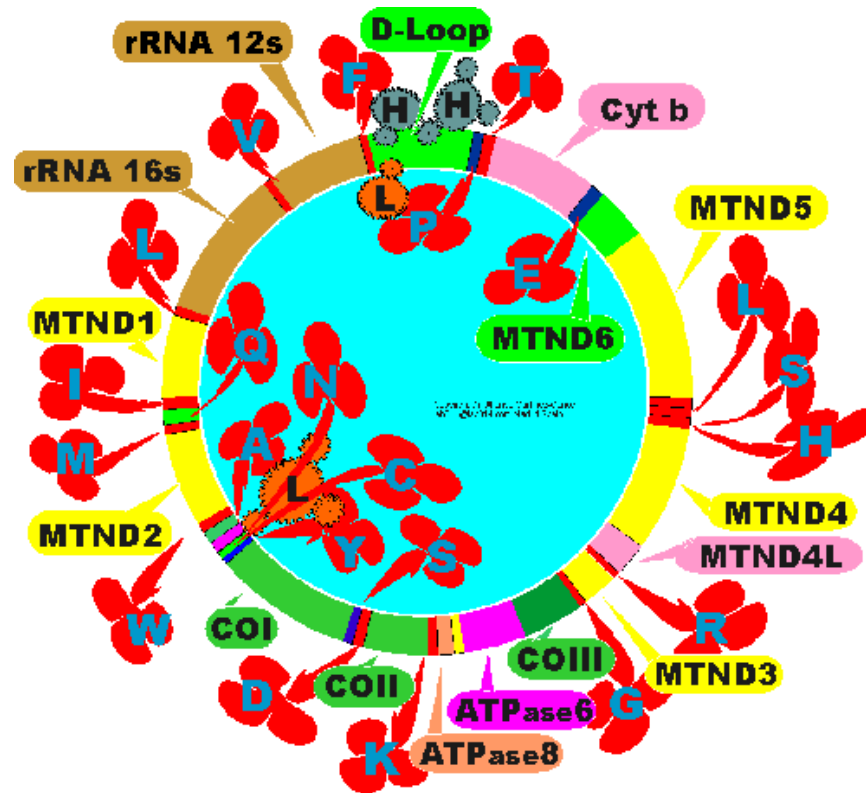
- a) contener gran cantidad de material genético y**
- b) poseer baja actividad de DNAasa**

2) El tipo de ADN que se va a amplificar

ADN nuclear



ADN mitochondrial: mitochondria



Dos grandes diferencias entre ADN nuclear y ADN cytoplasmático



Mitosis y Meiosis
(mutaciones
y recombinación)

Transmisión bi-parental
(fusión de gametos)



Solo Mitosis
(solo mutaciones)

Transmisión mono-parental
(maternal)

Extracción de ADN

Calidad

- ❑ Posibilidad de almacenarlo por tiempo indefinido.
- ❑ Conservar su estructura y propiedades.
- ❑ Reproducibilidad en experimentos posteriores

Cantidad

Depende del número y estado de las células propias del tejido a estudiar

un buen método de extracción debe mantener la **integridad física y bioquímica del ADN** e incrementar sus rangos de **pureza y concentración**

Pasos indispensables en la extracción de ADN

1. Ruptura de tejidos y paredes celulares.

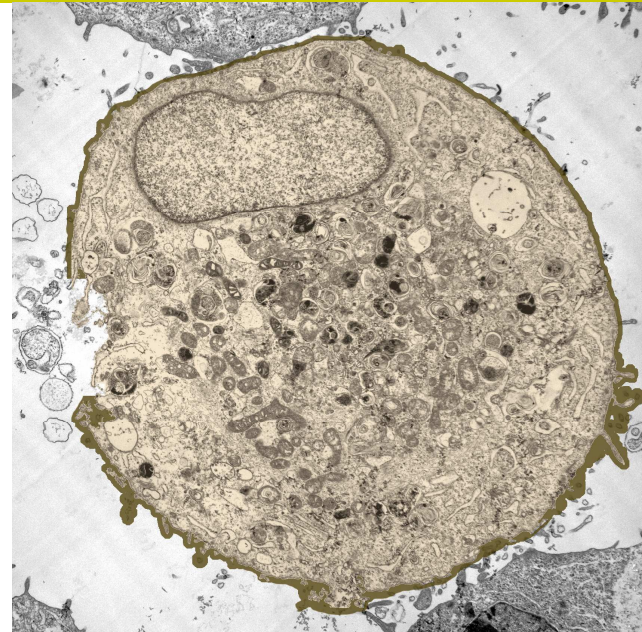


Pulverizar el tejido a bajas temperaturas

2. Ruptura de membranas

Una vez el tejido es disgregado en células, se hace necesario romper las membranas celulares para liberar el ADN.

SDS, Triton o
detergentes
comerciales)



3. Inhibición de enzimas que destruyen al ADN.

Como un mecanismo de defensa natural, las células contienen enzimas que destruyen al ADN

ADNasas

Estas enzimas deben ser inactivadas para garantizar la calidad de las preparaciones de ADN

Métodos físicos

- Calor (65 °C)

Métodos químicos

- Solventes orgánicos (fenol y cloroformo)
- Antioxi-dantes (Dithiothreitol y β -mercaptoetanol)
- Agentes quelantes (EDTA, EGTA) que capturan los iones magnesio necesarios para la funcionalidad de las ADNasas,

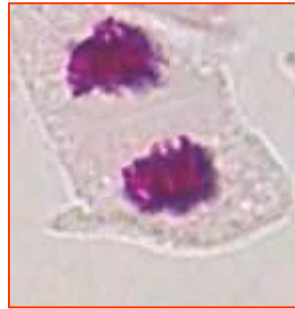
4. Extracción de contaminantes

Contaminante	Tratamiento
Polisacáridos	Uso de detergentes
Lípidos y grasas	Incubación enzimática (con lipasas). Uso de detergentes (SDS, Triton). Tratamiento con cloroformo, alcohol isoamílico
Proteínas	Incubación enzimática (con proteasas). Extracción con fenol y cloroformo. Uso de detergentes.
Pigmentos	Uso de alcoholes.
ARN	Incubación enzimática (con ARNasa). Electroforesis. Cambios en el pH.
Alcoholes	Evaporación a temperatura ambiente.
Compuestos fenólicos	Tratamiento con cloroformo y alcoholes.
Detergentes	Uso de solventes orgánicos.
Sales	Uso de etanol al 70%.
Sólidos insolubles	Uso de soluciones acuosas con posterior centrifugación.

Repaso Replicación DNA

Replicación del DNA

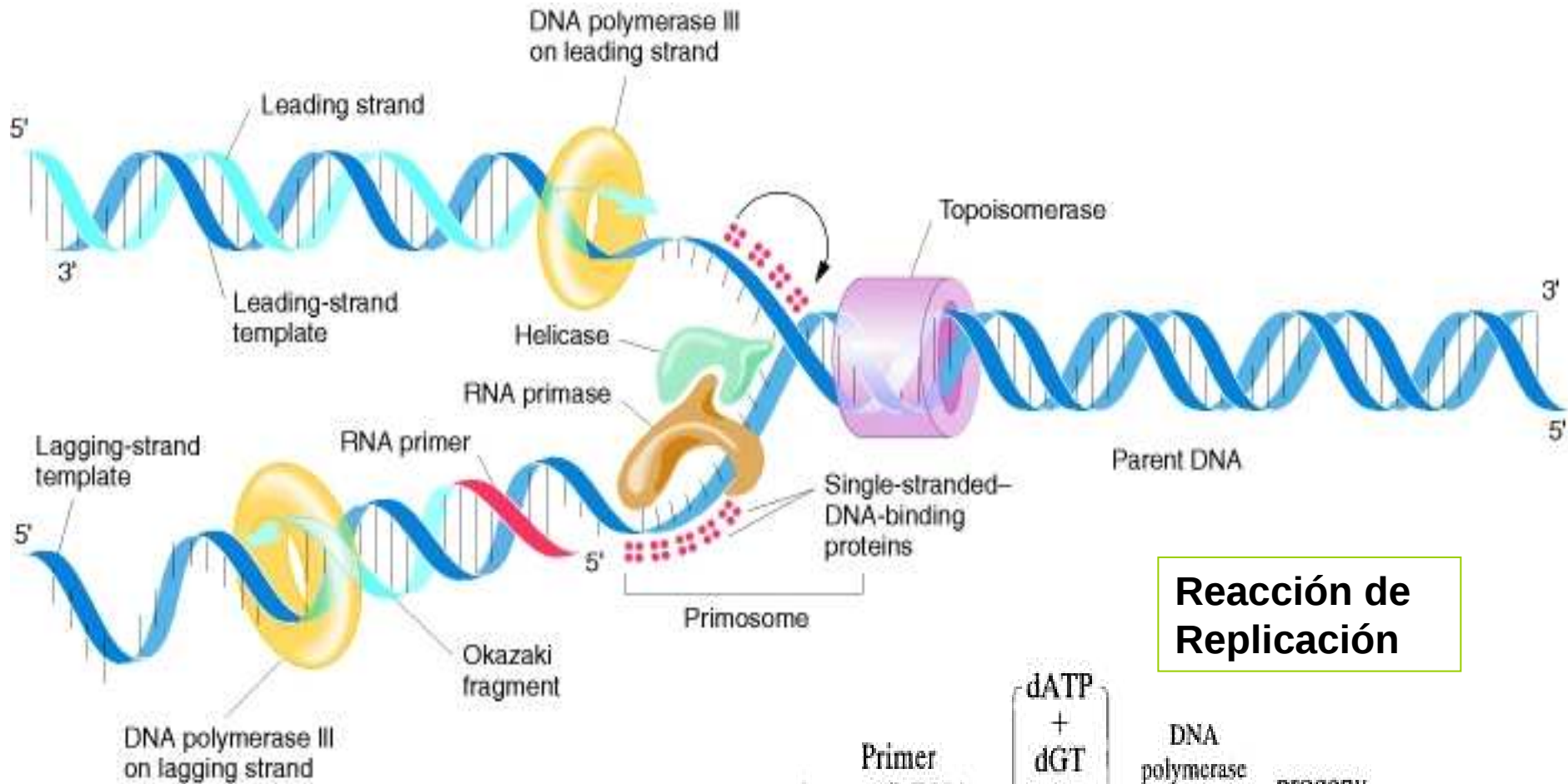
- Ocurre cada vez que la célula se divide (en la Interfase Celular, fase S)



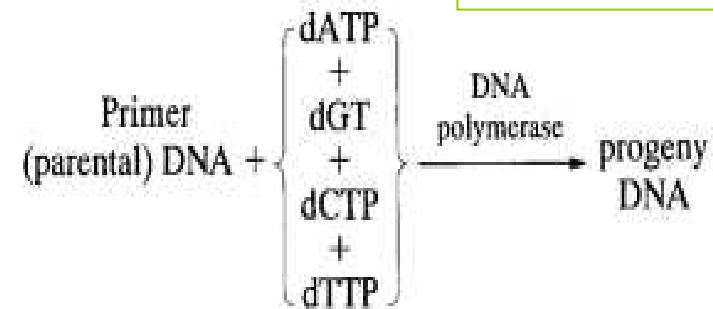
Hay Mecanismos simples involucrados

- Separación inicial de las dos hebras.
- Producción de una nueva hebra, obteniendo una NUEVA MOLÉCULA DE ADN.
- **El proceso requiere la participación de varias enzimas.**

Horquilla de replicación

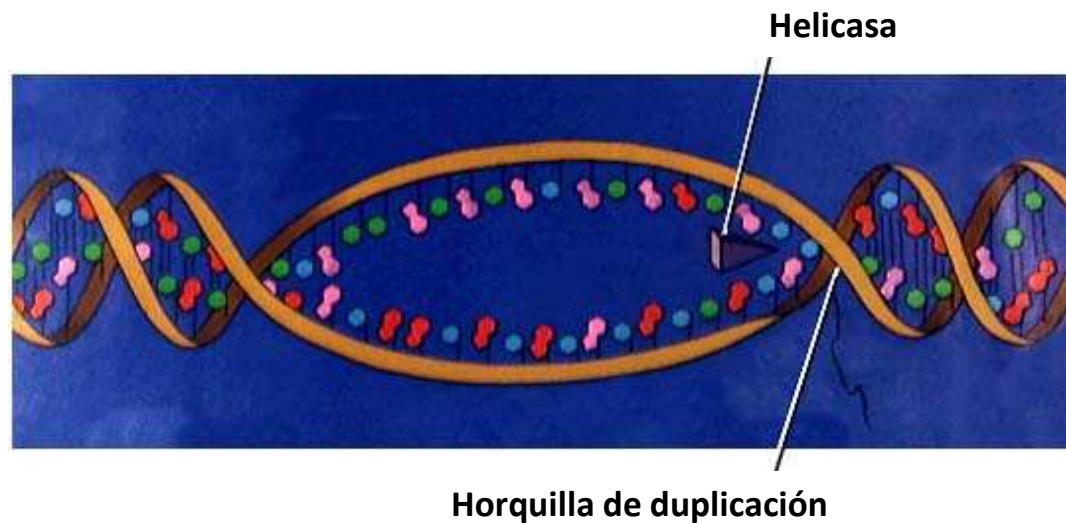


Reacción de Replicación



Enzimas que participan en el desenrollamiento del ADN:

HELICASAS: Enzimas que se mueven a lo largo del ADN y separan las 2 hebras, usando energía del ATP.



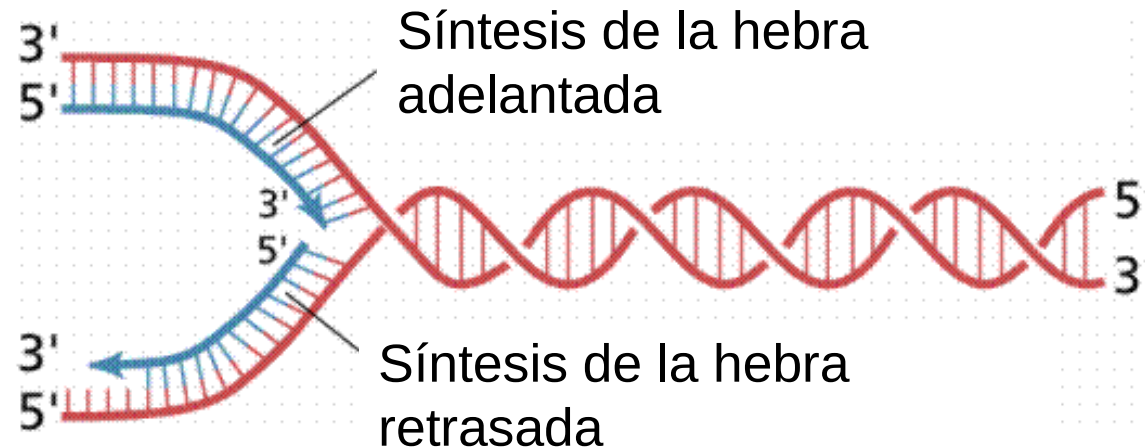
TOPOISOMERASAS:
(Ej: ADN Girasa)

Enzimas que disminuyen el estrés topológico generado por la separación de las hebras (corte reversible de un enlace fosfodiéster)

PROTEINAS DE UNIÓN A ADN:
(SSB)

Proteínas que se unen a las hebras simples para estabilizarlas

2º. Fase de elongación:

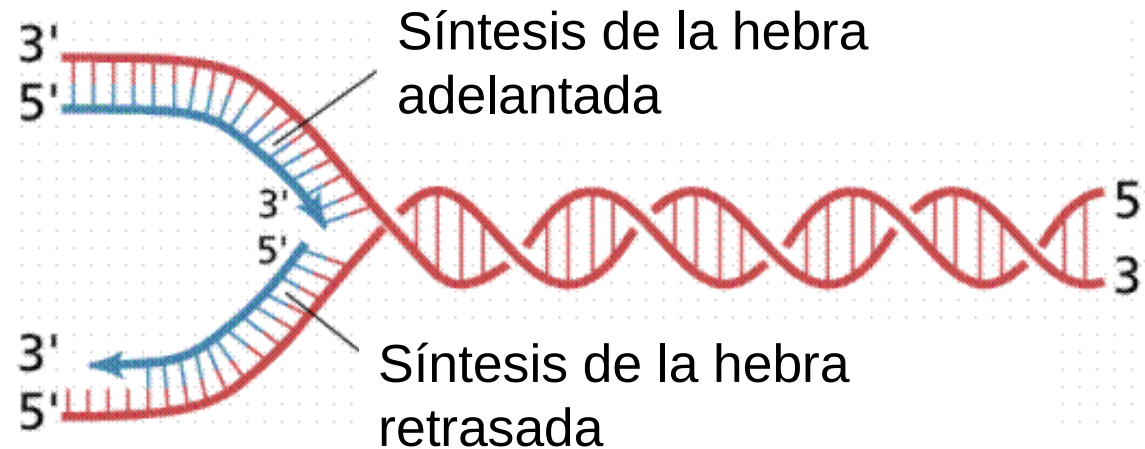


Requerimientos de la fase de elongación:

- Molde de ADN doble hebra
- Trozo corto de ARN llamado partidor o cebador
 - Es sintetizado por la enzima **PRIMASA** (10-60 nt en procariotas, en eucariotas es de 10 nt)
- Las mismas enzimas y proteínas de la fase de iniciación

PRIMOSOMA: El complejo formado entre la primasa y las proteínas auxiliares DnaB, DnaT, Pri A, Pri B, y Pri C.

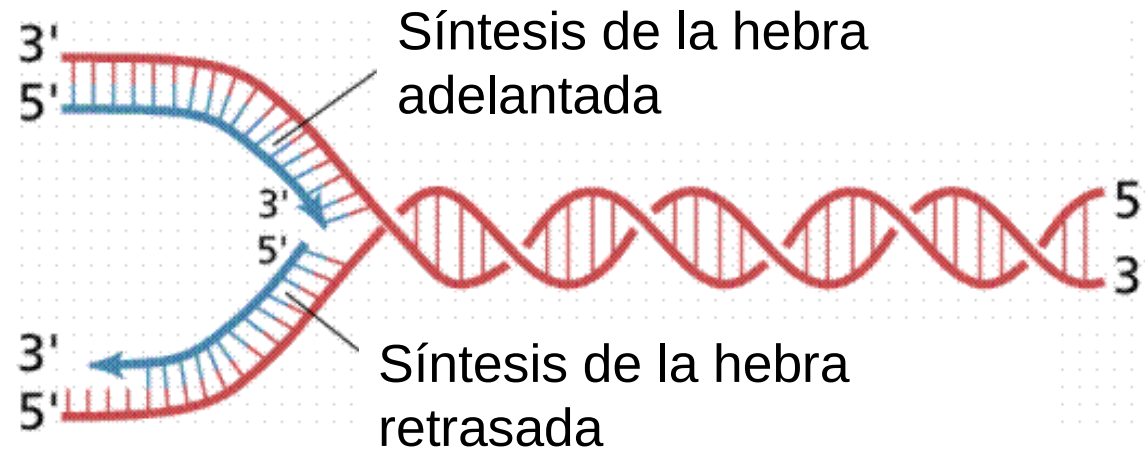
2º. Fase de elongación:



Mecanismo de síntesis:

- Síntesis del partidor por la PRIMASA
- Síntesis de la hebra hija desde el extremo 3' del partidor
(la forma de sintetizarla depende de la hebra, si es continua o discontinua)

2º. Fase de elongación:

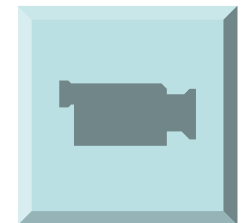
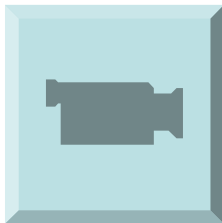
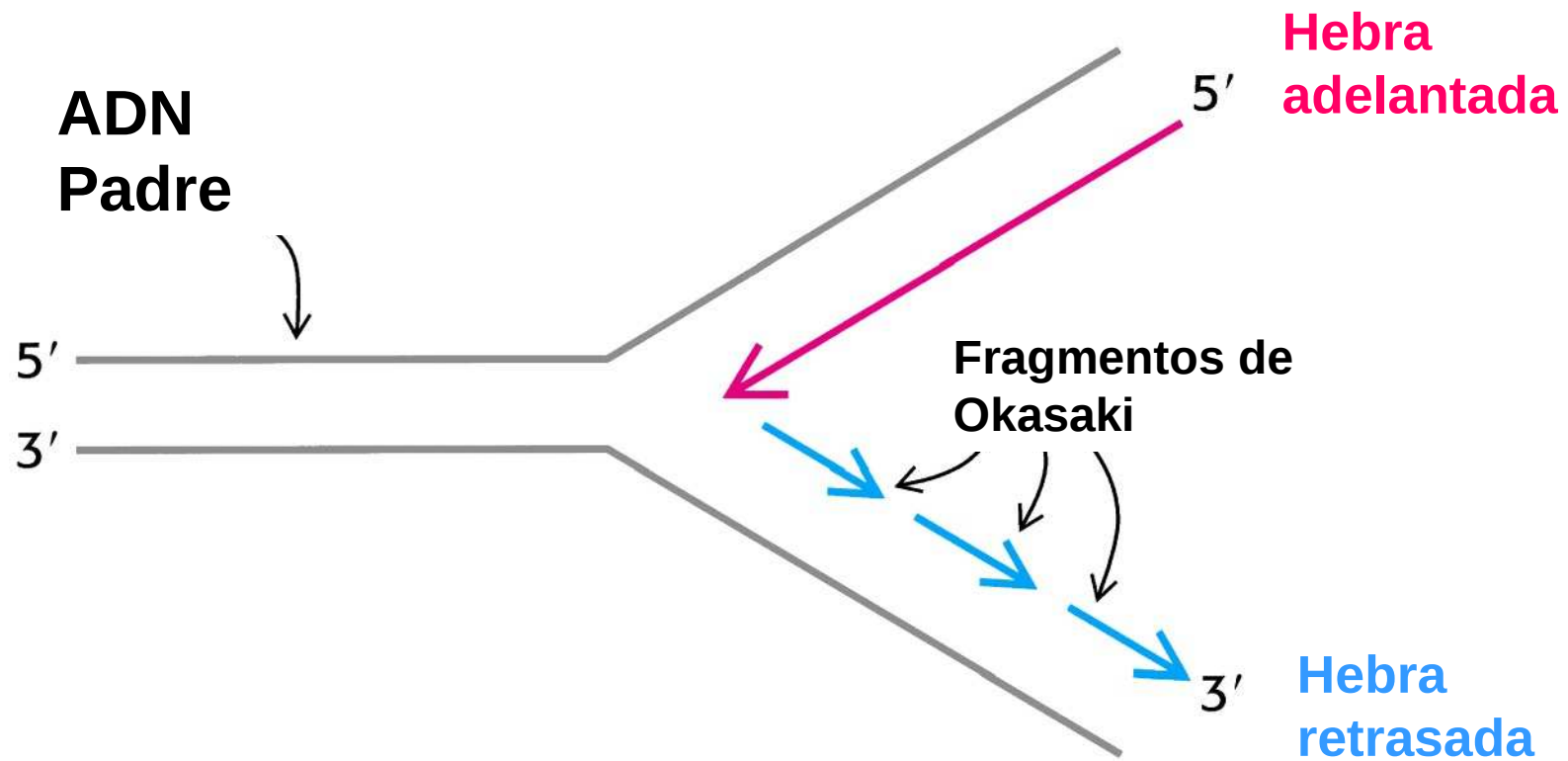


La síntesis es semi-discontinua:

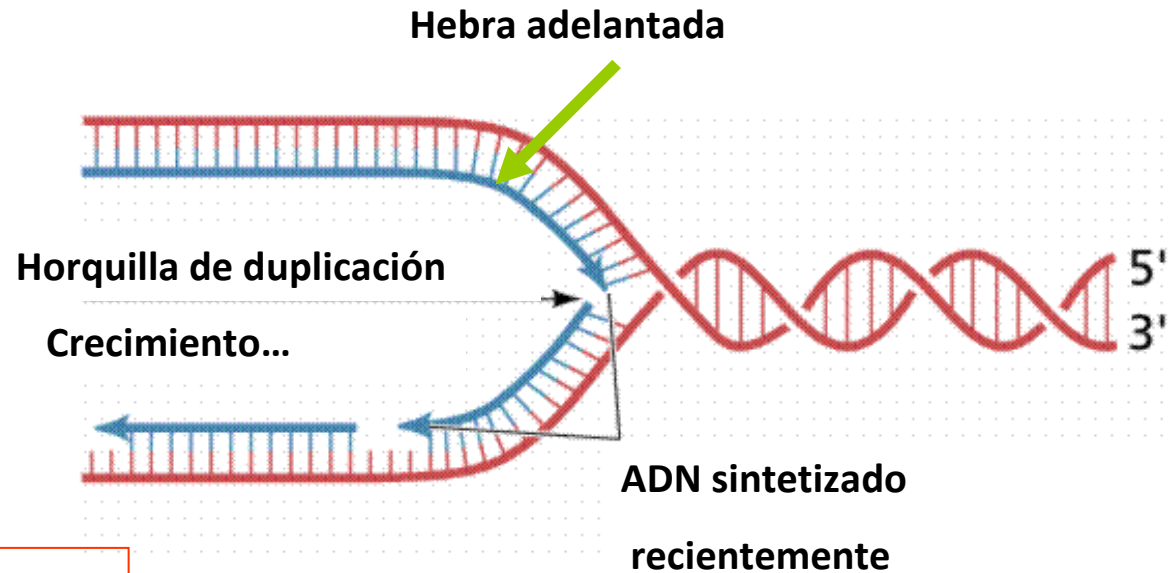
Reiji Okazaki, 1960's

Mientras una hebra es sintetizada en forma continua (hebra adelantada), la otra (hebra retrasada) se sintetiza por fragmentos*, en forma discontinua.

* Estos fragmentos son: Fragmentos de Okazaki



2º. Fase de elongación:

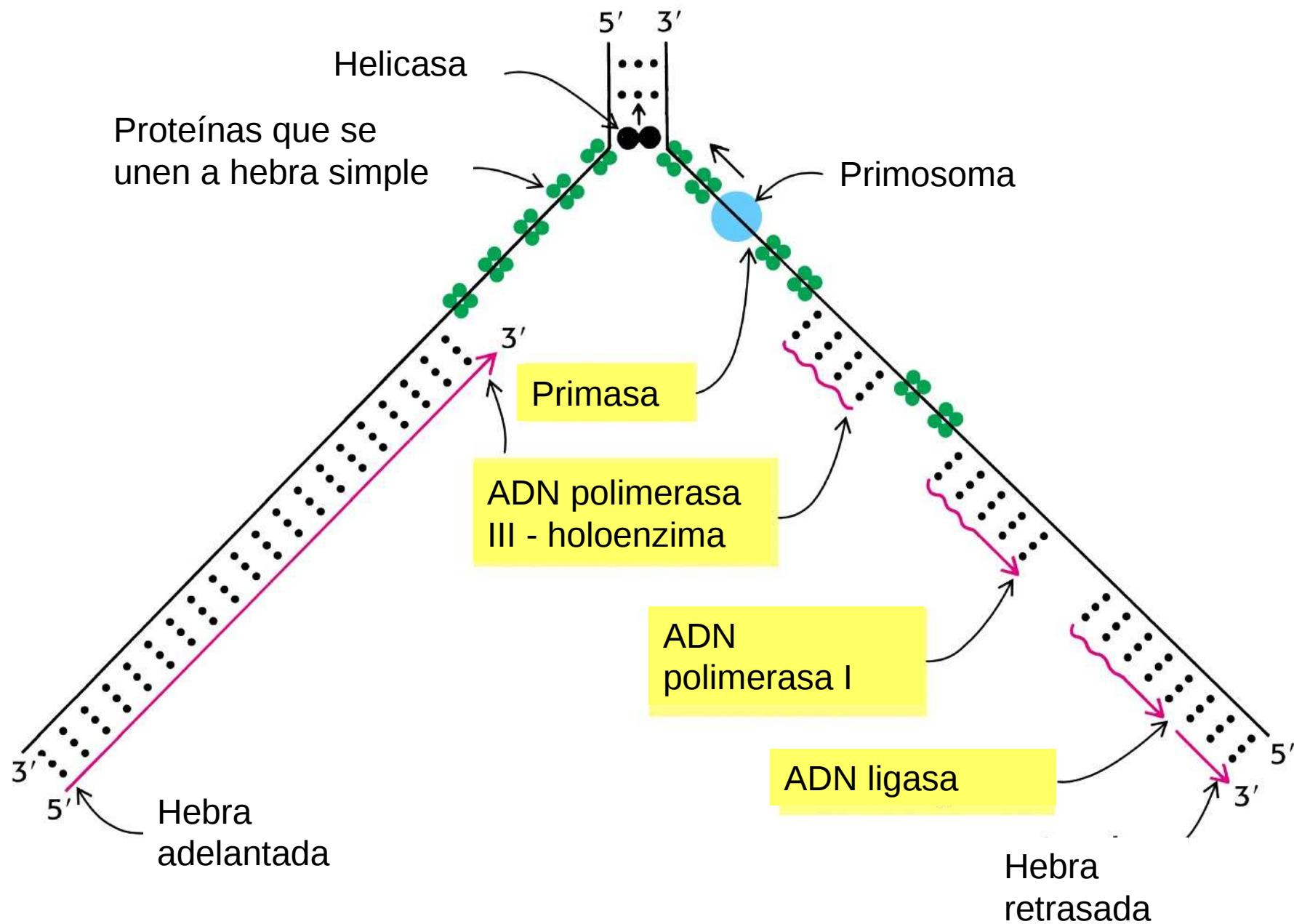


Enzimas que duplican el ADN:

ADN polimerasa III : Es la enzima responsable de la duplicación del ADN.

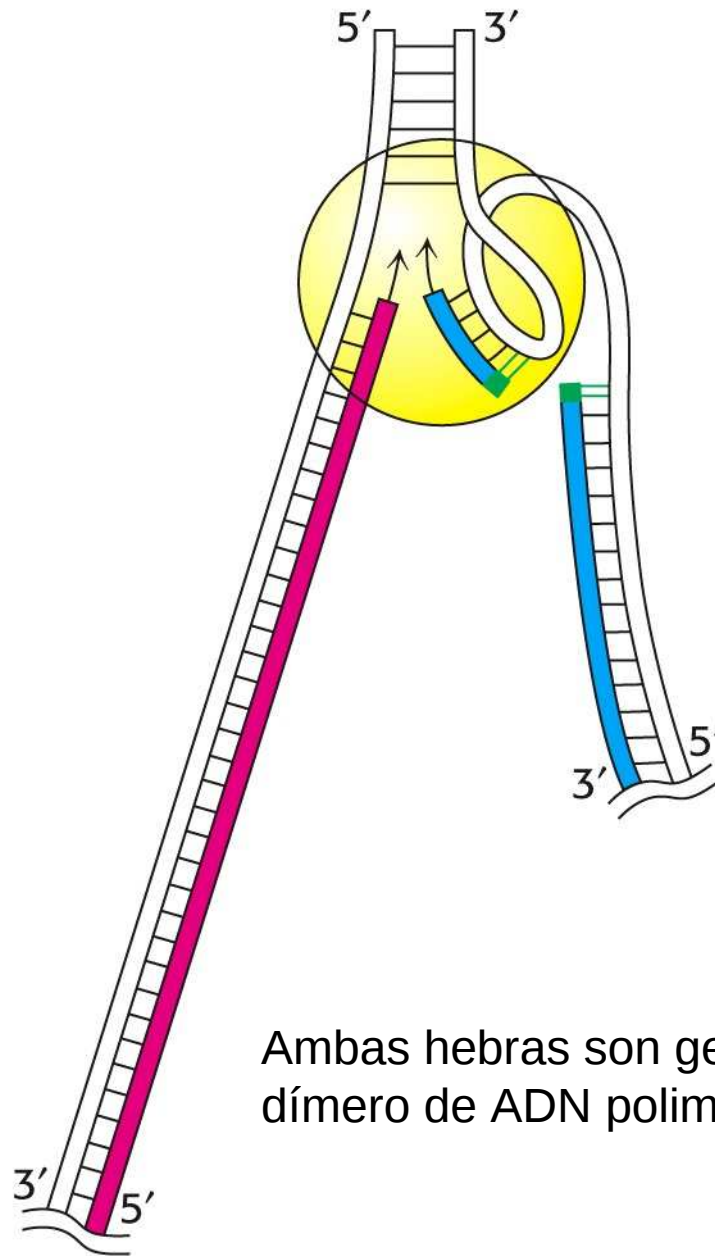
ADN polimerasa I : Su función es remover el partidor de ARN y sustituirlo por ADN.

Ambas poseen actividad exonucleasa correctora $3' \rightarrow 5'$ (proofreading) que permite aumentar la fidelidad de la duplicación del ADN, removiendo los nucleótidos que fueron puestos erradamente. Evitan mutaciones.



Duplicación
1

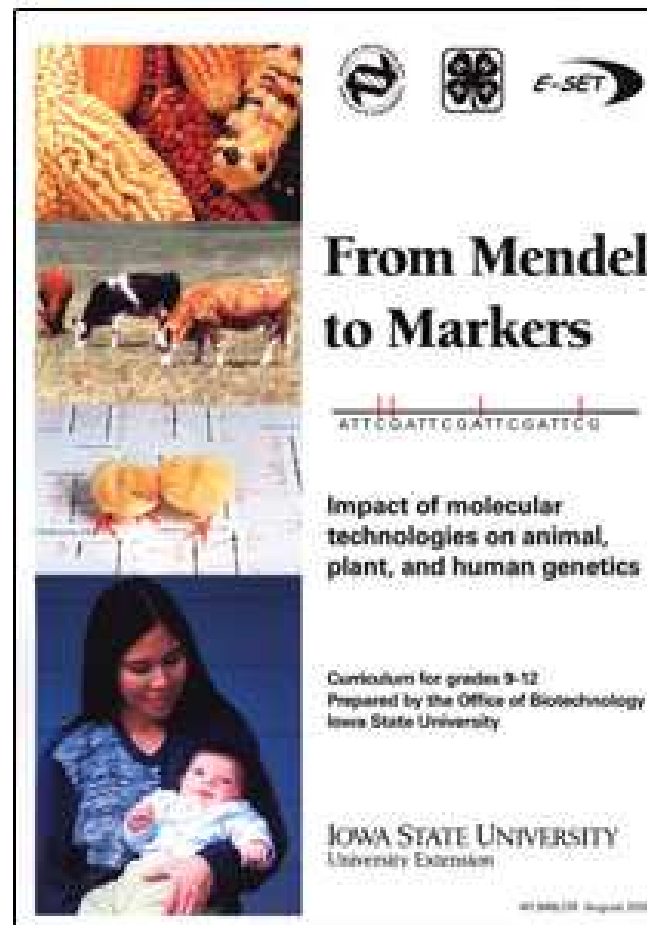
Duplicación
2



Ambas hebras son generadas por un único dímero de ADN polimerasa III

Marcadores Moleculares

Son marcadores geneticos basados en la secuencia del ADN



>gi|28804884|dbj|AP004104.1| Galaxias maculatus mitochondrial DNA, Cytb 1141

AGGCCAATCTACGAAAGACCCACCCCCTACTAAAAATCGCCAAC
GGCGCGCTTGTTGACCTGCCAGCCCCCTCAAACATCTCAGTCTG
ATGAAACTTCGGATCTCTCCTTGGCCTTTGCTTGGCTAGCCAGAT
CCTTACGGGACTTTTTCTTGCTATGCACTATACTTCTGATATCTCT
ACTGCATTTTCTTCAGTCACACACATCTGTCTGAGATGTAAGCTAC
GGCTGATTGATCCGGAACATGCACGCTAACGGAGCATCTTTCTT
TTTCATCTGTATTTATATGCACATCGGGCGAGGTTTATACTATGG
CTCTTATCTGTACAAGGAGACCTGAACCATCGGAGTAATTCTCC
TCCTCCTTGTCATGATGACCGCTTTTGTGGGTACGTTCTCCCCCT
GGGGACAAATGTCGTTTTGAGGTGCCACCGTTATTACCAACCTT
CTCTCTGCTGTCCCCTACGTAGGGAATGACCTCGTTCAGTGAATC
TGGGGGGGATTTTCTGTAGACAATGCGACTCTCACCCGGTTCTTT
GCTTTCCACTTTTTGTTTCCATTTCGTTATCGCCGGAGCAACTGTTT
TGCACCTGCTTTTTCTGCACGAGACCGGGTCCAACAACCCAGCA
GGATTAAACTCGGACGCCGACAAAATCTCTTTCCACCCCTACTTT
TCTTACAAGGACCTCCTTGGGTTTCGTTGCTCTTCTCCTCGCCCTG
ACTTCTCTCGCACTATTTTCTCCTAACCTCCTTGGGGACTCAGAG
AACTTTATCCCTGCCAACCCCCTGGTTACTCCCCCTCACATCCAG
CCTGAGTGATATTTTTTGTGTTGCTTATGCTATCCTACGTTCTAT
TCCGAACAAGCTGGGGGGAGTTTTGGCTCTTCTTTTCTCGATTCT
TGTAATAATGGTTGTTCTATCTTACACACGTCTAAGCAGCGAG
GCTTAACATTTTCGTCCTCTGACGCAGTTCCTGTTTTGGGCCCTGG
TCGCCGATGTACTTGTCTTGACTTGAATTGGGGGCATACCTGTTG
AGCATCCATACATTATCATTGGGCAAGTGGCATCGGCTATCTAC

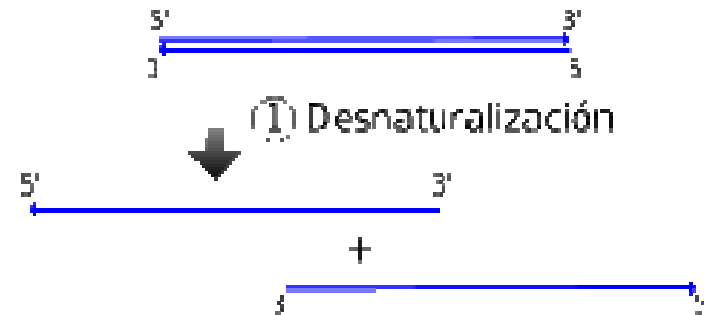
1. Diseño de partidores
2. Técnica de Reacción en cadena de la polimerasa

¿Cómo funciona la PCR?

Ciclos repetitivos: + de treinta

1

ruptura de los
puentes de
hidrógeno del DNA



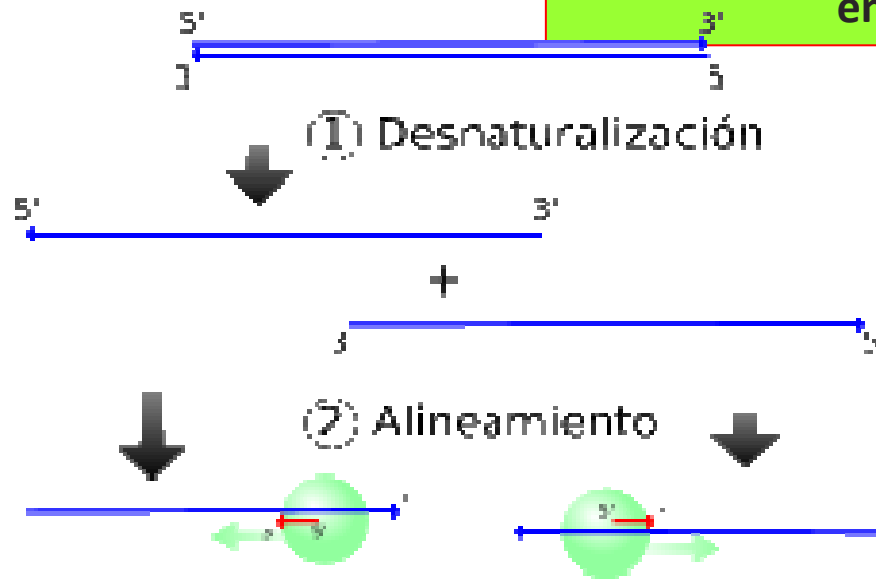
Temperatura de incubación 95°C,
por un minuto.

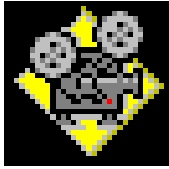
Hibridación con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla)

La temperatura debe facilitar el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs.

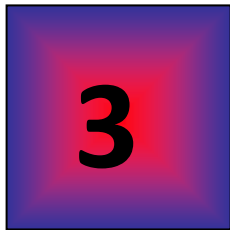
La temperatura depende de la temperatura de fusión (T_m) de los iniciadores, pero generalmente oscila entre 50 y 60°C.

2

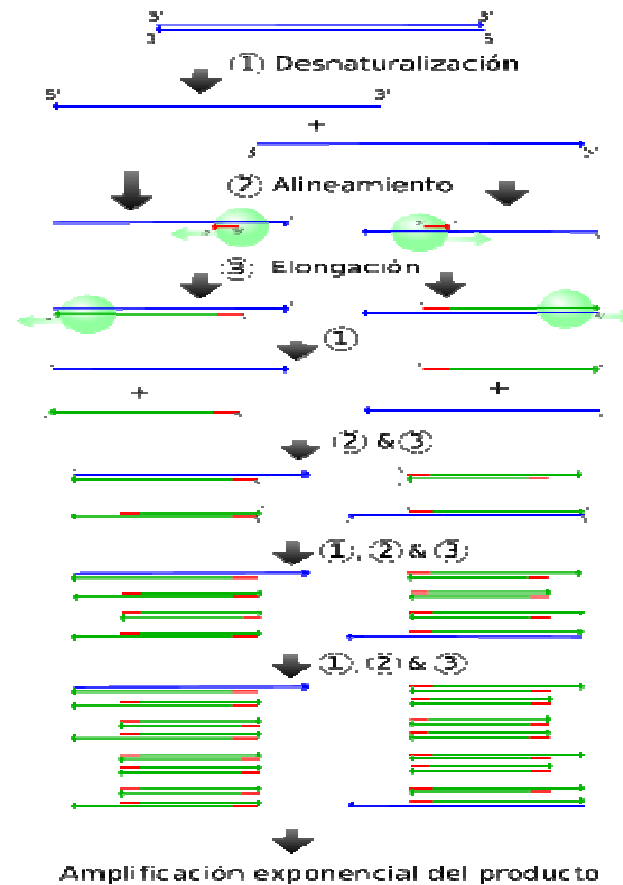




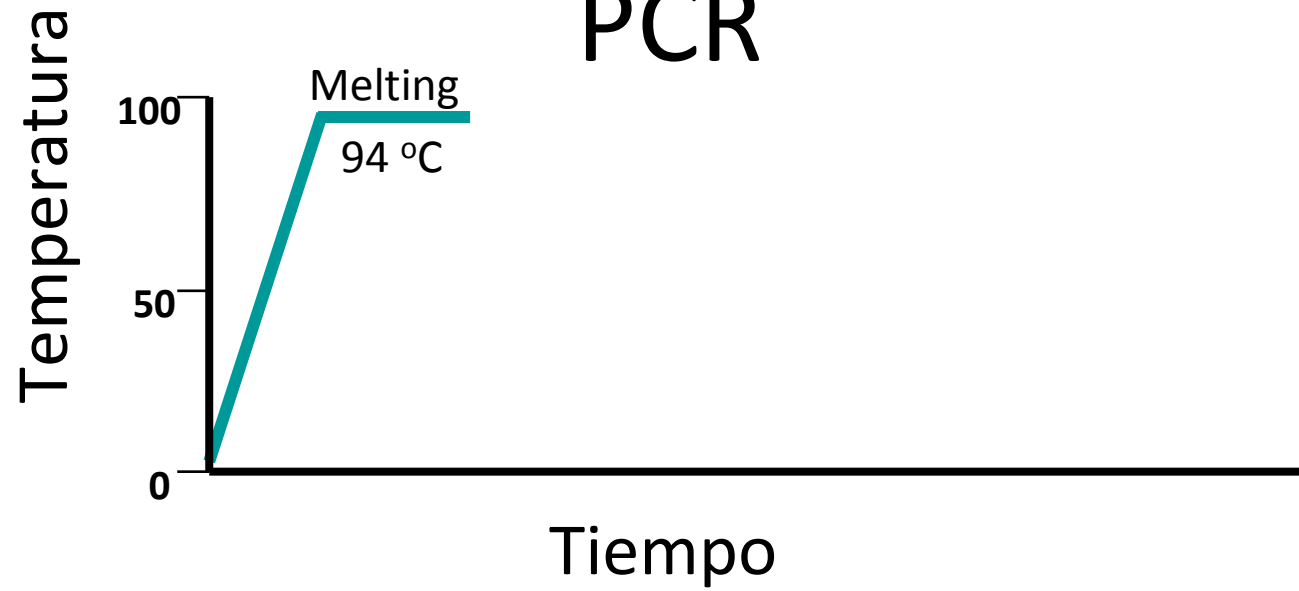
Pcr.exe



Elongación. Temperatura 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde.



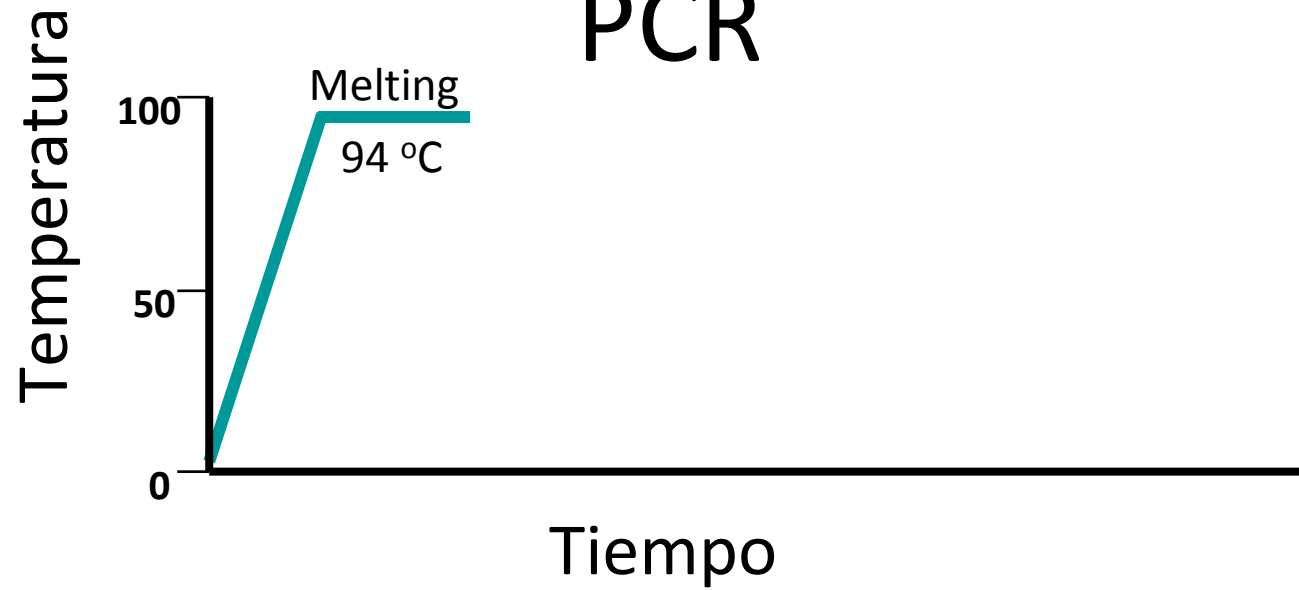
PCR



DNA de cadena
doble

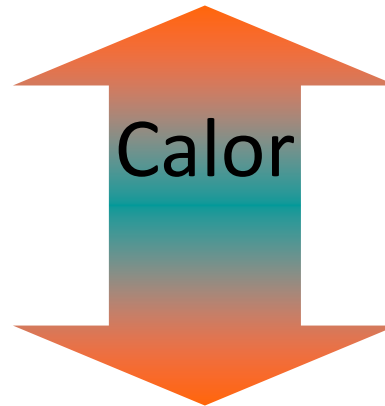


PCR

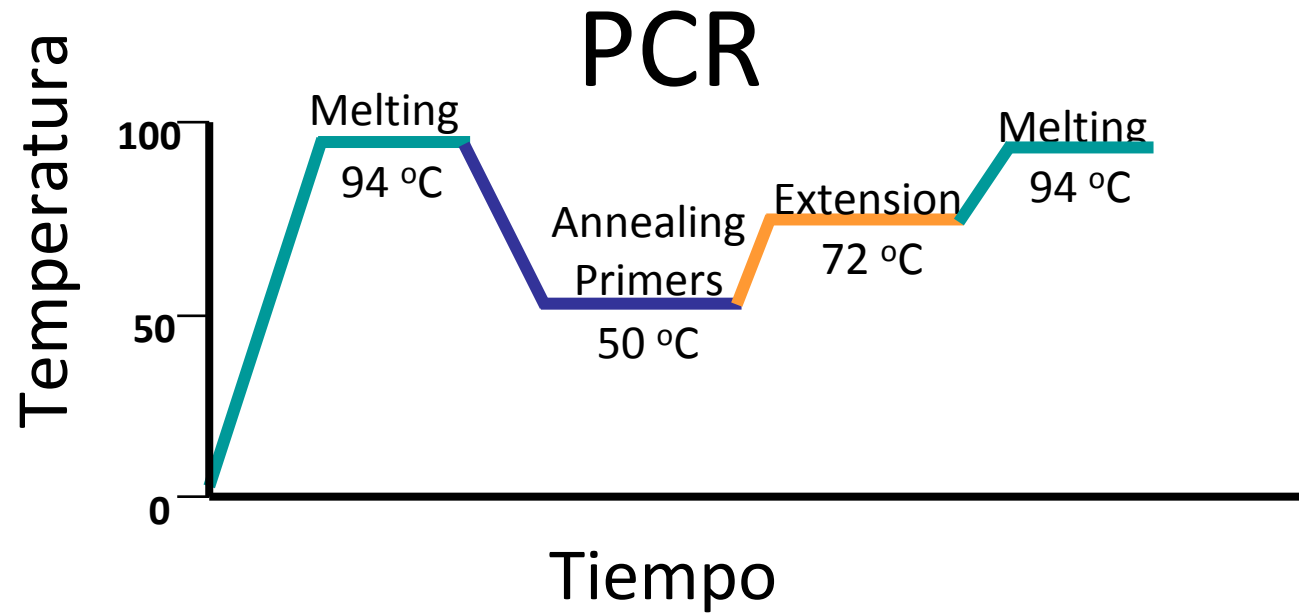


DNA de
cadena simple

3' ————— 5'



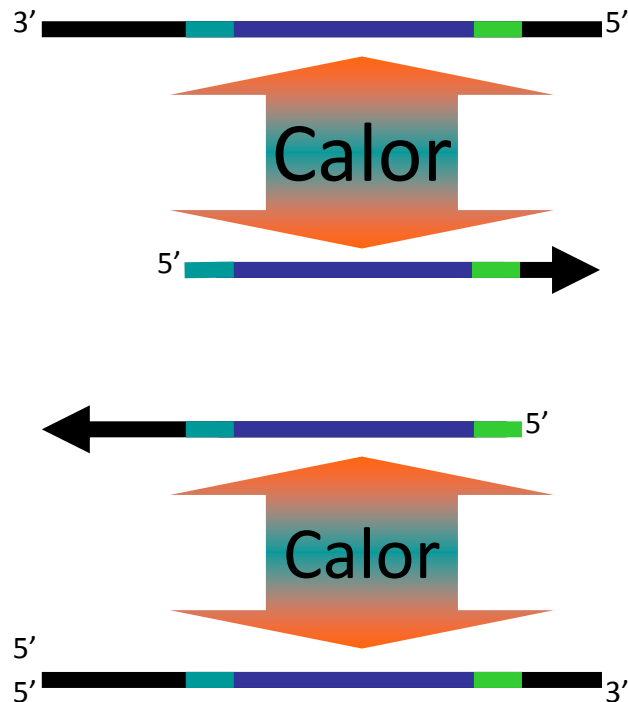
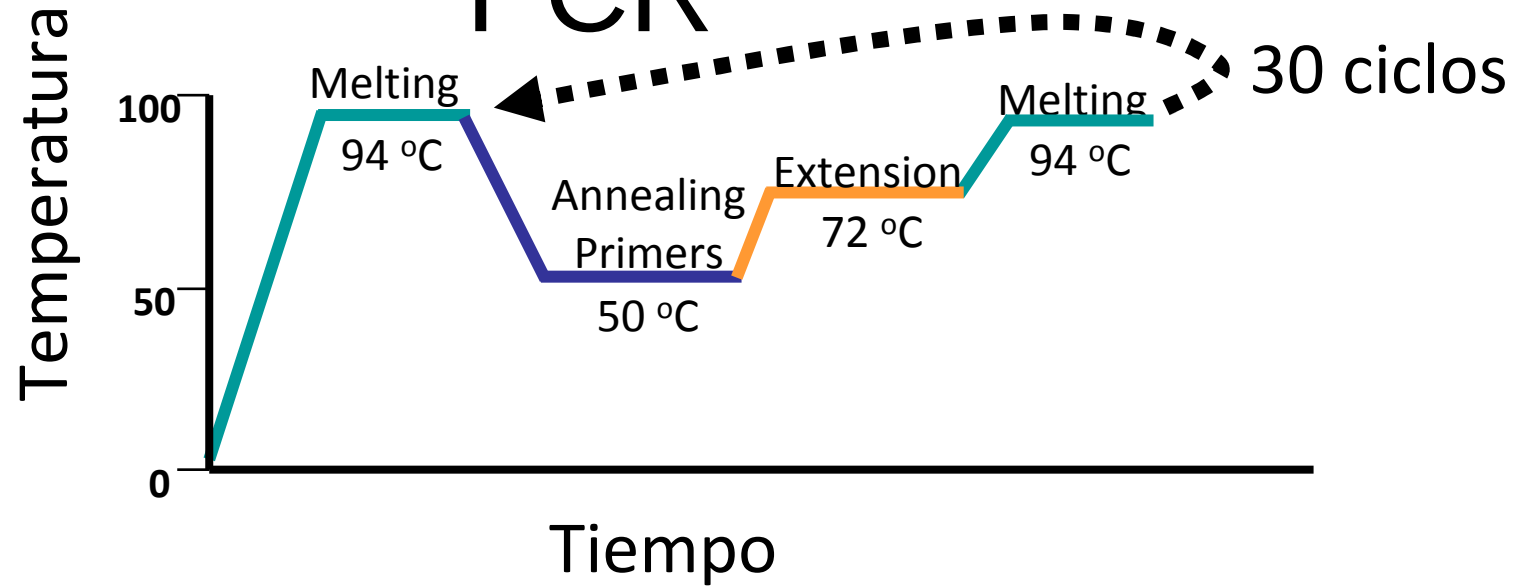
5' ————— 3'



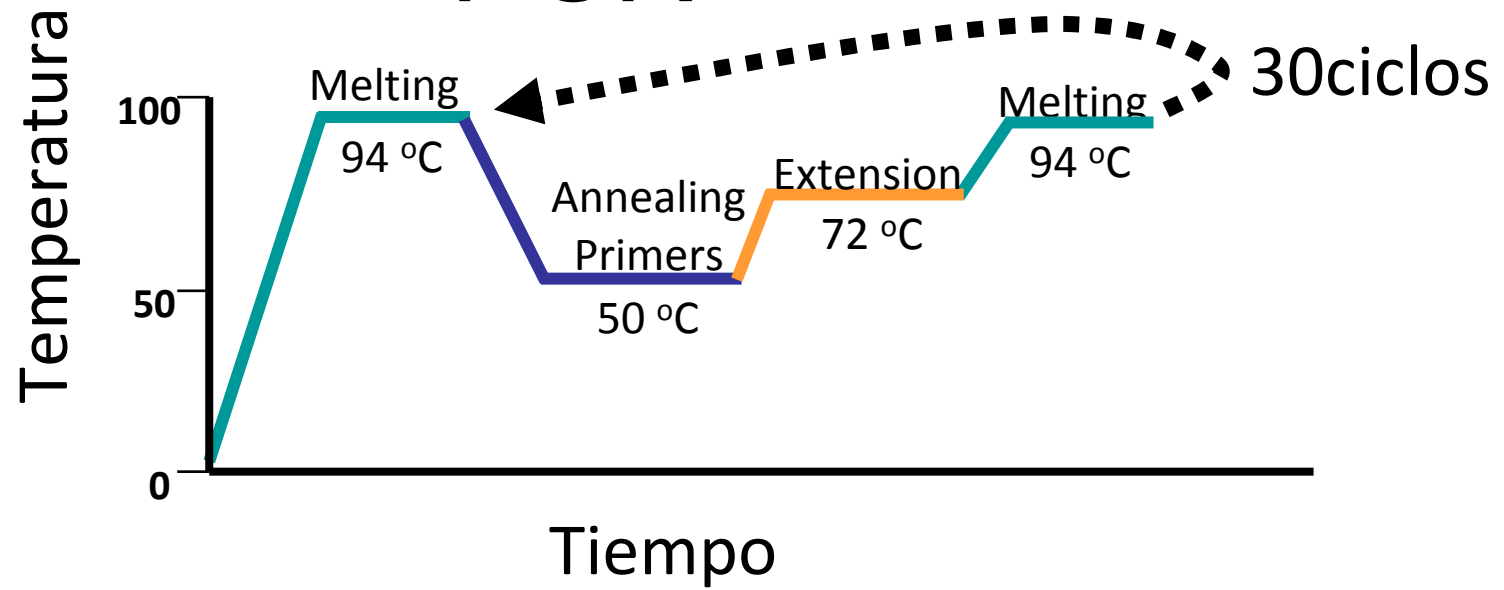
Hibridación
de primers



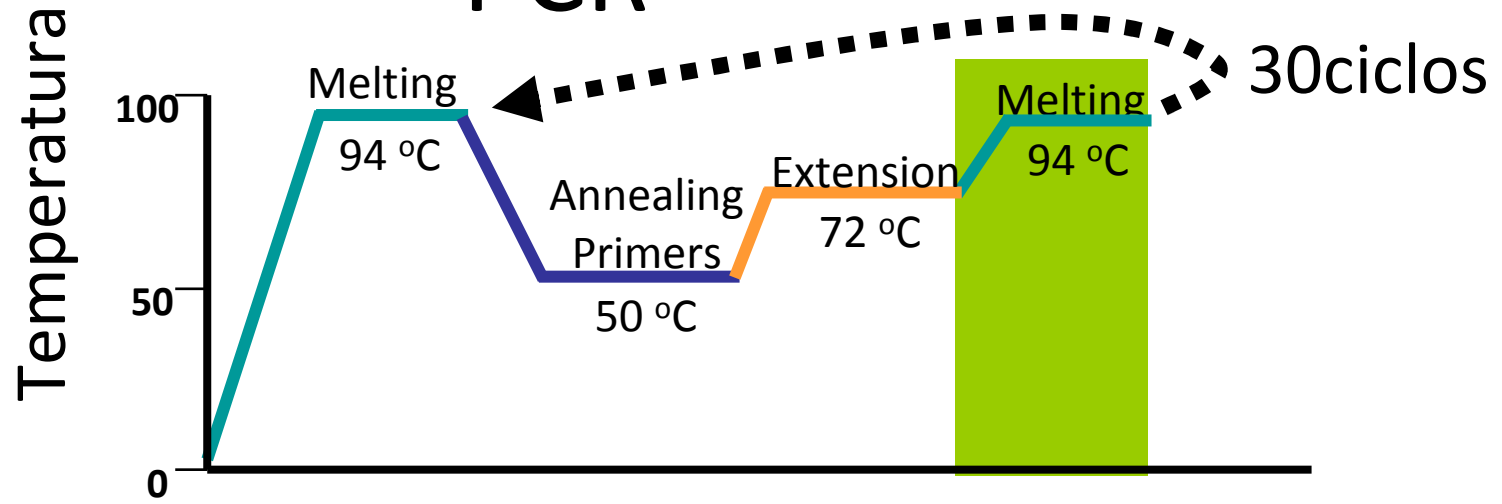
PCR



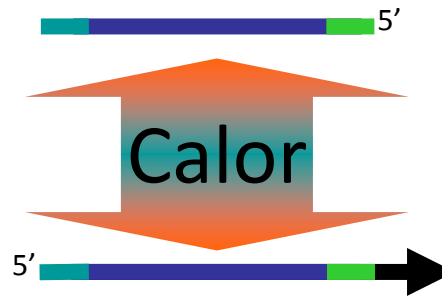
PCR

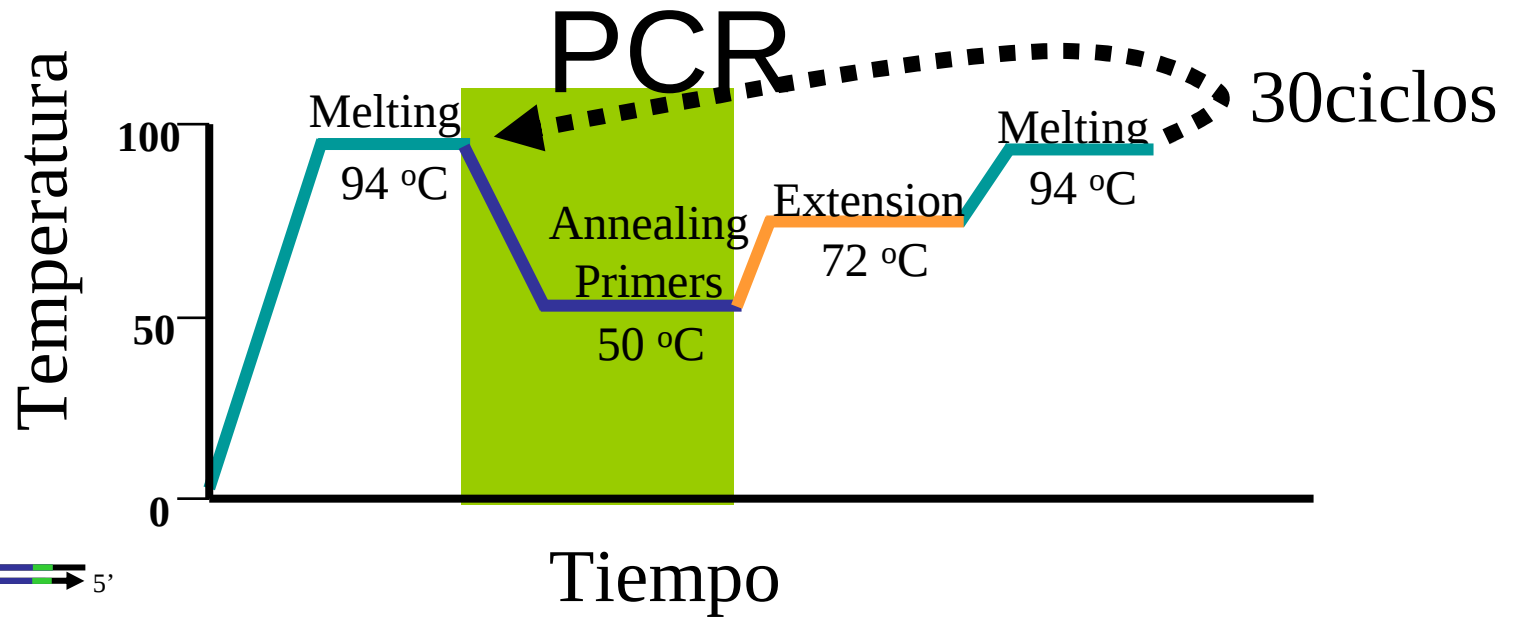


PCR

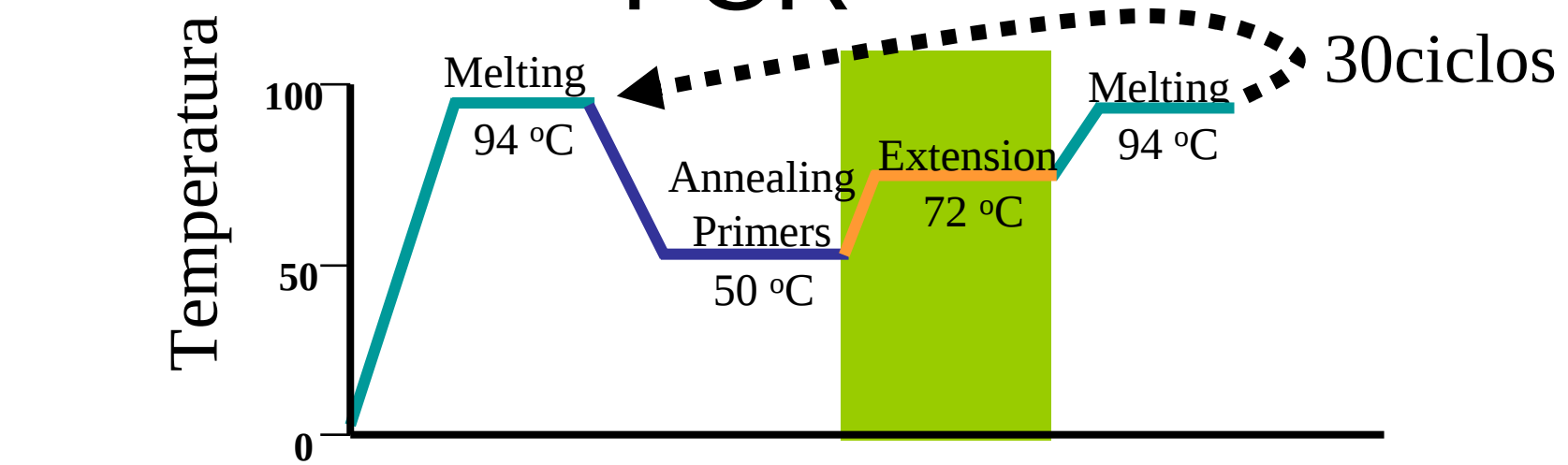


Tiempo





PCR



Tiempo



Fragmentos de
tamaño definido



El número de copias del DNA delimitado por los primers se duplica en cada ciclo de PCR.

Numero de copias

1

2

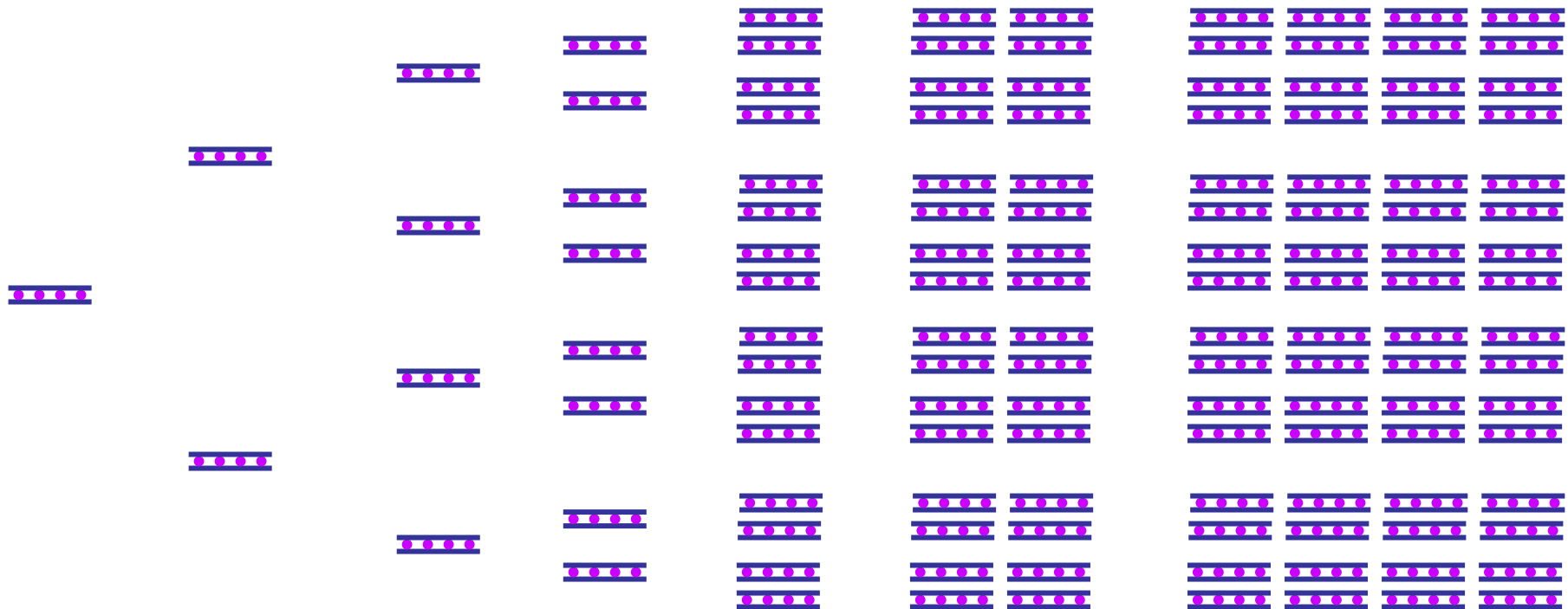
4

8

16

32

64



0

1

2

3

4

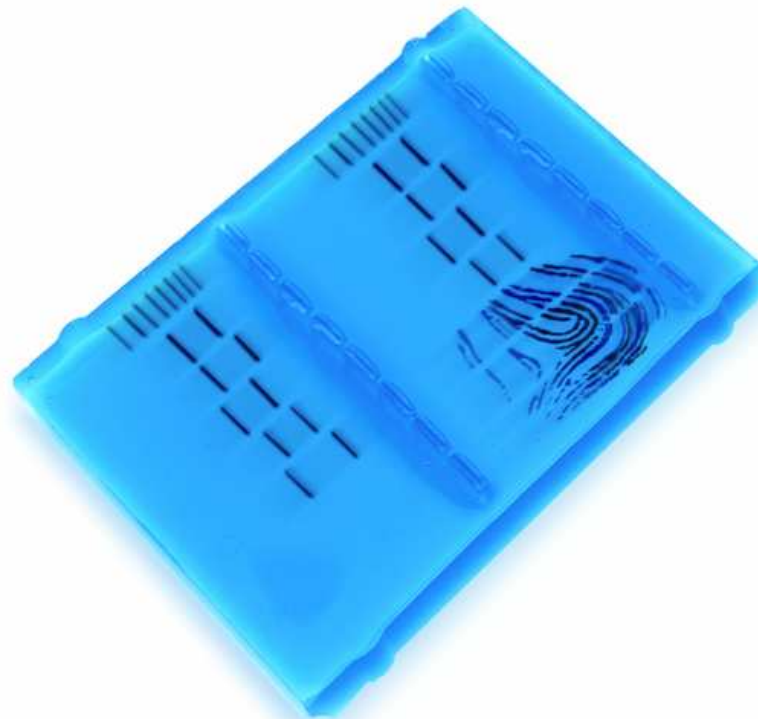
5

6

ciclos

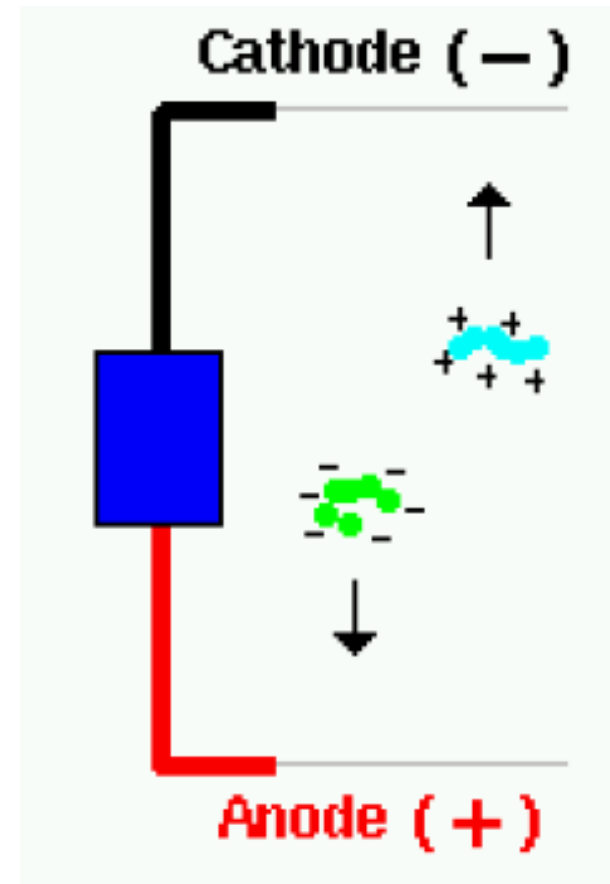
Separación de moléculas de DNA

Electroforésis

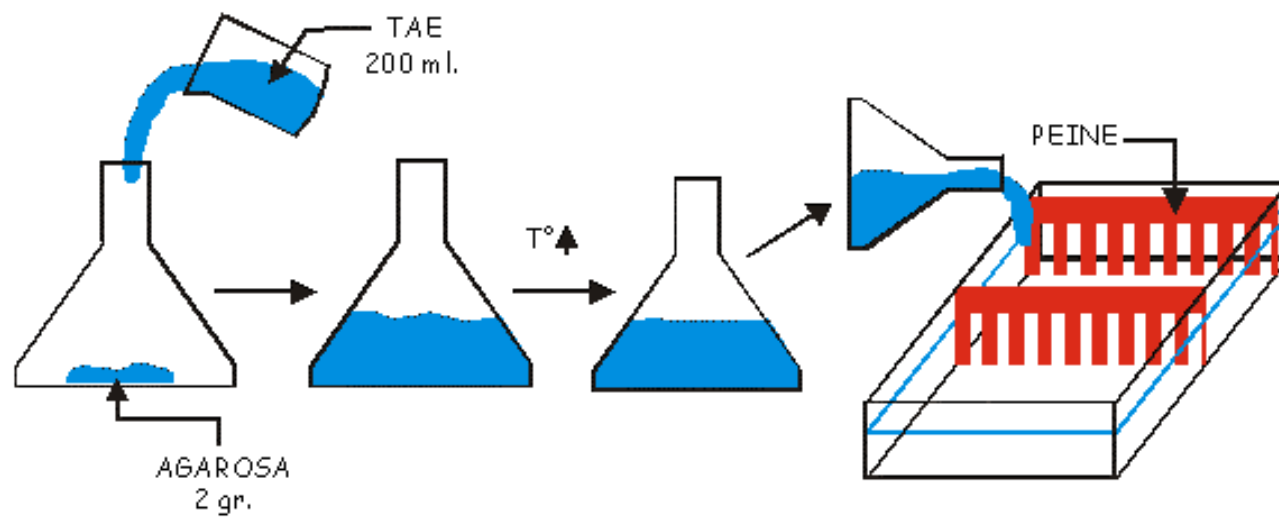


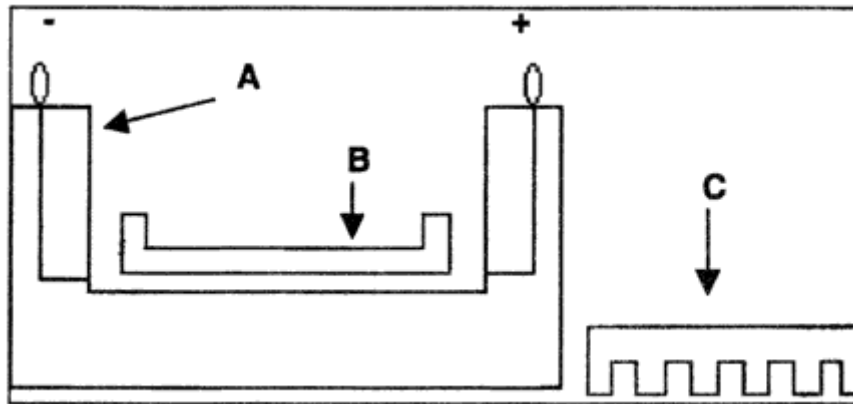
Fundamentos de Electroforesis

- Migración de solutos en un campo eléctrico.
- Se mueven las partículas en base a:
 - Su carga neta.
 - Peso molecular



Preparación del gel



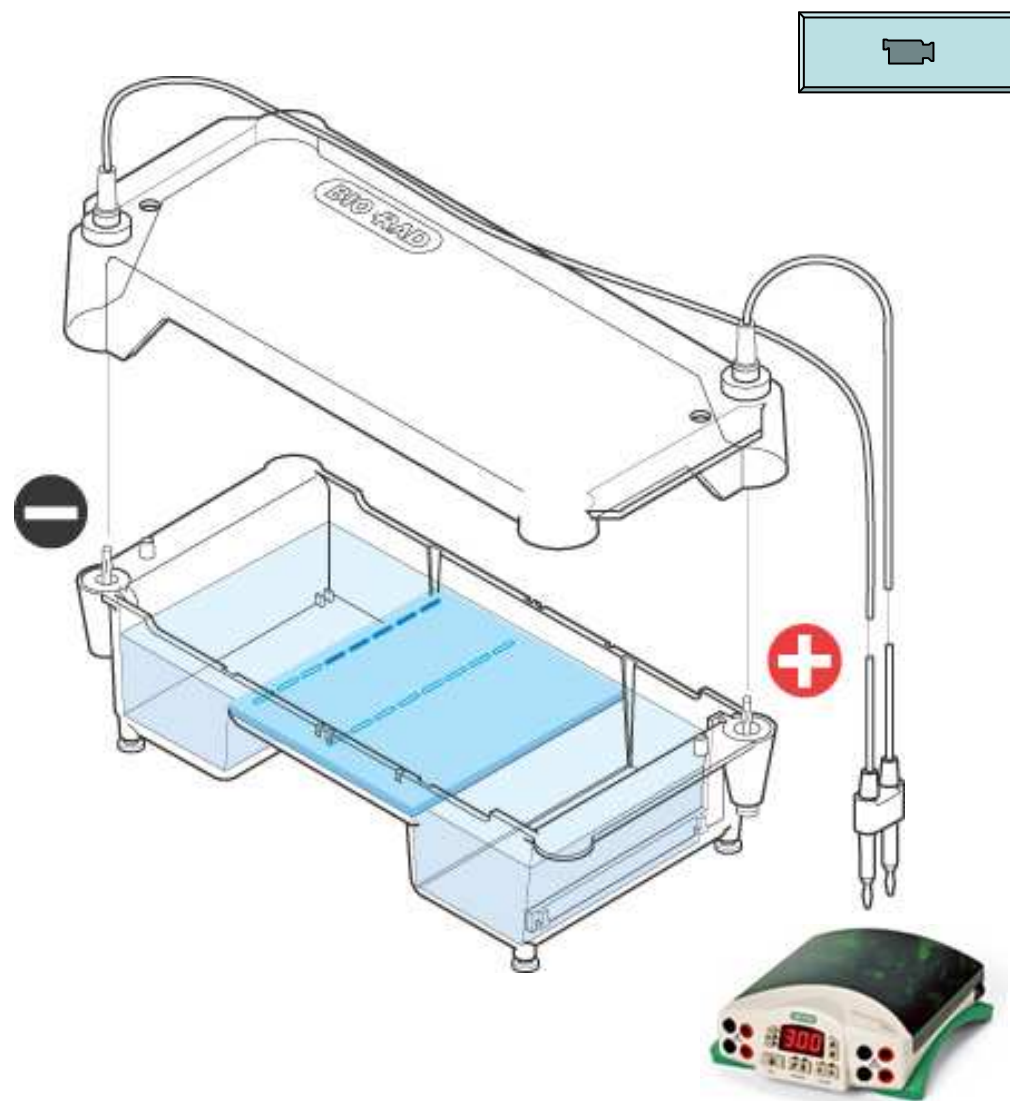


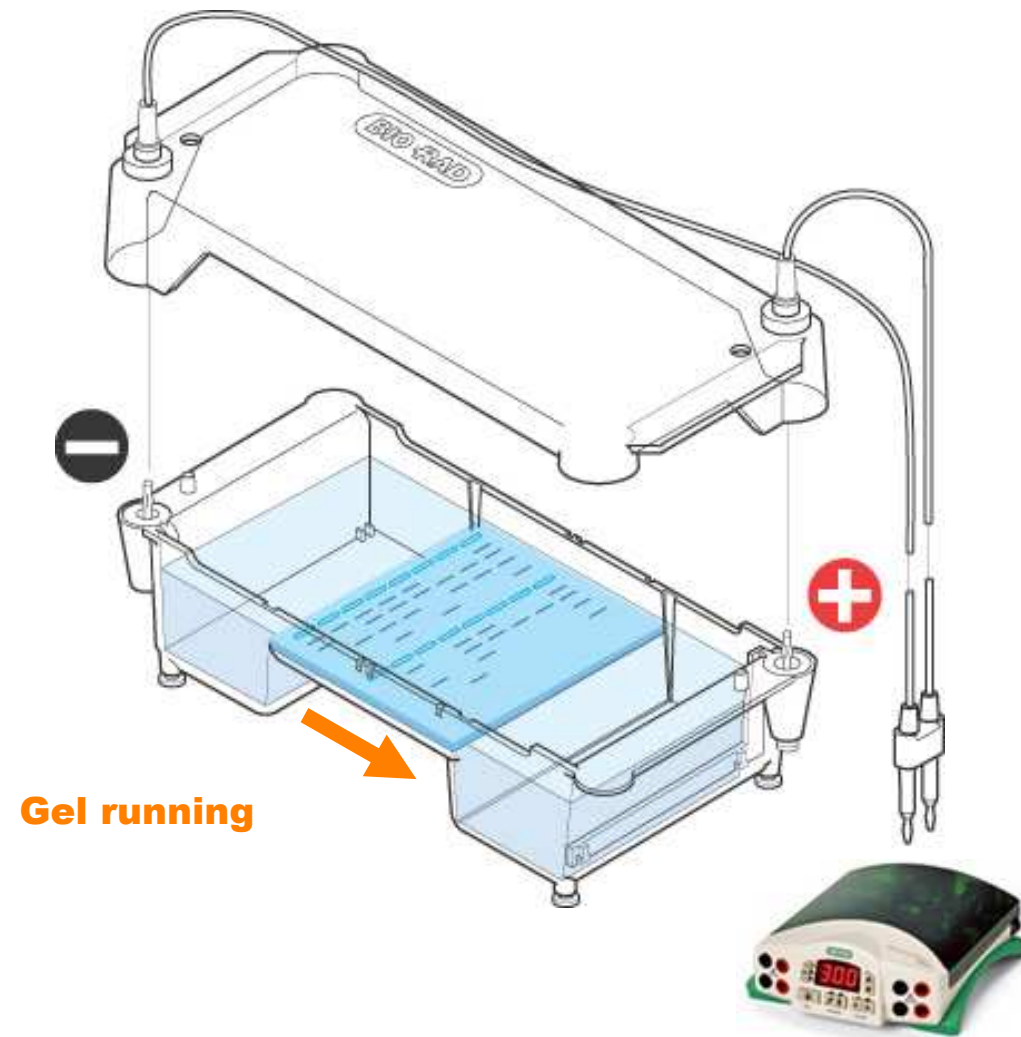
Esquema de una cámara de electroforesis para geles de agarosa. **A.** Contenedor del buffer de corrida. **B.** Molde para elaborar el gel de agarosa. **C.** detalle del peine para la formación de las aberturas

Electroforesis. Buffer de carga

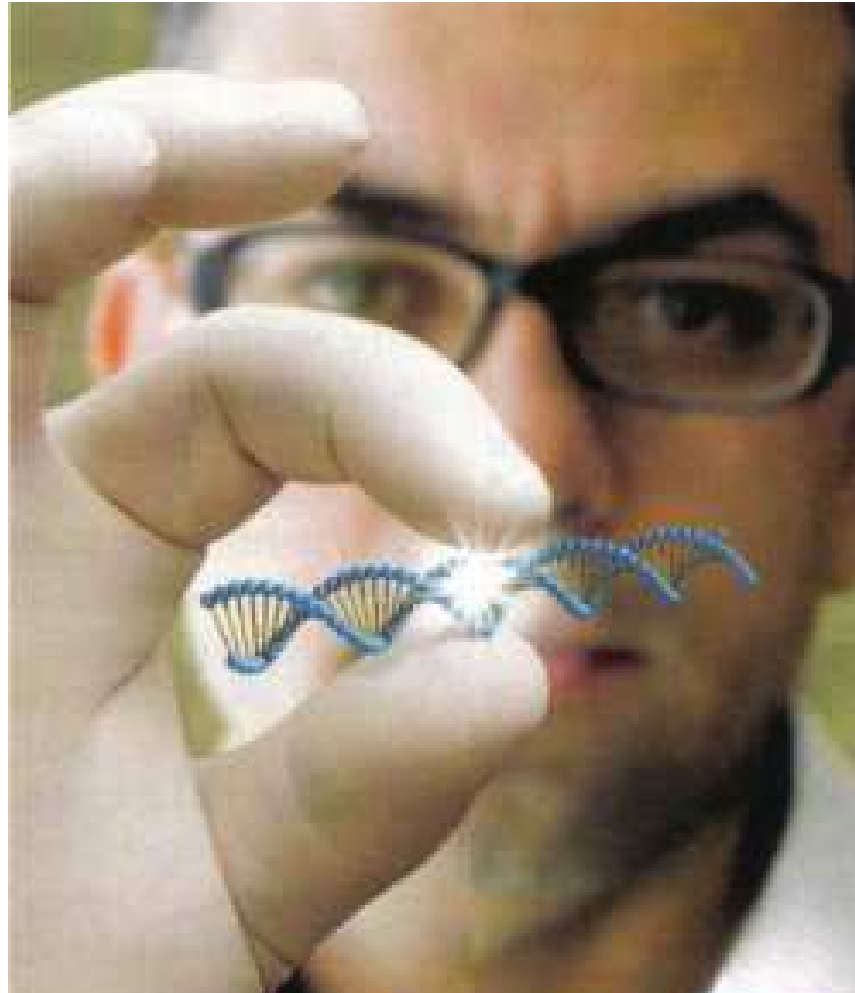
Los buffer de cargas tienen tres propósitos fundamentales:

- **incrementan la densidad de la muestra, aseguran que el ADN baje en forma pareja dentro del pozo.**
- **adicionan color a la muestra, por eso simplifican el proceso de carga.**
- **contienen colorantes, que en un campo eléctrico se mueven hacia el ánodo a una velocidad constante.**



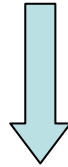


Secuenciación de DNA



Secuenciación de ADN

Para conocer la secuencia nucleotídica exacta de un fragmento de DNA.



Investigación de mutaciones en un gen.

Estudio de regiones regulatorias de genes.

Comparación de secuencias de diferentes especies (estudio de tasas de evolución molecular)

Secuenciación de DNA – Método Enzimático (manual)



Frederick Sanger

Desarrollada en la década del '70 por Sanger.

Logró la secuencia completa de la molécula de insulina.

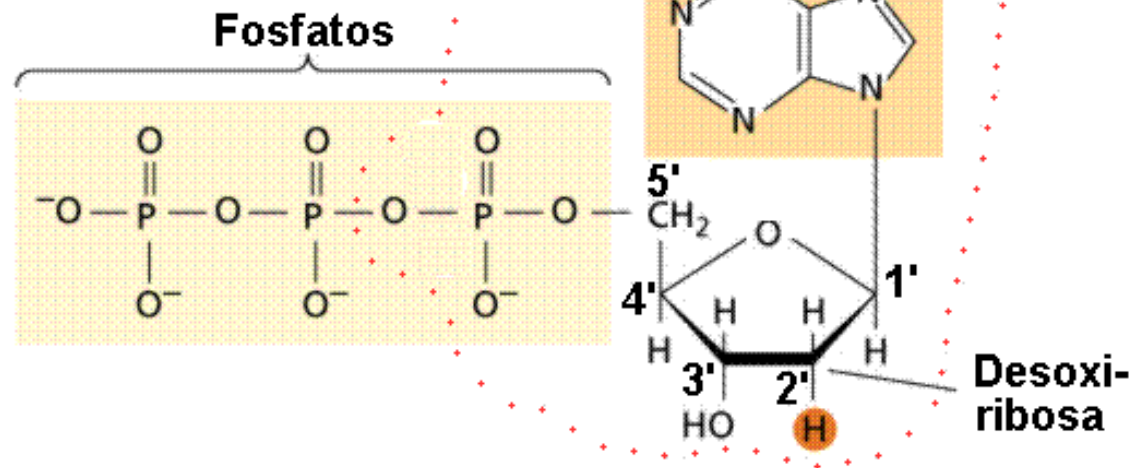
La secuenciación de ADN utilizando el “método didesoxi” de Sanger emplea nucleótidos modificados (didesoxinucleótidos), que no poseen el hidroxilo (OH) en el extremo 3'.

El ADN se sintetiza *in vitro* utilizando un molde de la cadena que se desee secuenciar, un exceso de sustratos nucleótidos desoxi, una pequeña cantidad de didesoxi específico (A, T, C o G), un cebador o *primer* y polimerasa.

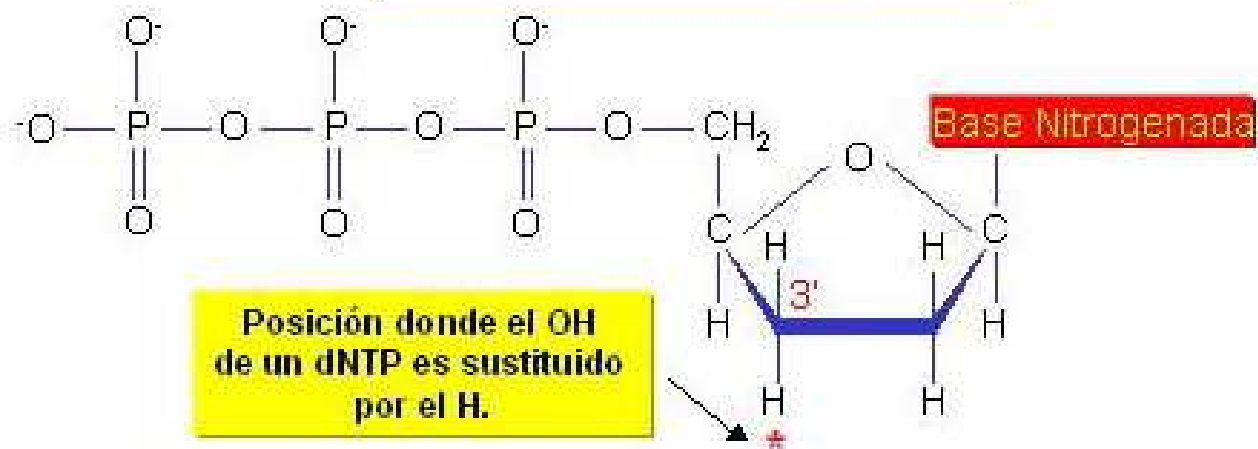
Esquema de un Nucleótido

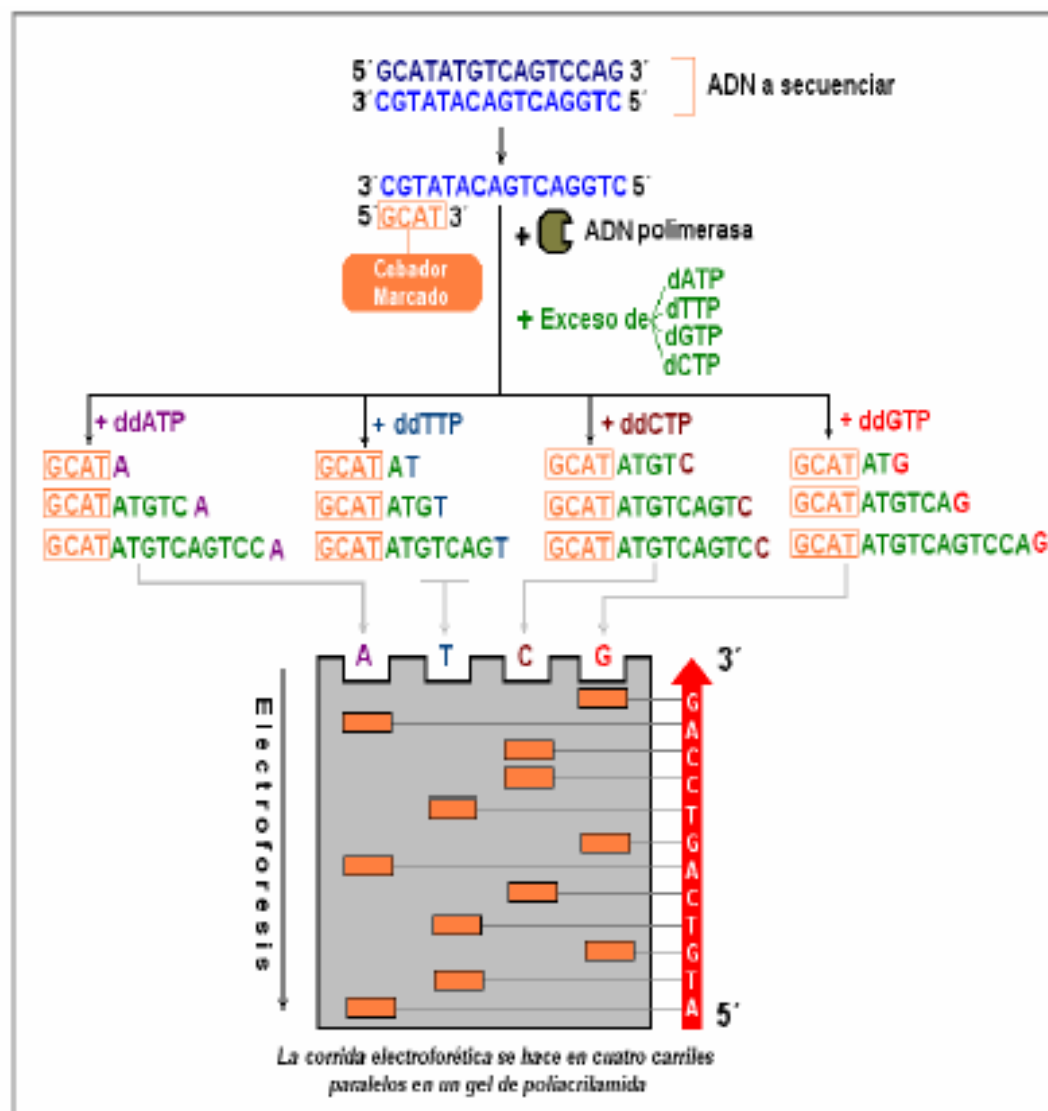
Desoxi ATP
(desoxiadenosina trifosfato)

Nucleótido



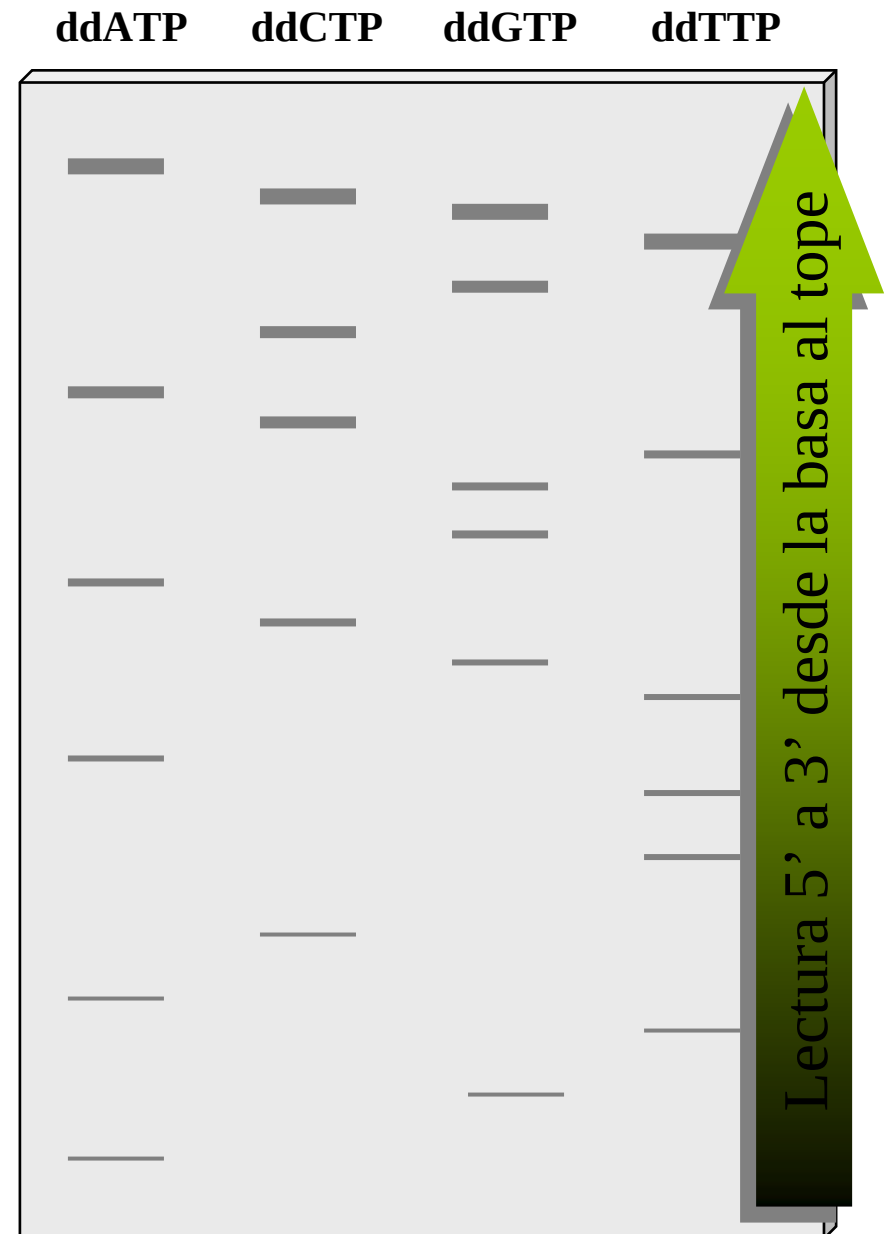
Nucleótido dideoxi (ddNTP)



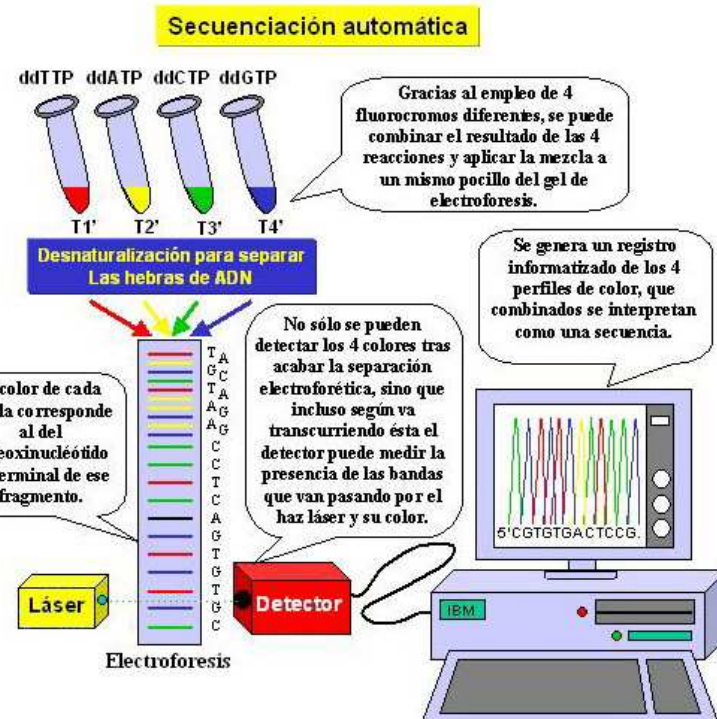
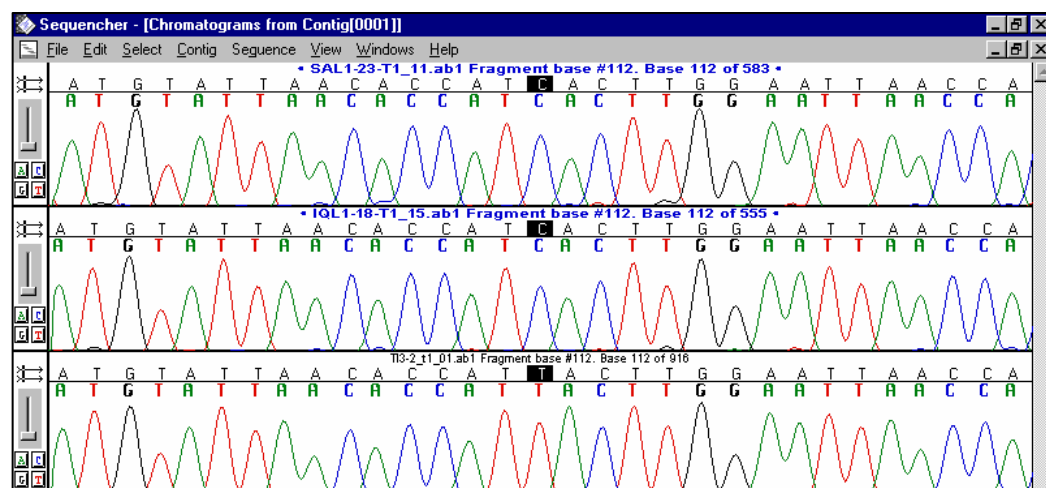


Separación de Fragmentos (Método Sanger)

- Los productos de las 4 reacciones son cargadas en el gel y sometidas a electroforesis.
- Como la polimerización es sólo en dirección 5' a 3', los fragmentos más cortos estarán en 5' y los más largos se encontrarán en la dirección 3'



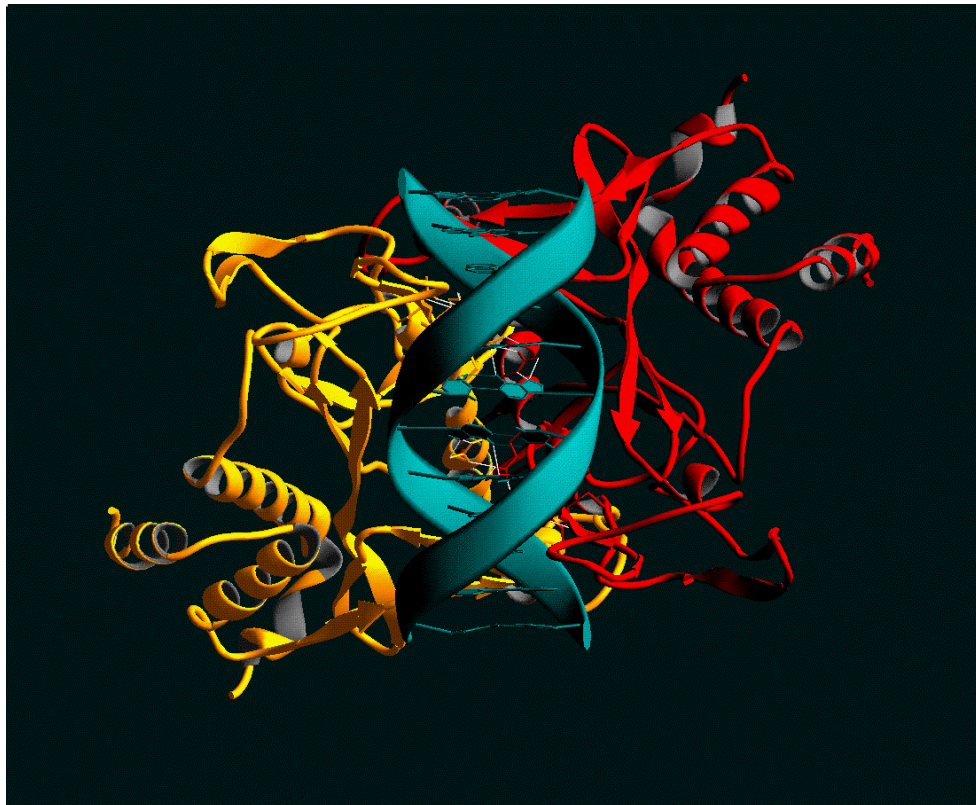
Método automático de secuenciación



sequence10	TAAACACCATTCACCTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATATATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA
sequence12	TAAACACCATTCACCTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATATATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA
sequence9	TAAACACCATTCACCTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATATATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA
sequence5	TAAACACCATTCACCTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATATATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA
sequence8	TAAACACCATTCACCTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATATATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA
sequence4	TAAACACCATTCACCTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATATATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAGTTT
sequence3	TAAACACCATTCACCTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATACATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA
sequence13	TAAACACCATTCACCTTGGAAATTAAACCACTCAGGATATACATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA
sequence1	TAAACACCATTCACCTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATATATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA
sequence6	TAAACACCATTTACTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATATATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA
sequence7	TAAACACCATTTACTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATATATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA
sequence11	TAAACACCATTTACTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATATATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA
sequence2	TAAACACCATTTACTTGGAAATTAAACCACTCAGGGTATATATACCGATATTAACAGTACATCGGCCCAAAATTTA

Endonucleasas o Enzimas de Restricción

- * Enzimas producidas de manera natural por microorganismos para degradar el ADN exógeno.
- * Se unen específicamente a secuencias de ADN de **doble cadena** y la rompen (endonucleasas).



Sistemas de restricción-modificación (M-R)

El sistema de restricción-modificación (M-R) es usado *in vivo* por bacterias para protegerse de ataques de DNA exógenos (normalmente víricos) que ingresen en la bacteria

Restricción: Este sistema le permite a la bacteria protegerse de DNA exógenos para evitar la “promiscuidad” en los intercambios genéticos. Se realiza a través de cortes mediante endonucleasas de restricción a los DNA exógenos que ingresen a la bacteria.

Modificación: Consiste en la introducción de grupos metilo (CH₃-) en determinadas bases dentro de determinadas secuencias del ADN, lo cual está catalizado por una metilasa específica.

Endonucleasas o Enzimas de Restricción

Clasificación:

Tipo I: poseen actividad metilasa y de restricción.

Requieren ATP. Rompen el ADN lejos del sitio que reconocen (>1Kb) de manera aleatoria.

Tipo III: poseen actividad de restricción y modificación (metilación).

Cortan fuera de la Secuencia que reconocen (aprox. 25 pb).
Requieren ATP.

Endonucleasas o Enzimas de Restricción

Tipo II: sólo presentan actividad de restricción.

No son ATP-dependientes. Requieren de iones Mg^{2+}

Reconocen secuencias **palindrómicas** específicas de ADN (de 4 a 12 bp).

El punto de rotura es **característico** para cada enzima → fragmentos **discretos**.

Generan extremos romos o cohesivos (escalonados, pegajosos)

Nomenclatura

Nombre relacionado al origen bacteriano.

Nomenclatura Ejemplo

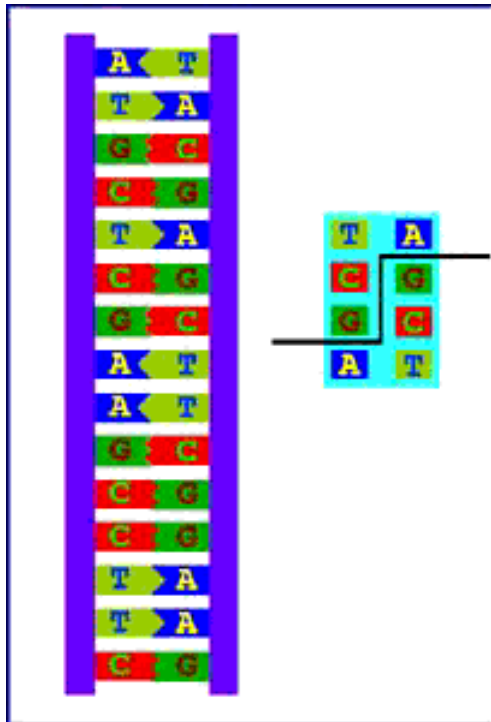
Corresponde a:

E	<i>Escherichia</i>	Género de la bacteria
co	<i>coli</i>	Especie de la bacteria
R	RY13	Cepa de la bacteria
I	La primera enzima identificada	Orden de identificación de la enzima en la bacteria

Ejemplo: Smal, *Serratia marcescens*

Sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción mas representativas

Enzyme ^a	Source	Recognition site ^b
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	GGATCC
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY13	GAATTC
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC
<i>Hin</i> dIII	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	AAGCTT
<i>Hpa</i> I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	GTTAAC
<i>Hpa</i> II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	CCGG
<i>Mbo</i> I	<i>Moraxella bovis</i>	GATC
<i>Not</i> I	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GCGGCCGC
<i>Sfi</i> I	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	GGCCNNNNNGGCC
<i>Taq</i> I	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA



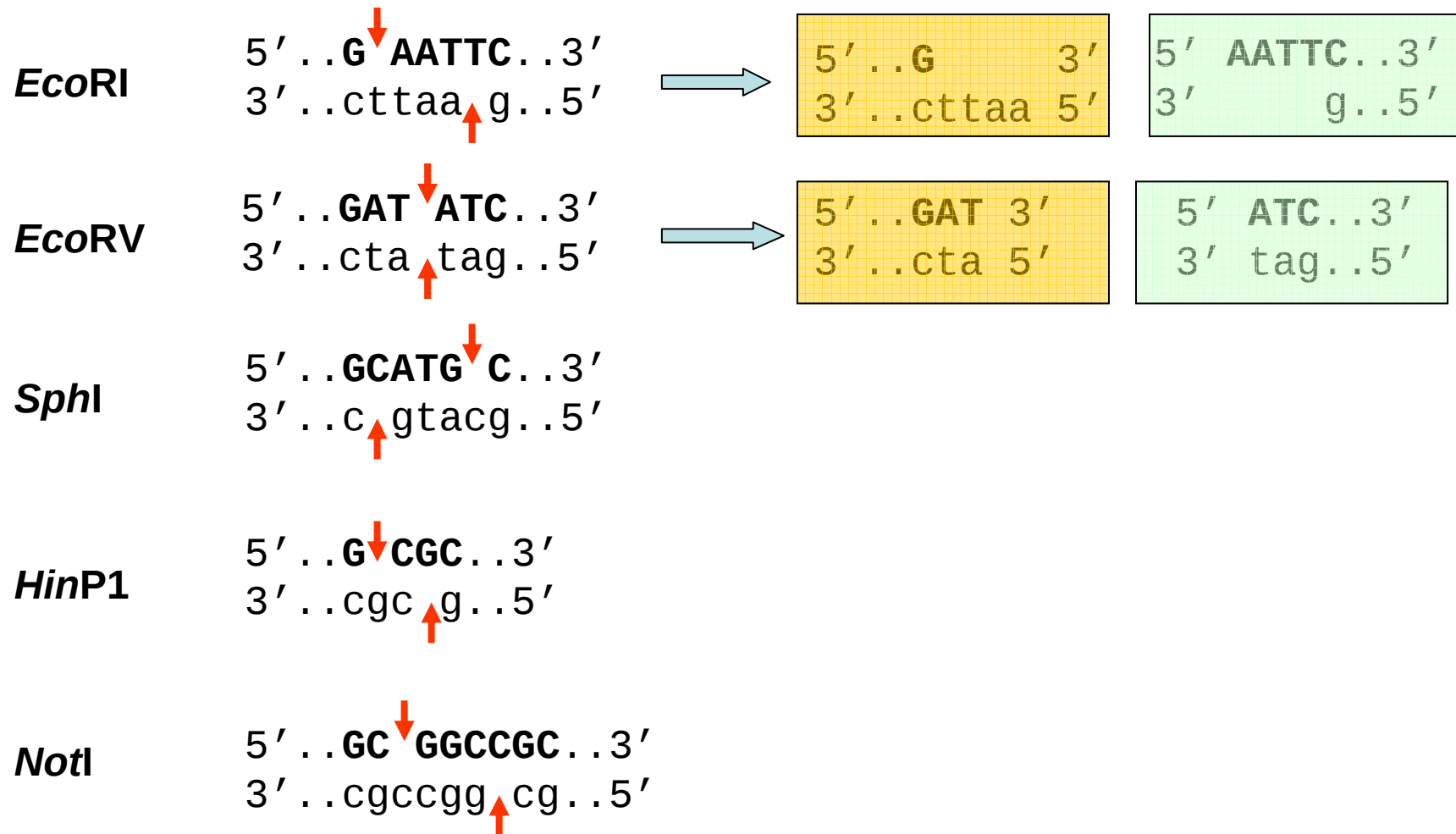
G|AATTC
CTTAAG|

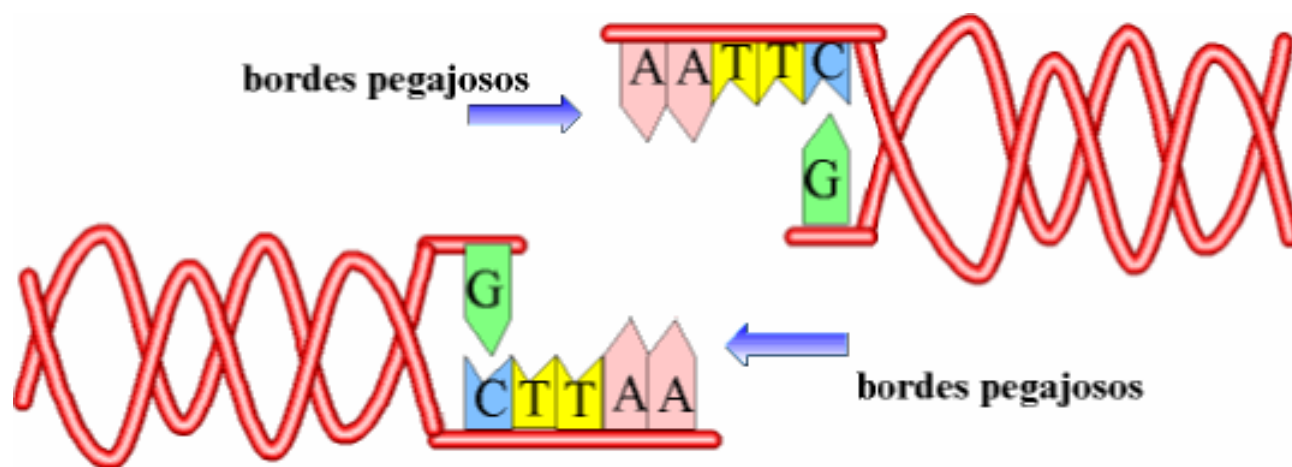
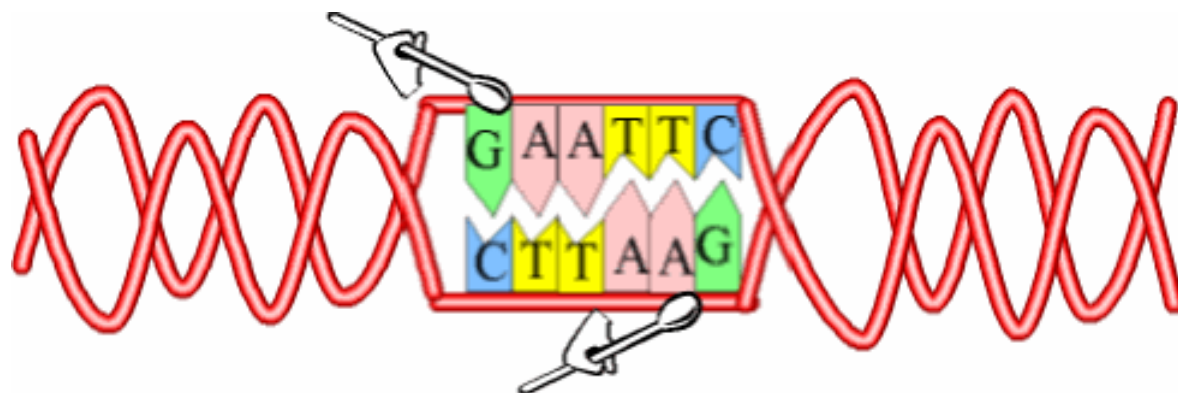
Corte de EcoRI dejando extremos cohesivos.

CCCGGG
GGGCCC

Restricción de SmaI dejando extremos romos.

Endonucleasas de restricción (Tipo II)





MARCADORES DE SELECCIÓN (MAS)

Es una combinación de genética tradicional y Biología molecular. MAS permite la selección de genes que controlan caracteres de interés, como color, calidad de la carne y resistencia a enfermedades

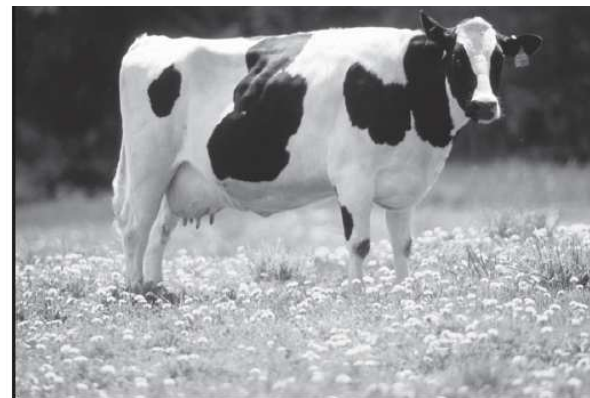
Estudio de caso: Sire Osborndale Ivanhoe: Deficiencia de adhesión leucocitaria bovina (BLAD)

5

	B	b
B	BB	Bb
b	Bb	bb

Bb: individuo portador

bb: Individuo afectado



A Holstein dairy cow. Keith Weller, ARS-USDA

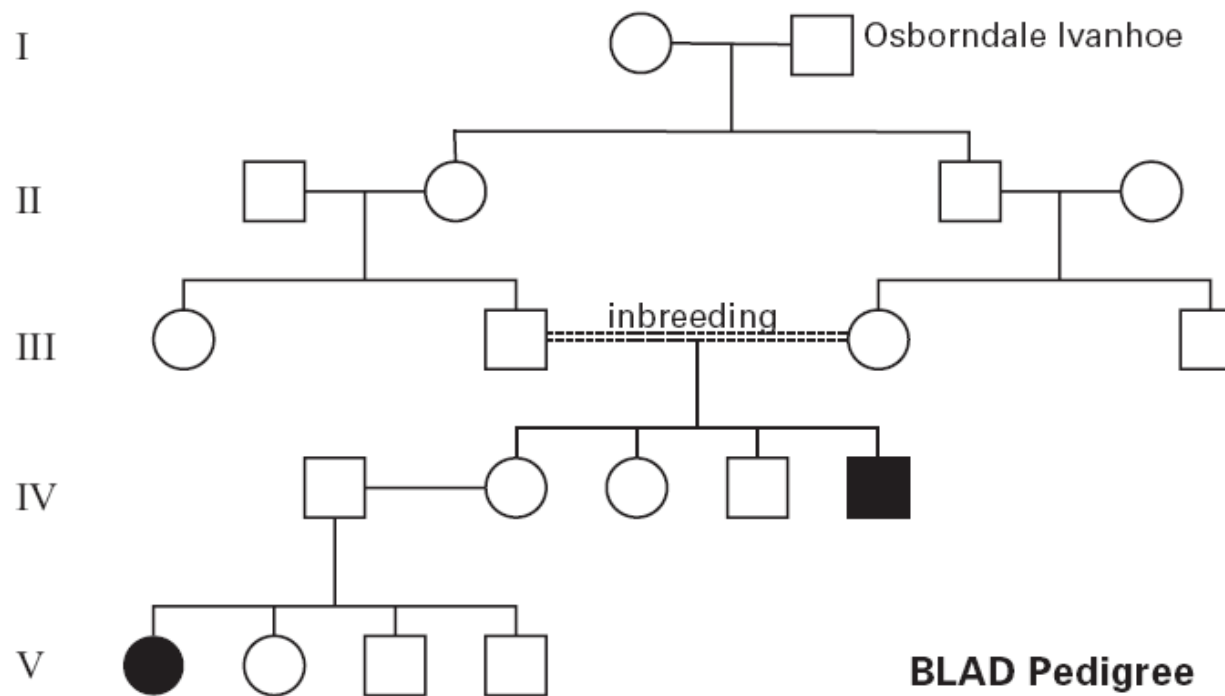


Figure 6

Protein Synthesis from the Normal CD18 Gene

DNA Strand 5' ...ggc tac ccc atc **gac** ctg tac tac ctg ... 3'

Amino Acids ...gly tyr pro lle **asp** leu tyr try leu ...

Protein Synthesis from the BLAD Mutation CD18 Gene

DNA Strand 5' ...ggc tac ccc atc **ggc** ctg tac tac ctg ... 3'

Amino Acids ...gly tyr pro lle **gly** leu tyr try leu ...

When the nucleotide adenine (a) is replaced by guanine (g) in the DNA strand, the amino acid glycine (**gly**) is produced instead of the correct amino acid aspartic acid (**asp**). The result is the BLAD condition in cattle.

Normal: 32 and 26 bp segments produced

5'gtgaccttccggagggccaagggctaccccat / **cg**acctgtactacctgatggacctct 3'

Figure 7 shows the DNA fragments produced by normal cattle, heterozygous BLAD carriers, and homozygous BLAD affected cattle when their DNA is mixed with the *Taq*1 enzyme. The enzyme recognizes the **tcga** sequence and cuts (**t / cga**) between the **t** and **c** nucleotides. When guanine (**g**) replaces adenine (**a**), the **tcga** sequence is replaced by **tcgg** and the enzyme does not cut the strand.

BLAD Affected: 58 bp segment produced

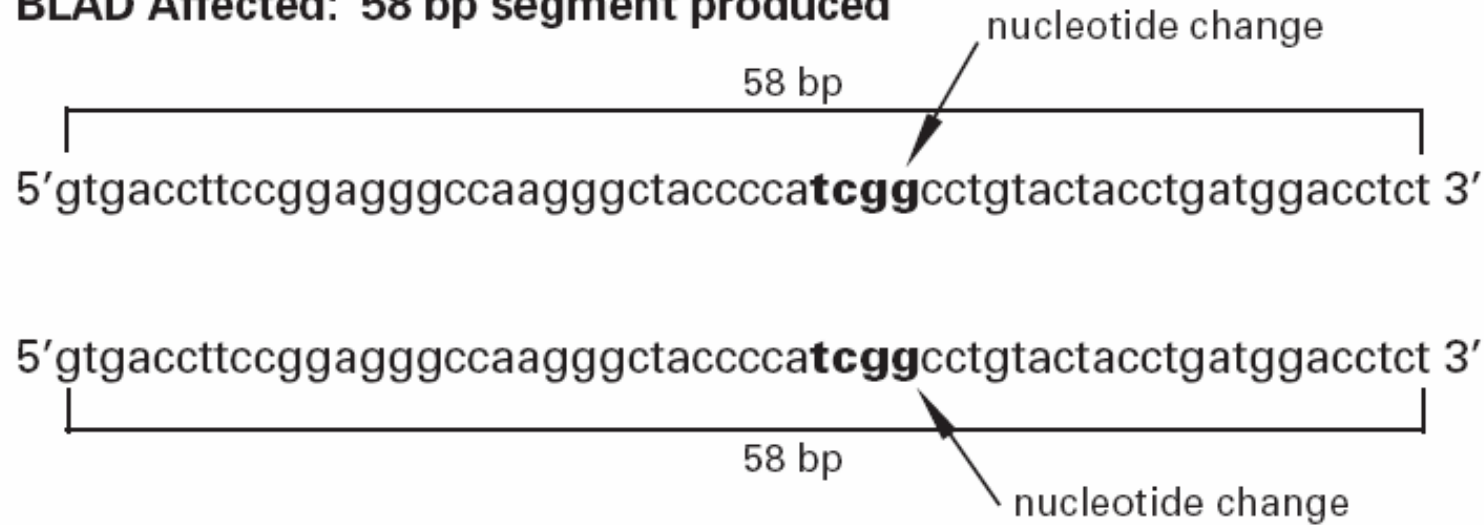
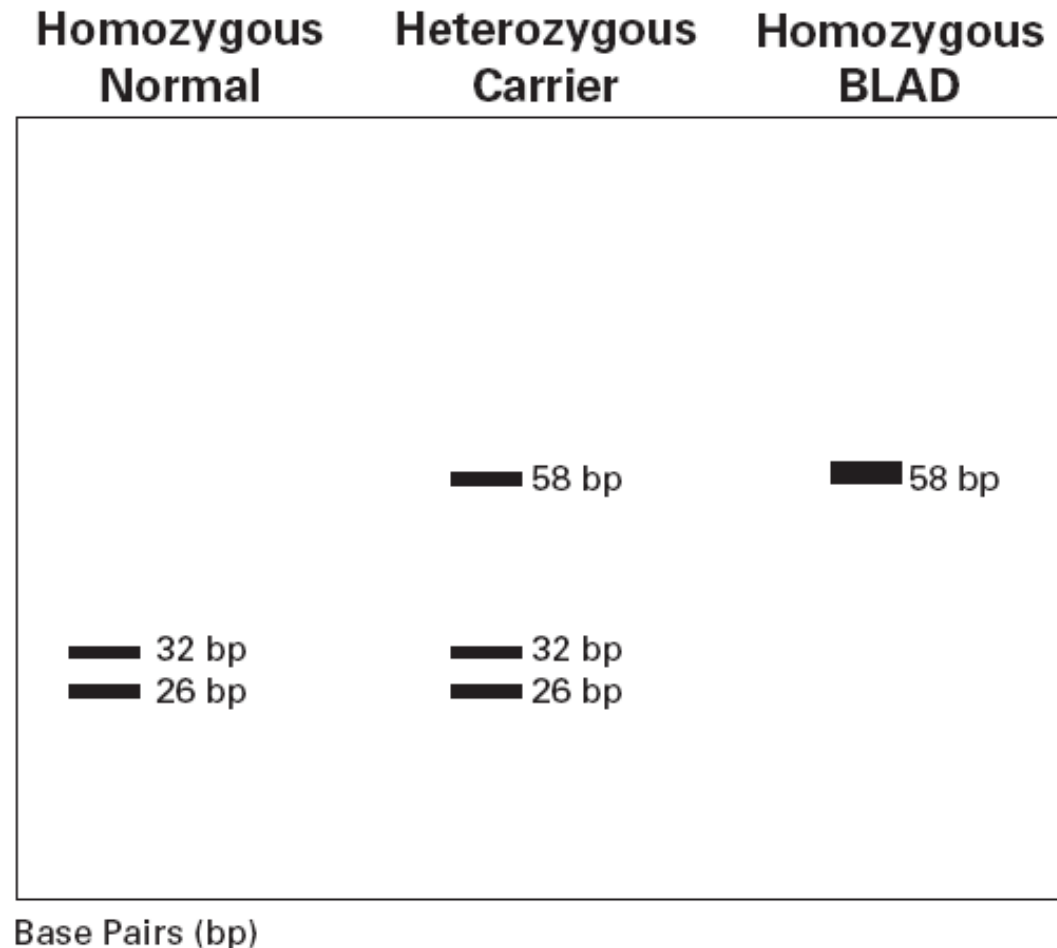


Figure 7 shows the DNA fragments produced by normal cattle, heterozygous BLAD carriers, and homozygous BLAD affected cattle when their DNA is mixed with the *Taq1* enzyme. The enzyme recognizes the **tcga** sequence and cuts (**t / cga**) between the **t** and **c** nucleotides. When guanine (**g**) replaces adenine (**a**), the **tcga** sequence is replaced by **tcgg** and the enzyme does not cut the strand.

Agarose Gel of BLAD PCR Product Digested with *Taq*1



The BLAD mutation results in the loss of the *Taq*I restriction site. See Figure 7. A normal cow will display two fragments, 26 and 32 bp. A carrier will display three fragments, 26, 32, and 58 bp. A BLAD infected animal has only a single fragment of 58 bp. *Based on a gel photo provided by Marcus E. Kehrli, Jr., DVM, PhD, National Animal Disease Center, USDA-ARS.*