

## IDENTIFICACIÓN DEL SEXO A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DE DIFERENTE ORIGEN MEDIANTE AMPLIFICACIÓN SELECTIVA DE ADN Y POSTERIOR ANÁLISIS DE RFLPs<sup>1</sup>

**M. Villalta Martín<sup>2</sup>**

**J.L. Alabart Álvarez**

**J. Folch Pera**

Unidad de Tecnología de la Producción Animal  
Servicio de Investigación Agraria  
Diputación General de Aragón  
Apdo. 727.  
50.080 Zaragoza (España)

### RESUMEN

Una de las principales limitaciones para la tipificación genética de individuos es la cantidad de ADN presente en la muestra biológica de partida, así como su estado de conservación. En el presente trabajo se compara la eficiencia de diferentes métodos para la extracción de ADN a partir de muestras biológicas de diferente origen y en diferente estado de conservación. La metodología que se describe posibilita la caracterización genética de individuos mediante tecnología PCR ("Polimerase Chain Reaction") a partir de muestras biológicas limitantes o no en contenido de ADN: sangre, tejidos, células bucales y pelos. Asimismo, se ha realizado un estudio del impacto del agente conservante utilizado (etanol o formol) sobre la integridad del ADN de muestras biológicas archivadas procedentes de museos e institutos anatómo-patológicos, y en última instancia, su aptitud para el análisis.

El ejemplo particular que presentamos es la identificación del sexo mediante la amplificación de los loci ZFX/ZFY y posterior análisis de RFLPs ("Restriction Fragment Length Polimorphisms") en diferentes mamíferos. Sin embargo, esta técnica de sexaje a veces presenta problemas para el diagnóstico del sexo en rumiantes, por lo que es frecuente incurrir en una falsa asignación del sexo. Para mejorar la precisión de esta técnica hemos introducido un "control interno" en el análisis de RFLPs que proporciona un inequívoco diagnóstico del sexo: el vector plasmídico pUC18.

**Palabras clave:** PCR, ZFX/ZFY, sexaje, sangre, tejidos, células bucales, pelos y pUC18.

### SUMMARY

DNA TYPING OF INDIVIDUALS BY USING DIFFERENT BIOLOGICAL SPECIMENS: SEX DIAGNOSIS VIA SELECTIVE DNA AMPLIFICATION AND RFLPs ANALYSIS

Nucleic acids content or integrity in biological samples constitute an important limiting factor for DNA typing technology. In the present work, several procedures are

---

1. Trabajo financiado con proyecto INIA (SC94-073)

2. Correspondencia dirigida

tested for the extraction and purification of DNA from different biological sources at different stages of preservation. The methodology we describe allows PCR-based DNA typing from an assorted range of biological specimens: blood, tissues, buccal cells and follicle hairs. We also have analysed the impact of the preservation method, ethanol or formalin fixation, on DNA integrity from collected archival materials and hence the suitability for genetic surveys.

The particular example we show refers to sex identification in different mammals by using selective amplification of the ZFX/ZFY loci and subsequent RFLPs analysis. However, this technique sometimes presents problems for sex diagnosis in ruminant species. To improve the accuracy of this sex identification method, we have implemented the technique with an appropriate control in the RFLPs analysis that ensures a correct sex assignment: the pUC18 plasmid.

**Key Words:** PCR, ZFX/ZFY, sexing, blood, tissues, buccal cells, hairs and pUC18.

### Introducción

El interés por la tipificación genética de individuos mediante técnicas de genética molecular es cada día más creciente en áreas como las Ciencias Biomédicas, Ciencias Agrarias y Medio Ambiente, debido al impacto que ésta puede tener en aspectos sanitarios, económicos, así como en el mantenimiento de una biodiversidad global. Esta tecnología se ha visto revolucionada mediante la utilización de la técnica de amplificación selectiva de ADN o PCR ("Polymerase Chain Reaction") en campos aplicativos de la ciencia de lo más diverso: Diagnóstico y pronóstico clínico (PERUCHO, 1994; MAHBUBANI y BEJ, 1994; MASSARI *et al.*, 1996; ARRIGO, 1994; D'AURIOL y SIGAUX, 1994), producción y mejora genética animal y vegetal (HETZEL, 1993; MONTGOMERY *et al.*, 1993), diagnóstico forense (BUDOWLE *et al.*, 1994) y conservación de especies en vías de extinción (ARNHEIM *et al.*, 1990; HEDRICK y MILLER, 1992; EHRlich y WILSON, 1991).

Sin embargo, una de las principales limitaciones que esta tecnología presenta es la cantidad de ADN presente en la muestra

biológica de partida, así como su estado de conservación. En el presente trabajo se compara la eficiencia de diferentes métodos de extracción de ADN a partir de muestras biológicas muy diversas que nos permiten llevar a cabo estudios genéticos mediante amplificación selectiva de ADN (PCR) y posterior caracterización con enzimas de restricción (RFLPs). Por consiguiente, nuestro objetivo es disponer de una metodología analítica adaptada a las características de la muestra biológica de partida (sangre, tejidos, células bucales y pelos). Asimismo, se ha hecho un estudio del impacto de algunos métodos de preservación (congelación, etanol y formol) sobre la integridad del ADN de muestras biológicas archivadas, y en consecuencia, su aptitud o no para análisis genéticos utilizando esta tecnología.

Para la validación de los diferentes métodos de extracción de ADN, así como el origen y preservación de las muestras, se ha utilizado la técnica de amplificación selectiva de ADN (PCR) al ser esta reacción enzimática muy vulnerable a la presencia de inhibidores que suelen contaminar las preparaciones de ADN. El ejemplo particular que presentamos es la identificación del

sexo en individuos mediante amplificación de un dominio funcional conservado en mamíferos, "zinc finger domain" (PAGE *et al.*, 1987; SCHENEIDER-GADICKE *et al.*, 1989; PALMER *et al.*, 1989), de los genes ZFX y ZFY localizados en los cromosomas X e Y, respectivamente. La posterior caracterización del producto amplificado con enzimas de restricción producirá un polimorfismo que identificará el sexo (RFLPs) (AASEN y MEDRANO, 1990).

La figura 1 muestra las secuencias nucleotídicas de los loci ZFX (a) y ZFY (b) amplificados por PCR en la especie humana. Asimismo, la figura ilustra el modo en que los oligonucleótidos iniciadores o "primers" (P1-5EZ y P2-3EZ) se aparean con sus secuencias complementarias del ADN molde "desnaturalizado" para que el enzima Taq ADN polimerasa I produzca su extensión en dirección 5'→3'. La secuencia de los "primers" (caja negra en la figura) aparece alineada con su secuencia complementaria en la cadena de ADN molde respectiva.

Utilizando un programa de manipulación de secuencias nucleotídicas se han comparado las secuencias de ADN de los fragmentos ZFY y ZFX amplificados en la especie humana (figura 1 a y b). De 447 pares de bases (pb) alineadas aparecen 25 nucleótidos diferentes, lo que da una homología entre ambas secuencias muy elevada (94.4 %). Los nucleótidos que difieren aparecen marcados en la secuencia amplificada ZFX con un asterisco grande (figura 1a). Hay que destacar que estas diferencias en la composición nucleotídica serán las responsables del polimorfismo que identifique el sexo. Así por ejemplo, el nucleótido en posición 129 del locus ZFY (figura 1b) es un residuo G (guanina), que con sus bases contextuales 5'-GGCC-3', determinan un sitio de reconocimiento para el enzima de restricción Hae III. Por el contrario, este residuo en la

misma posición del locus ZFX (figura 1a) está sustituido por una adenina (A), y por consiguiente, la secuencia 5'-AGCC-3' ya no es "diana" de la endonucleasa Hae III, desapareciendo por tanto este sitio de corte. Este polimorfismo generado por la diferente longitud de los fragmentos resultantes de la digestión de los loci ZFX/ZFY amplificados con el enzima de restricción Hae III es lo que se denomina RFLPs o "Restriction Fragment Length Polymorfisms". Por tanto, este enzima de restricción puede ser de utilidad para el diagnóstico del sexo en la especie humana (AASEN y MEDRANO, 1990).

En el caso de pequeños rumiantes, especies ovina y caprina, la identificación del sexo se puede llevar a cabo con el enzima Sac I que reconoce y corta la secuencia 5'-GAGCTC-3' presente únicamente en el locus ZFX de estas especies. Por el contrario, para el sexaje en la especie bovina se debe utilizar el enzima de restricción Pst I que reconoce y corta la secuencia 5'-CTG-CAG-3' del locus ZFY bovino (AASEN y MEDRANO, 1990). Es interesante destacar que en la especie humana el enzima Sac I también produce un polimorfismo que identifica el sexo (locus ZFX); por el contrario, Pst I no lo produce al digerir ambos loci, ZFX y ZFY, en la misma posición (figura 1 a y b).

A pesar de la amplia difusión de esta metodología para el sexaje (AASEN y MEDRANO O, 1990; POLLEVICK *et al.*, 1992), esta técnica produce muchas veces una incorrecta asignación del sexo en especies rumiantes debido a la incompleta o nula actividad del enzima de restricción utilizado en el análisis de RFLPs (ABROL *et al.*, 1993). Así por ejemplo, la digestión parcial del locus ZFX en hembras (ZFX/ZFX) de las especies ovina y caprina con el enzima de restricción Sac I induce a una falsa asignación del sexo, machos en lugar de hem-



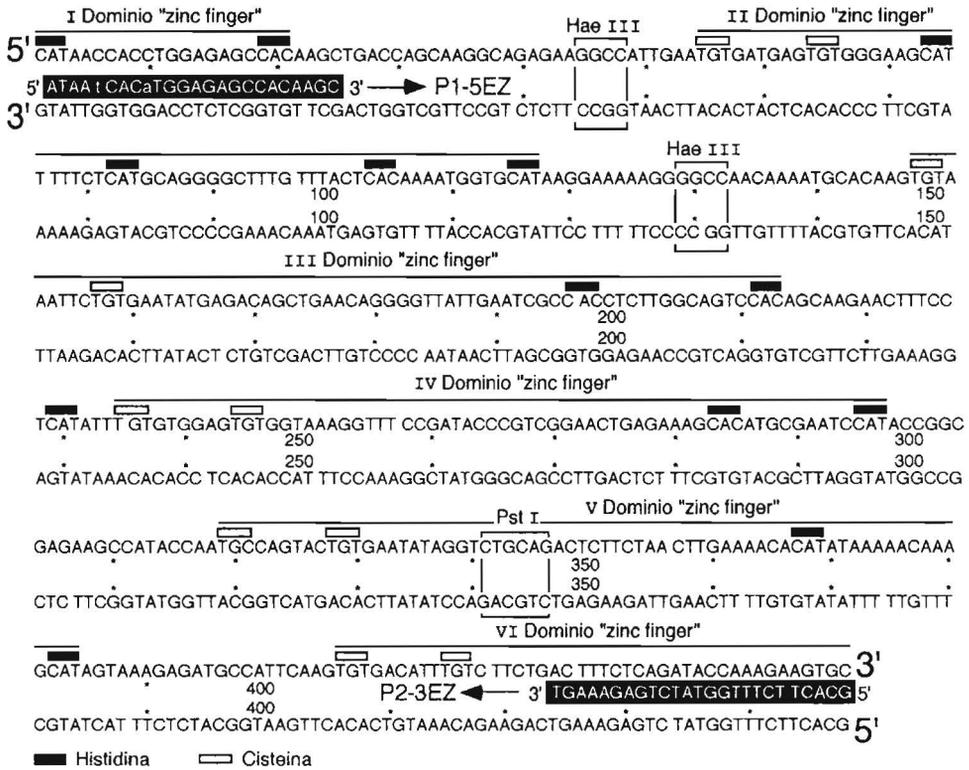


Figura 1 b. Secuencia nucleotídica del fragmento ZFY humano amplificado (447 pb). Nucleotide sequence of the human ZFY amplified fragment (447 bp). En la secuencia se indican los trinucleótidos o "codones" que especifican los aminoácidos histidina y cisteína que participan en la formación del dominio "zinc finger" (barra negra) involucrado en la actividad transcripcional de estos genes. El posicionamiento de estos dominios, aunque no aparece en la figura 1a, es el mismo. También se muestran los sitios de restricción para los enzimas Hae III y Pst I, así como los "primers" (caja negra) que dirigen la amplificación.

enzima; líneas 2 y 3, pUC18 abierto con los enzimas Pst I y Sac I, respectivamente). Asimismo, la presencia de ambas conformaciones del plásmido en el perfil electroforético, abierta y cerrada (ccc), será indicativo de una digestión incompleta con el enzima de restricción.

En la actualidad, estamos utilizando esta tecnología (PCR/RFLPs) para llevar a cabo estudios de genética poblacional en una especie en peligro de extinción en nuestra

Comunidad Autónoma: "el bucardo" o cabra montés del Pirineo (*Capra pyrenaica pyrenaica*). En concreto, estamos realizando el sexaje (loci ZFX/ZFY) e identificación de las diferentes subespecies de cabra montés (ADN mitocondrial) a partir de pelos recogidos en su hábitat natural (Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido) o procedentes de museos etnológicos, para la realización de un estudio demográfico y filogenético.

## Material y métodos

### Muestras biológicas

Como muestras biológicas no limitantes en contenido de ADN, se ha elegido sangre periférica recogida con anticoagulante (EDTA) de las especies humana (*Homo sapiens*), bovina (*Bos taurus*: Parda Alpina), ovina (*Ovis aries*: Rasa Aragonesa) y caprina (*Capra hircus*: Blanca Celtibérica). En el caso de tejidos congelados se utilizó hígado de cabra doméstica (Blanca Celtibérica), y para tejidos conservados en etanol, un testículo de perro (*Canis familiaris*: Braco). Finalmente, para tejidos conservados en formol utilizamos hígado de íbice alpino (*Capra ibex*).

Las muestras biológicas limitantes en cantidad de ADN de origen humano (hombre) fueron células bucales obtenidas por frotis, así como la raíz de pelos de la cabeza o ceja.

Para el aislamiento de ADN bacteriano, se han utilizado 10 ml de cultivo en fase de crecimiento exponencial de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  en medio LB (Sigma).

### Extracción de ADN a partir de sangre

A) Preparación de ADN (10 ml de sangre)

Para ello, se utilizó un procedimiento clásico de digestión celular con proteinasa K y posterior extracción de ADN con fenol-cloroformo (SAMBROOK *et al.*, 1989). La cuantificación del ADN aislado se llevó a cabo por espectrofotometría UV (ultravioleta) (260 nm). Finalmente, se hizo un control de la integridad del mismo mediante electroforesis y se utilizó ADN de fago  $\lambda$  (48.5 Kb o kilobases) (Promega), sin cortar o

digerido con el enzima de restricción BstE II (*Bacillus stearothermophilus* E), como marcador de pesos moleculares, que a su vez, serviría como método de cuantificación visual del ADN cargado en el gel.

B) Preparación "rápida" de ADN (5-20  $\mu$ l de sangre)

La obtención de ADN a partir de microgotas de sangre se llevó a cabo utilizando el método rápido de la resina de intercambio iónico "Chelex-100" (figura 2) (WALSH *et al.*, 1991; DE LAMBALLERIE *et al.*, 1992).

### Extracción de ADN a partir de tejidos

El procedimiento que se utilizó para la extracción de ADN a partir de tejidos frescos, congelados o conservados (etanol y formol), es una ligera modificación al protocolo inicialmente referido de lisis celular con proteinasa K y extracción de ADN con fenol-cloroformo. La modificación consistió en la homogeneización del tejido en presencia de nitrógeno líquido (HOELZEL y GREEN, 1992). Asimismo, el ADN obtenido fue cuantificado y su integridad inspeccionada por electroforesis (SAMBROOK *et al.*, 1989).

### Métodos NO invasivos de obtención de ADN.

A) Extracción de ADN partir de células bucales (escobillón o "cytobrush")

Para la obtención de ADN extraído a partir de células bucales se ha utilizado el método del "Chelex-100" (WALSH *et al.*, 1991). Para ello, se obtuvieron células epiteliales de la boca mediante frotis con un escobillón estéril en la cavidad bucal. A continuación, el material recogido se depositó en un tubo Eppendorf con 0.5 ml de

## Preparación de ADN: Chelex-100

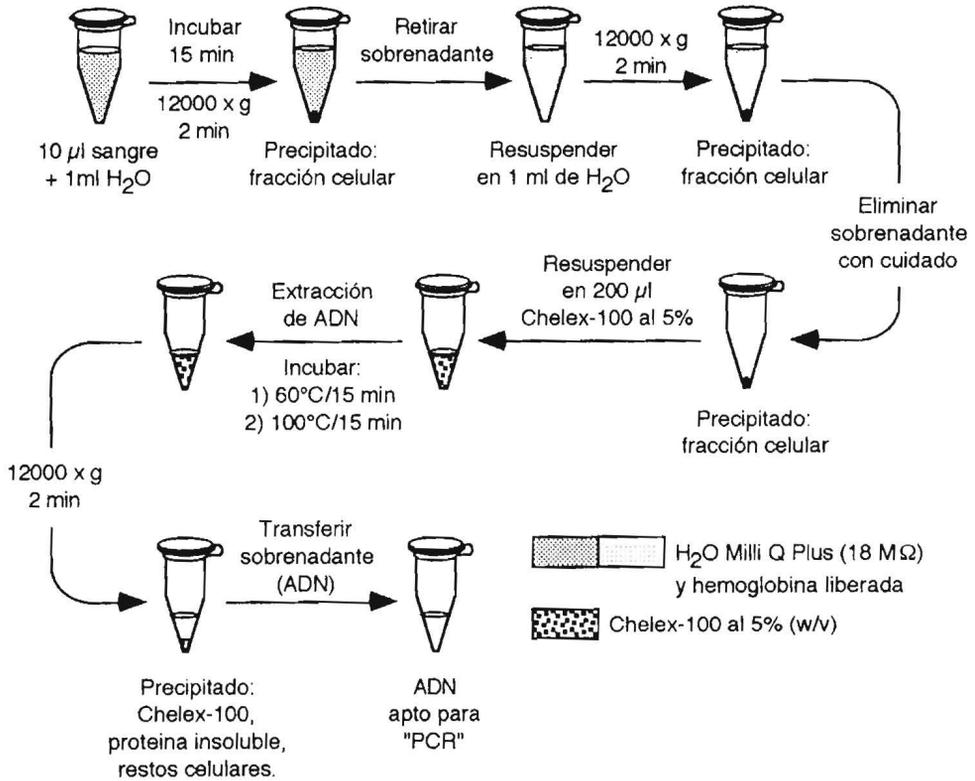


Figura 2. Esquema del procedimiento de extracción de ADN a partir de una microgota de sangre (10 µl) utilizando la resina de intercambio iónico Chelex-100. Diagram showing the Chelex-100 ion exchange resin method to isolate DNA.

agua Milli Q Plus estéril (18 MΩ) y se procedió de acuerdo con el protocolo anteriormente descrito (Preparación "rápida" de ADN a partir de sangre) (figura 2).

B) Extracción de ADN y PCR simultáneo a partir de "pelos"

La extracción de ADN a partir de la raíz de un folículo piloso, se llevó a cabo utilizando el método de digestión con proteínaasa K en tubo de reacción "PCR" (HOELZEL and GREEN, 1992). Este tipo de muestras, limitantes en contenido de ADN, exige tomar

unas precauciones especiales para evitar una amplificación inespecífica debido a la presencia de ADN contaminante. Para ello, se llevó a cabo la irradiación de algunos componentes de la reacción enzimática con luz UV ( $\lambda=302$  nm, 15 minutos) para inducir la fotodimerización de residuos de timina: tubo PCR, tampón 10X PCR, solución 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, agua MilliQ Plus, aceite mineral y solución de proteínaasa K (YAP *et al.*, 1994). Todas las muestras procedieron de un mismo sujeto (varón) y el análisis se ejecutó tras la recogida de las mismas.

Para la extracción de ADN, se seleccionó un pelo libre de impurezas de la cabeza o ceja, diseccionó la raíz bajo lupa estereoscópica ( $\leq 0.5$  mm longitud) (figura 3) y se introdujo en un tubo Eppendorf de paredes delgadas de 0.5 ml para "PCR" (Advanced Biotechnologies). A continuación, se añadieron 23.5  $\mu$ l de agua Milli Q Plus estéril, 5  $\mu$ l de tampón 10X "PCR" (Promega) [1% (v/v) Tritón X-100, KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9.0], 1.5  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml) (Boehringer Mannheim) y 35  $\mu$ l de aceite mineral (Sigma, Embryo Tested).

La digestión enzimática o extracción de ADN se llevó a cabo a 65°C durante 2 horas. Posteriormente, el enzima y el ADN se desnaturalizaron por tratamiento térmico a 95°C durante 20 minutos y la muestra se mantuvo a 80°C hasta iniciar la amplificación enzimática o "PCR". Para ello, se añadieron 20  $\mu$ l de mezcla "PCR" que incluyó: 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa I, iniciador P1-5EZ 1  $\mu$ M, iniciador P2-3EZ 1  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM y los 4 desoxirribonucleótidos 5'-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), a una concentración de 150  $\mu$ M

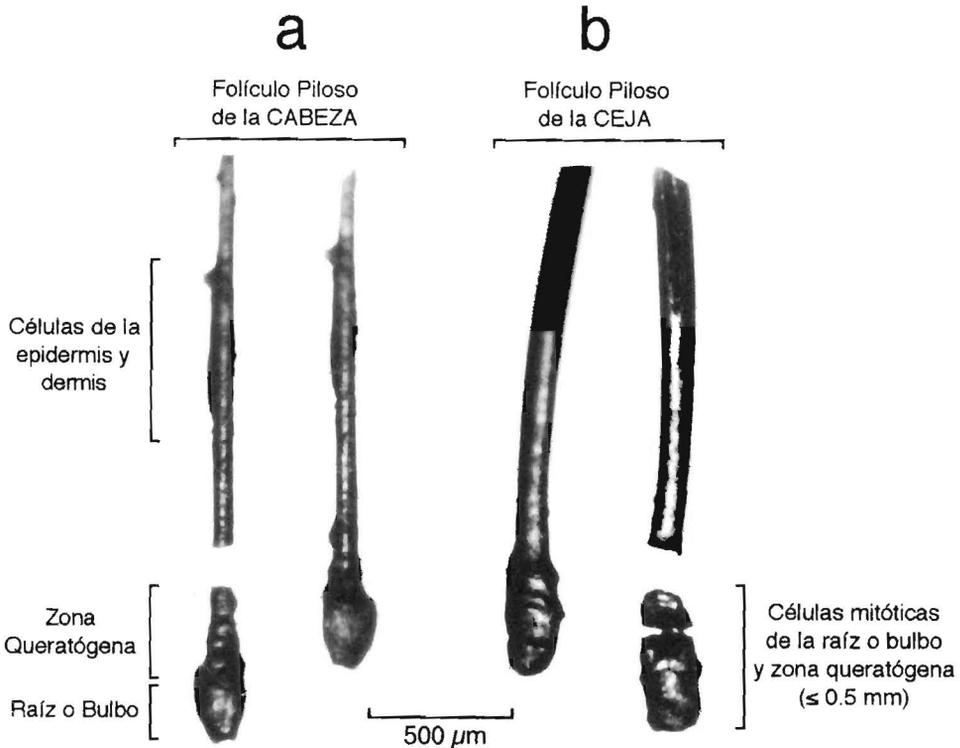


Figura 3. Morfología y estructura de un folículo piloso (66X) aislado de la cabeza (a) y ceja (b) de un hombre. Morphological structure of a head (a) and eyebrow (b) follicle hair (66X) isolated from a man. En la figura se muestra la raíz y zona queratogena adyacente que ha sido diseccionada y utilizada para el sexaje (PCR/RFLPs).

cada uno de ellos. Finalmente, los tubos se colocaron en el termociclador y se procedió con la amplificación enzimática (siguiente apartado).

### **Amplificación enzimática de los loci ZFX/ZFY: "Polymerase Chain Reaction o PCR"**

La amplificación enzimática de los loci ZFX/ZFY se llevó a cabo utilizando un termociclador de la marca MJ Research (Mod. PTC-100) y el enzima Taq ADN polimerasa I aislado de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Promega) (BEJ y MAHBUBANI, 1994). Los oligonucleótidos iniciadores o "primers" que han sido utilizados para la amplificación, descritos por AASEN y MEDRANO (1990), fueron los siguientes: 1) P1-5EZ: 5' ata atc aca tgg aga gcc aca agc t 3' (iniciador que promueve la síntesis de la cadena de ADN con sentido, codificante, o "forward primer") y 2) P2-3EZ: 5' gca ctt ctt tgg tat ctg aga aag t 3' (iniciador que produce la extensión de la cadena de ADN sin sentido, complementaria a la anterior, o "reverse primer") (figura 1 a y b). Los citados "primers" se encargaron a un servicio de síntesis de oligonucleótidos (Pharmacia Biotech).

La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.5 ml de pared delgada, en un volumen final de reacción de 50 µl y utilizando 50-100 ng de ADN aislado de las muestras biológicas (ADN molde o "template DNA"). La mezcla "PCR 1" (40 µl) estaba constituida por: ADN molde, 0.1% Tritón X-100 (v/v), KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 9.0), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, iniciador P1-5EZ 1 µM e iniciador P2-3EZ 1 µM.

A continuación se añadieron 35 µl de aceite mineral y se inició la desnaturalización del ADN con el programa "hot start

PCR": 1) 94°C durante 10 minutos y 2) mantenimiento de la muestra a 80°C. Seguidamente, se añadió a la reacción 10 µl de mezcla "PCR 2" que incluyó el enzima Taq ADN polimerasa I (1.25 unidades) y los 4 desoxirribonucleótidos 5'-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), a una concentración de 150 µM cada uno de ellos.

La reacción de amplificación (1 ciclo) se desarrolló en tres etapas: 1ª) desnaturalización del ADN (94°C, 1 minuto), 2ª) acoplamiento o hibridación de oligonucleótidos iniciadores a sus secuencias complementarias (60°C, 2 minutos) y 3ª) extensión de los mismos por el enzima Taq ADN polimerasa I (72°C, 2.5 minutos). La amplificación exponencial de los loci ZFX/ZFY se completó con 35 ciclos finalizando con una etapa de extensión final (72°C, 5 minutos). En el caso particular de muestras biológicas pobres en ADN (raíz de un pelo), la amplificación exponencial se prolongó hasta 50 ciclos.

Para comprobar la eficacia del proceso de amplificación, se tomó una alícuota de 10 µl y se analizó por electroforesis en geles de 1% de agarosa (Promega) con bromuro de etidio (SAMBROOK *et al.*, 1989). Concluida la electroforesis, se procedió a la visualización del producto amplificado por fluorescencia bajo una fuente de radiación UV (302 nm, λ) y al fotografiado del gel (Polaroid 667).

### **Análisis con Enzimas de Restricción de los loci ZFX/ZFY amplificados: "Identificación del sexo"**

Una vez amplificados los loci ZFX/ZFY, se procedió a su análisis con enzimas de restricción para la identificación del sexo según la especie. Para ello, nos basamos en el polimorfismo descrito por AASEN y

MEDRANO (1990) utilizando algunos enzimas de restricción ("Restriction Fragment Length Polymorphisms o RFLPs"). En el caso de rumiantes se añadieron 200 ng de vector plasmídico pUC18 (ccc) como control interno en el análisis de restricción (RFLPs).

Para la especie humana, se tomó una alícuota de 20  $\mu$ l de producto amplificado que fueron digeridos con 20 unidades de enzima Hae III (*Haemophilus aegyptius*) durante 3 horas a 37°C, en un volumen final de reacción de 40  $\mu$ l. Del mismo modo se procedió con la especie bovina, utilizando el enzima Pst I (*Providencia stuartii*). Finalmente, para las especies ovina y caprina, la digestión enzimática fue con Sac I (*Streptomyces achromogenes*). Todos los enzimas utilizados, así como las especificaciones en su uso, fueron de la firma comercial Promega.

Los fragmentos de restricción obtenidos, 20  $\mu$ l de la mezcla de digestión anterior, se analizaron posteriormente mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% (NuSieve GTG, FMC Products) (SAMBROOK *et al.*, 1989). La determinación del tamaño de los fragmentos de restricción originados se llevó a cabo utilizando como marcador de pesos moleculares el vector plasmídico pUC18 (200 ng) digerido con el enzima Hae III : 587, 458, 434, 298, 267, 257, 174, 102, 80 y 18 pb (pares de bases) (figura 4, línea 1).

#### **Amplificación de plásmido pUC18 en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ y posterior aislamiento**

Para ello, el plásmido pUC18 (figura 4) se amplificó en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  mediante transformación de la bacteria y crecimiento posterior en medio de cultivo líquido (LB Broth, Sigma) con ampicilina

(100  $\mu$ g/ml) (12-24 h). A continuación, las bacterias fueron lisadas (método alcalino) y el ADN plasmídico circular covalentemente cerrado (ccc) se purificó mediante ultracentrifugación en gradientes autogenerados de CsCl (SAMBROOK *et al.*, 1989).

#### **Manipulación de las secuencias nucleotídicas importadas de GenBank**

Las secuencias nucleotídicas de los cDNAs para los genes ZFY y ZFX humanos (PALMER *et al.*, 1990) se importaron via INTERNET (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov>) de un banco de genes (GenBank, clave de acceso: M30607 y M30608) y se manipularon con el programa Gene Works® 2.3 ["Nucleic Acid and Protein Sequence Analysis Software" (IntelliGenetics, Inc.)]. La figura 1 a y b, es una simulación de los loci ZFX y ZFY amplificados por PCR.

### **Resultados**

#### **Integridad del ADN aislado a partir de las diferentes muestras biológicas**

La integridad del ADN aislado a partir de las diferentes muestras biológicas objeto del estudio, y analizada mediante electroforesis, depende del origen de la mismas, así como del propio método de conservación utilizado.

Cuando se utilizó sangre fresca, se puede observar que el método de extracción con proteinasa K y fenol-cloroformo permite la obtención de fragmentos de ADN de elevado peso molecular ( $\geq$  50 Kb) (figura 5a, líneas 3, 4 y 5: 50, 100 y 150 ng de ADN de *Capra hircus*, respectivamente). Asimismo, se aprecia que este método es igualmente

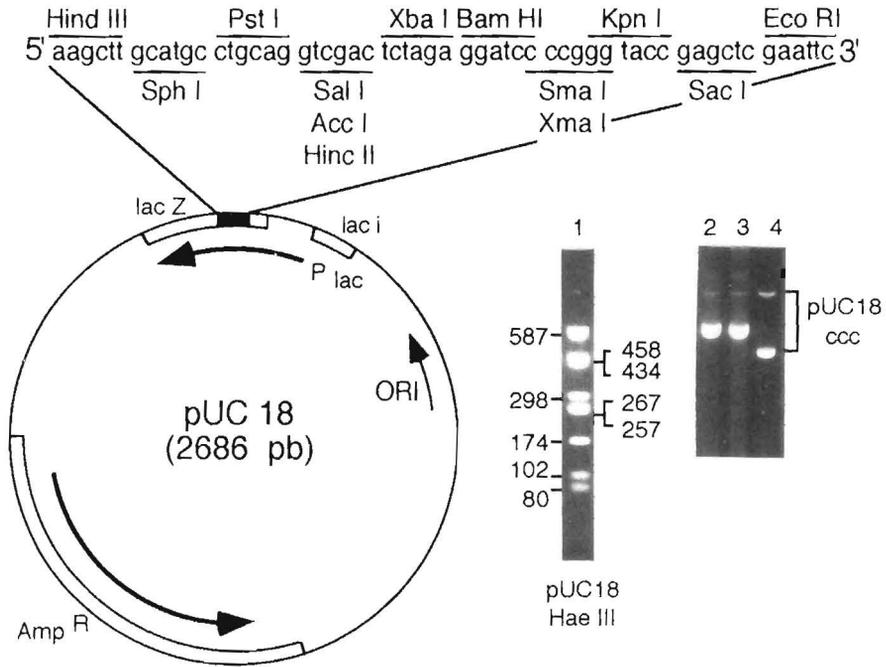


Figura 4. Mapa genético del plásmido pUC18 y comportamiento electroforético en función de su estructura tridimensional. pUC18 genetic map and electrophoretic mobility based on its tridimensional structure. En el mapa figuran los sitios de corte "únicos" para algunos enzimas de restricción, entre ellos Pst I y Sac I, así como el gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp<sup>R</sup> o Tn1). Asimismo, se muestra el comportamiento electroforético del mismo en función de su estructura tridimensional: línea 4, pUC18 sin cortar (ccc) y líneas 2 y 3, pUC18 abierto o digerido con los enzimas Pst I y Sac I, respectivamente. La línea 1, muestra el vector digerido con el enzima Hae III y utilizado como marcador de pesos moleculares.

efectivo para el aislamiento de ADN bacteriano a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial (líneas 1 y 2: 150 y 300 ng de ADN de *Escherichia coli* DH5α). Las líneas 6, 7 y 8, representan ADN de fago λ (500, 250 y 100 ng, respectivamente) utilizado como marcador de peso molecular (48.5 Kb) y para estimar visualmente la cantidad de ADN cargada en el gel.

Por el contrario, cuando se utilizaron tejidos congelados o preservados (etanol o formol), la integridad del ADN aislado no fue

tan uniforme originándose perfiles electroforéticos muy distintos. En el caso de tejidos congelados, 1 año a -20°C, se aprecia que la mayor parte del ADN aislado fueron fragmentos comprendidos entre los 5 y 50 Kb (figura 5b, líneas 6 y 7: 1 y 2 μg de ADN de hígado de cabra doméstica, respectivamente). Sin embargo, cuando se utilizaron tejidos conservados en etanol, 1 mes a temperatura ambiente, los signos de degradación se hicieron más evidentes pudiéndose observar un bandeo difuminado a lo largo de todo el gel salpicado de oligonucleoso-

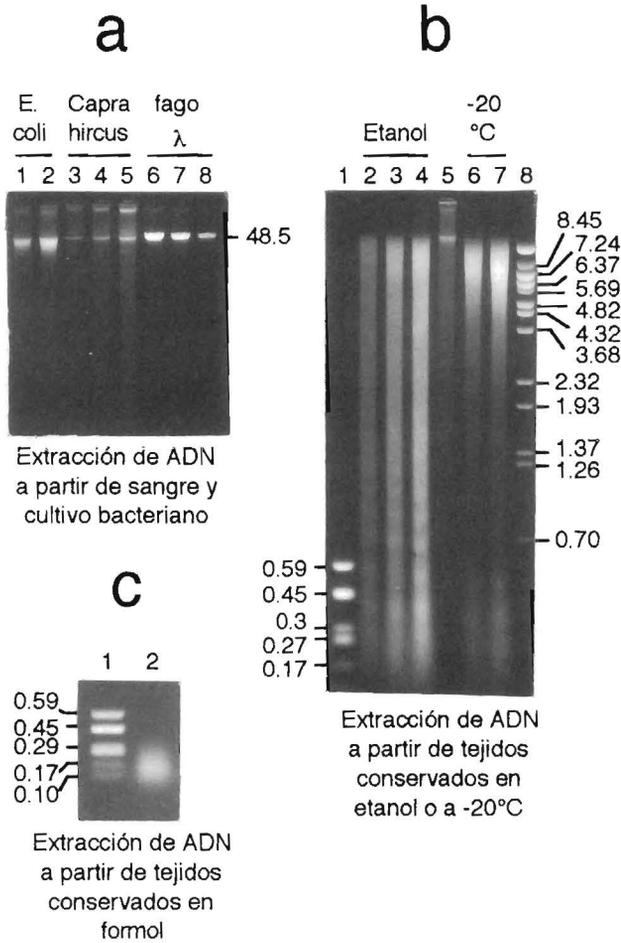


Figure 5. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el ADN aislado de diferentes muestras biológicas mediante el método de digestión celular con proteinasa K y posterior extracción con fenol-cloroformo. Agarose electrophoresis gel showing DNA extracted from different biological samples by using the proteinase K and phenol-chloroform extraction procedure. Panel a: ADN aislado de sangre de cabra doméstica (líneas 3-5) y de *E. coli* DH5α (líneas 1 y 2). Panel b: ADN aislado de tejidos conservados un mes en etanol (líneas 2-4; testículo de perro) o un año en congelación (líneas 6 y 7; hígado de cabra doméstica): línea 5. ADN de sangre fresca de cabra doméstica. Panel c: ADN aislado de tejidos conservados un año en formol (línea 2; hígado de fíbica alpino). Marcadores de peso molecular: panel a, líneas 6-8 (ADN fago λ de 48.5 Kb); panel b y c, línea 1 (pUC18 digerido con Hae III) y panel b, línea 8 (ADN fago λ digerido con Bst EII).

mas en la zona de 1 a 0.2 Kb (figura 5b, líneas 2, 3 y 4: 1, 2.5 y 5 µg de ADN, respectivamente, de testículo de perro). La extracción de ADN a partir de tejidos fres-

cos mostró un rendimiento e integridad muy similar al de tejidos congelados (no se muestra). Las líneas 1 y 8 son marcadores de pesos moleculares (plásmido pUC18

digerido con el enzima Hae III y ADN de fago  $\lambda$  digerido con el enzima BstE II, respectivamente). La línea 5 muestra ADN de alto peso molecular ( $\geq 50$  Kb) aislado a partir de sangre de cabra doméstica para un estudio comparativo.

Finalmente, cuando los órganos fueron conservados en formol, 1 año a temperatura ambiente, se puede observar una intensa degradación del ADN quedando todo él reducido a fragmentos de 0.1 a 0.3 Kb (figura 5c, línea 2: 1  $\mu$ g de ADN de hígado de cabra alpina). Línea 1: marcador de pesos moleculares (pUC18/Hae III).

#### **Validación de los métodos de extracción de ADN y origen de las muestras biológicas: "Amplificación de los loci ZFY y ZFX por PCR"**

Todos los métodos de extracción de ADN utilizados, así como el origen y modo de preservación de las muestras biológicas, a excepción de aquellas conservadas en formol, rindieron ADN de calidad aceptable para ser amplificado por PCR.

Para la optimización de la reacción de amplificación de los loci ZFX/ZFY, hemos utilizado ADN de cabra montés aislado de la fracción celular sanguínea por el método de lisis celular con proteinasa K y fenol-cloroformo. Para ello, se diseñó una estrategia en la que diferentes parámetros fueron ajustados: concentración de ADN, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, "primers", etc. (manuscrito en preparación). El protocolo de amplificación obtenido fue igualmente efectivo para las demás especies objeto de este trabajo, independientemente del origen de la muestra o su estado de conservación (Material y Métodos).

A partir de 50 ng de ADN aislado de la fracción celular sanguínea por el método de

lisis celular con proteinasa K y fenol-cloroformo, se ha amplificado por PCR un fragmento de  $\approx 0.45$  Kb común a todas las especies estudiadas (figura 6a, líneas 3, 4, 6 y 8: hembras para las especies bovina, ovina, caprina y humana, respectivamente: líneas 2, 5, 7 y 9: machos de las especies bovina, ovina, caprina y humana, respectivamente). Hay que destacar que el fragmento amplificado, o banda que aparece en el gel de electroforesis, es doble (ZFX-ZFX y ZFX-ZFY, hembras XX y machos XY, respectivamente). La especificidad del producto amplificado en cada caso se comprobó posteriormente mediante análisis con enzimas de restricción (ver más adelante). Para cada especie estudiada se utilizó un control negativo para detectar la presencia de ADN contaminante en los reactivos (no se muestra). Las líneas 1 y 10 son el marcador de pesos moleculares (pUC18/Hae III).

Con este método de extracción de ADN no encontramos diferencias en el rendimiento de producto amplificado cuando se utilizaron tejidos congelados o conservados en etanol (figura 5b). Por el contrario, no hubo amplificación nítida cuando se utilizó ADN de los tejidos conservados en formol (figura 5c) (datos no publicados).

Asimismo, también se obtuvo un producto PCR de  $\approx 0.45$  Kb cuando se utilizó ADN aislado de muestras biológicas limitantes de origen humano utilizando el método del Chelex-100 (figura 7a: líneas 2-5, 20  $\mu$ l de sangre; líneas 6 y 7, células bucales obtenidas por frotis). El rendimiento del producto amplificado fue similar cuando se utilizaron 3  $\mu$ l (líneas 2 y 4) o 1  $\mu$ l (líneas 3 y 5) de solución de ADN procedente de la microgota de sangre. Por el contrario, sí hubo mayor diferencia en el rendimiento cuando se utilizó ADN aislado de células bucales (líneas 6 y 7, 2.5 y 5  $\mu$ l de solución de ADN, respectivamente).

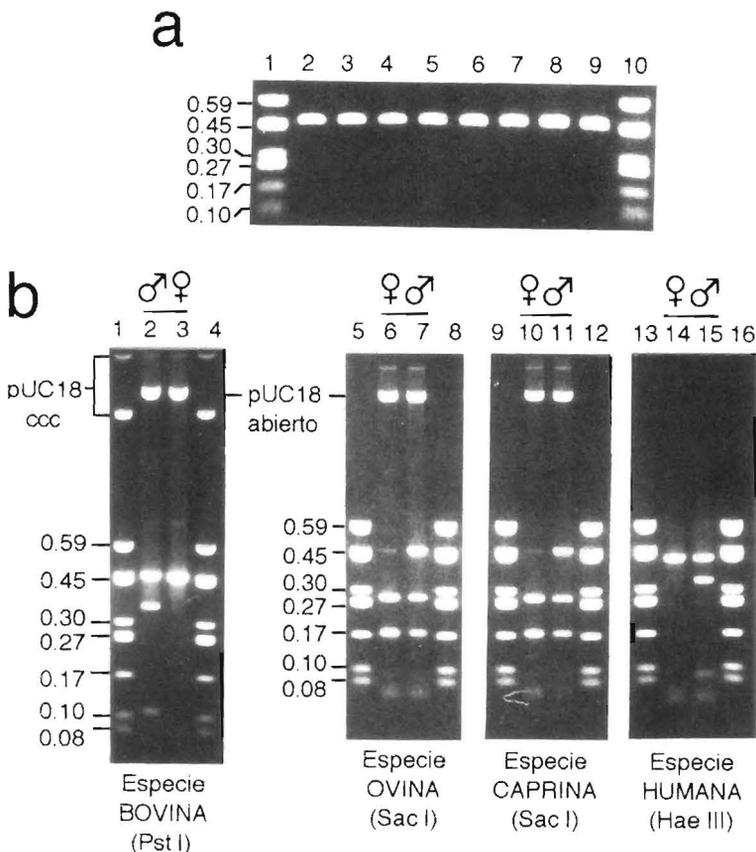


Figura 6. Perfiles electroforéticos mostrando la amplificación por PCR de los loci ZFX/ZFY (a) y posterior identificación del sexo por análisis de RFLPs (b) en las especies bovina, ovina, caprina y humana. ZFX/ZFY PCR amplification (a) and sex diagnosis by RFLPs analysis (b) in the bovine, ovine, caprine and human species. Panel a: loci ZFX/ZFY amplificados por PCR. Líneas 2-3, macho y hembra de la especie bovina; líneas 4-5, 6-7 y 8-9, hembra y macho de las especies ovina, caprina y humana, respectivamente. Las líneas 1 y 10: pUC18 digerido con el enzima Hae III. Panel b: identificación del sexo por análisis de restricción (RFLPs). Líneas 2-3, macho y hembra de la especie bovina identificados con el enzima Pst I. Líneas 6-7 y 10-11, hembra y macho de las especies ovina y caprina, respectivamente, identificados con el enzima Sac I. Líneas 14 y 15, mujer y hombre identificados con el enzima Hae III. Las líneas 1, 4, 5, 8, 9, 12, 13 y 16, pUC18 digerido con Hae III; en las líneas 1 y 4, se añadieron además 100 ng de vector pUC18 ccc (no digerido). Líneas 2, 3, 6, 7, 10 y 11, vector pUC18 abierto que indica el correcto funcionamiento del enzima de restricción.

Sin embargo, cuando se llevó a cabo la extracción de ADN y amplificación consecutiva por PCR en un mismo tubo de reacción utilizando como muestra la raíz de

pelos humanos de la cabeza o ceja, los resultados fueron más erráticos. Como se puede observar en el perfil electroforético se obtuvo mayor éxito en la extracción del

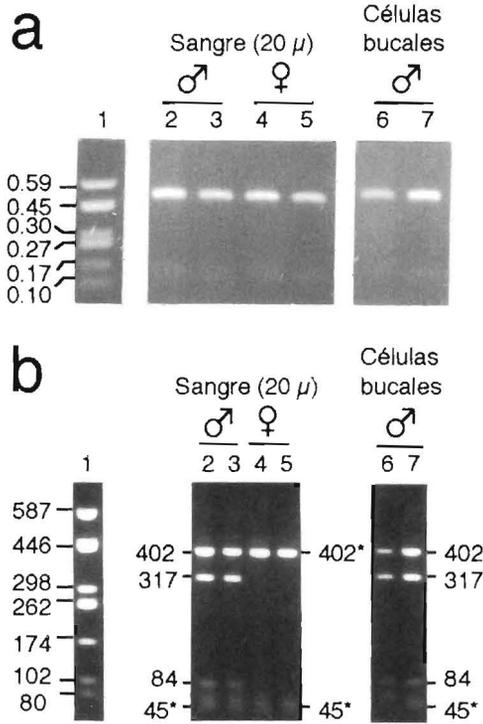


Figura 7. Electroforesis mostrando la amplificación de los loci ZFX/ZFY humanos mediante PCR (a) e identificación del sexo por análisis de RFLPs (b) a partir de ADN obtenido por el método del Chelex-100. PCR amplification of the human ZFX/ZFY loci (a) and sex diagnosis by RFLPs analysis (b) when using the Chelex-100 DNA extraction procedure. Panel a: reacción enzimática de amplificación de los loci ZFX/ZFY a partir de ADN obtenido de una microgota de sangre (líneas 2-5) o células bucales (líneas 6 y 7). Panel b: identificación del sexo mediante RFLPs con el enzima Hae III. Microgota de sangre: líneas 2-3, hombre y líneas 4-5, mujer. Células bucales: líneas 6-7, hombre. Línea 1 (a y b): pUC18 digerido con Hae III.

ADN y posterior amplificación con pelos de la cabeza (3 de 4) (75%) (figura 8: líneas 2, 3 y 4), frente a los procedentes de la ceja (1 de 4) (25%) (línea 12). El bandeo continuo que aparece en las líneas 5, 13 y 15 son productos inespecíficos o artefactos generados durante el proceso de amplificación exponencial. Las líneas 8 y 9 corresponden a los controles negativos y las líneas 1, 6, 7, 10, 11 y 16 son los marcadores de peso molecular (pUC18/Hae III).

**Identificación del sexo: "RFLPs o Restriction Fragment Length Polymorphisms"**

Para comprobar la especificidad de los productos PCR obtenidos (loci ZFX/ZFY) a partir de las diferentes muestras biológicas utilizadas, se procedió a su análisis con enzimas de restricción para la identificación del sexo por especie. Para ello, nos basamos en los polimorfismos previamente descritos

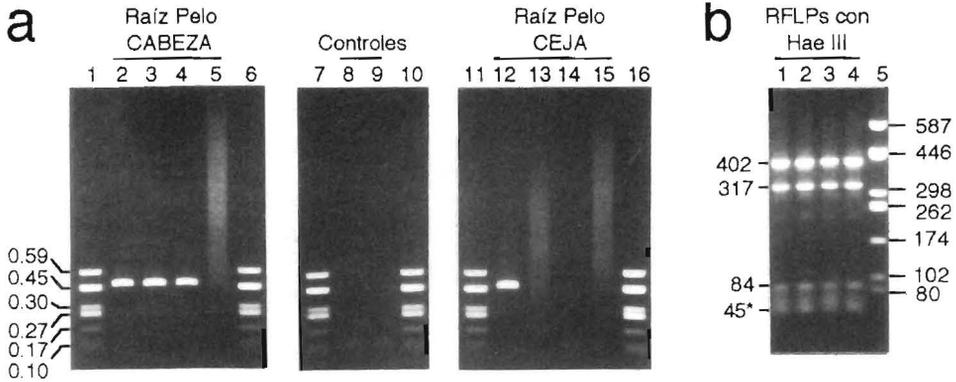


Figura 8. Perfiles electroforéticos de la amplificación de los loci ZFX/ZFY (a) y diagnóstico del sexo mediante RFLPs (b) cuando se utilizó ADN extraído de células de la raíz de un pelo de hombre (cabeza y ceja). PCR amplification of the ZFX/ZFY loci (a) and sex identification by RFLPs analysis (b) when using isolated DNA from a human male follicle hair root (head and eyebrow). Panel a: amplificación de los loci ZFY/ZFX humanos a partir de ADN aislado de la raíz de un pelo de la cabeza (líneas 2-5) o ceja (líneas 12-15). Las líneas 8 y 9 representan los controles negativos (cabeza y ceja, respectivamente). Panel b: identificación del sexo mediante RFLPs con el enzima Hae III. Líneas 1-3: raíz de pelo de cabeza; línea 4: raíz de pelo de ceja. El marcador de pesos moleculares fue pUC18 digerido con Hae III (panel a: líneas 1, 6, 7, 10, 11, 16; panel b: línea 5).

por AASEN y MEDRANO (1990). Nuestros resultados indican que el ADN amplificado fue específico a juzgar por el análisis de restricción realizado y tamaño de los fragmentos obtenidos (RFLPs).

La identificación del sexo en la especie humana se llevó a cabo utilizando el enzima Hae III. Dicho enzima corta el locus ZFY (447 pb) en dos sitios originando tres fragmentos de restricción (317, 84 y 45 pb). Sin embargo, el locus ZFX (447 pb) sólo presenta un sitio de corte para este enzima originando por tanto dos fragmentos de restricción (402 y 45 pb) (figura 1 a y b). De este modo, un hombre (ZFX/ZFY) presentará cuatro bandas en el gel (402, 317, 84, 45 y 45 pb) [figura 6b, línea 15 (sangre); figura 7b, líneas 2-3 (microgota de sangre) y 6-7 (células bucales); figura 8b, líneas 1-3 (pelos de la cabeza) y línea 4 (pelo de la ceja)]. Por el contrario, una mujer (ZFX/-

ZFX) sólo originará dos bandas en el perfil electroforético (402, 402, 45 y 45 pb) [figura 6b, línea 14 (sangre); figura 7b, líneas 4-5 (microgota de sangre)].

En el caso de pequeños rumiantes, se utilizó el enzima Sac I que sólo corta el locus ZFX en un único sitio originando dos fragmentos de 274 y 173 pb. Por tanto, un individuo macho (ZFX/ZFY) presentará 3 bandas en el gel (447, 274 y 173 pb) [figura 6b: líneas 7 (ovino) y 11 (caprino)]; y por el contrario, una hembra (ZFX/ZFX) sólo originará 2 bandas de mayor intensidad en el perfil electroforético (274, 274, 173 y 173 pb) [figura 6b: líneas 6 (ovino) y 10 (caprino)].

Para la identificación del sexo en la especie bovina se utilizó el enzima Pst I que corta únicamente el locus ZFY originando dos fragmentos de 344 y 103 pb. En este

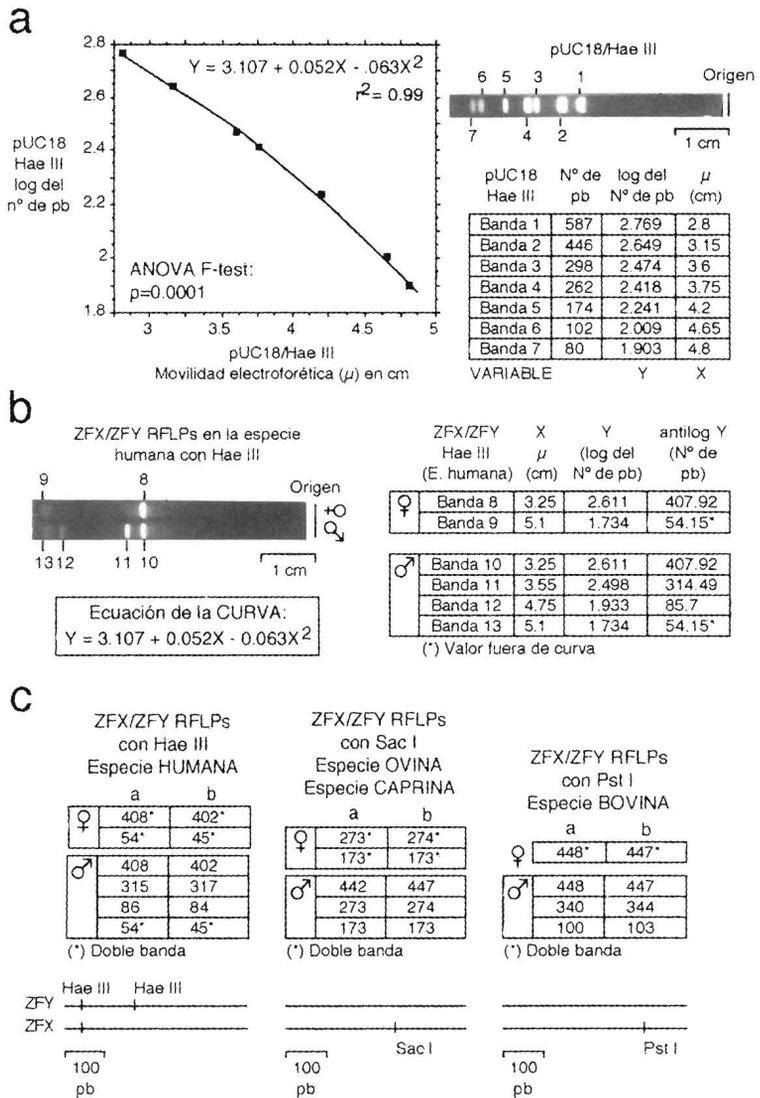


Figura 9. Procedimiento utilizado para el cálculo del tamaño (pb) de los fragmentos de restricción obtenidos en el análisis de RFLPs a partir de los loci ZFX/ZFY amplificados en cada una de las especies estudiadas. Method to determine the restriction fragments size (bp) originated from the RFLPs analysis of the amplified ZFX/ZFY loci in the different species under study. Panel a: obtención de la ecuación que determina el mejor ajuste entre el tamaño (log pb) y la movilidad electroforética ( $\mu$ ) del marcador de pesos moleculares (pUC18 digerido con Hae III). Panel b: cálculo del tamaño (pb) de los RFLPs originados con Hae III a partir de los loci ZFX/ZFY humanos. El panel c resume el tamaño (pb) de los diferentes fragmentos obtenidos en el análisis de RFLPs para el sexo de las diferentes especies estudiadas [columna a: utilizando nuestro método; columna b: tamaños inferidos por secuenciación].

caso, el macho bovino (ZFX/ZFY) presentará 3 bandas en el gel (447, 344 y 103 pb) (figura 6b: línea 2). Por el contrario, una hembra (ZFX/ZFX) presentará ambos loci íntegros (447 y 447 pb) por lo que darán una única banda en el gel (figura 6b: línea 3).

Asimismo, para la correcta asignación del sexo en las especies bovina, ovina y caprina, se ha utilizado el comportamiento electroforético del plásmido pUC18 como indicador del correcto funcionamiento del enzima de restricción utilizado para el sexaje (figura 4). De este modo, se puede apreciar que la digestión con el enzima de restricción correspondiente de los loci ZFX/ZFY amplificados, así como el vector pUC18 introducido como control, fue aparentemente completa al encontrarse este último en su forma abierta o de menor movilidad electroforética [figura 6b: líneas 2 y 3 (especie bovina); líneas 6 y 7 (especie ovina) y líneas 10 y 11 (especie caprina)].

Finalmente, para confirmar la especificidad de los RFLPs obtenidos en este trabajo, se calculó del tamaño de los diferentes fragmentos de restricción originados a partir de la digestión los loci ZFX/ZFY amplificados en cada una de las especies estudiadas y se compararon con los polimorfismos previamente descritos por AASEN y MEDRANO (1990). Para ello, utilizando el tamaño (log pares de bases) (Y) y la movilidad electroforética (migración en el gel en cm) (X) de los fragmentos de restricción del marcador de pesos moleculares (pUC18 digerido con Hae III), se construyó un diagrama de coordenadas rectangulares (X,Y) y se obtuvo la ecuación polinómica de segundo orden que presenta un mejor ajuste (figura 9a). Con esta ecuación y los valores de movilidad electroforética (cm) de los diferentes fragmentos de restricción obtenidos (RFLPs) a partir de los loci ZFX/ZFY de las diferentes especies estudiadas, se ha estimado con

suficiente exactitud el tamaño de los mismos en pares de bases (figura 9b, cálculo del tamaño de los RFLPs para los loci ZFY y ZFX humanos). La figura 9c resume los tamaños (pb) de los diferentes RFLPs obtenidos a partir de los loci ZFY y ZFX amplificados en las diferentes especies [columna a, determinación del tamaño (pb) mediante nuestro método; columna b, tamaños inferidos por secuenciación (AASEN y MEDRANO, 1990; PALMER *et al.*, 1990 y POLLEVICK *et al.*, 1992)].

## Discusión

El objetivo del presente trabajo es comparar la eficiencia de diferentes métodos de extracción de ADN a partir de una colección de muestras biológicas muy diversas, limitantes o no en contenido de ADN, y en diferentes estados de conservación. Todos los métodos descritos producen ADN de suficiente calidad para su posterior caracterización molecular por PCR/RFLPs y están adecuados al tipo de muestra biológica utilizada.

Cuando la cantidad de muestra biológica no es un factor limitante, el método de elección para la extracción de ADN posiblemente sea el que utiliza proteinasa K y fenol-cloroformo (SAMBROOK *et al.*, 1989). La principal ventaja del método radica en la desproteínización de la muestra, y en consecuencia, una mejor preservación del ADN y ARN aislado (inactivación de nucleasas). Asimismo, está especialmente indicado para muestras de alto valor biológico donde un clonado posterior del ADN extraído suele realizarse para la obtención de una librería genómica (por ejemplo, especies en vías de extinción). A su vez, la integridad del ADN obtenido es bastante aceptable y posibilita la amplificación de grandes frag-

mentos de ADN (20-40 Kb) ("long PCR") (CHENG *et al.*, 1994).

Merece la pena destacar los evidentes signos de degradación del ADN cuando se utilizaron tejidos conservados en etanol (1 mes), y en particular, la presencia de oligonucleosomas que recuerdan los síntomas de muerte celular programada o "apoptosis" (SCHWARTZMAN y CIDLAWSKI, 1993) (figura 5b). A pesar de esta moderada degradación, no se alteró significativamente el rendimiento de la reacción de amplificación o PCR. Por el contrario, la conservación prolongada de muestras biológicas en formol produce una drástica degradación del ADN, fragmentos de 0.1 a 0.3 Kb (figura 5c), cuando se compara con el mismo tejido conservado en congelación por un periodo de tiempo similar (1 año) (figura 5b). Este ADN tan degradado resultó ser un sustrato ineficiente para la amplificación de los loci ZFX/ZFY ( $\approx$  0.45 Kb), aunque podría ser susceptible de análisis por PCR en el caso de secuencias más cortas de 0.1-0.2 Kb (por ejemplo, microsátelites). Por tanto, el formol, de uso rutinario en histopatología y considerado como un excelente fijador de proteínas, no parece ser el agente fijador más idóneo para la preservación prolongada del ADN (JACKSON *et al.*, 1991).

Nuestros resultados sobre integridad del ADN aislado parecen indicar que la congelación de la muestra biológica sería la opción por excelencia para una preservación prolongada del ADN (figura 5b). Alternativamente, la conservación de la muestra en etanol y a temperatura ambiente es también efectiva aunque se aprecie una moderada degradación del ADN con el tiempo. En este sentido, en nuestro laboratorio se están procesando muestras de hígado y músculo de cabra montés que llevan 2 años almacenadas en etanol absoluto a temperatura ambiente, y aunque se observa una

moderada degradación del ADN aislado se pueden apreciar fragmentos que van de los 50 a 5 Kb. Estas muestras se están utilizando con éxito para la amplificación de la zona de control del ADN mitocondrial (1.5 Kb) con objeto de hacer un estudio filogenético en esta especie (resultados sin publicar).

Cuando se utilizaron muestras biológicas limitantes en contenido de ADN, una microgota de sangre o células bucales obtenidas por frotis, se utilizó el procedimiento de la resina de intercambio iónico Chelex-100 para la extracción de ADN (WALSH *et al.*, 1991). El Chelex-100 actúa eliminando de la muestra los metales pesados que son inhibidores de la actividad del enzima Taq ADN polimerasa I por desplazamiento de su cofactor metálico inorgánico ( $Mg^{2+}$ ). Este método de extracción es rápido y sencillo (1 hora) y produce una mínima pérdida de ADN durante el procesado por lo que es ideal para este tipo de muestras biológicas. La integridad del ADN aislado no se verificó al ser la técnica electroforética (tinción con bromuro de etidio) poco sensible, aunque su calidad fue aceptable para la amplificación por PCR (loci ZFX/ZFY). Este tipo de muestras biológicas permite un número limitado de ensayos PCR cuando se compara con el anterior. De este modo, y con nuestras condiciones experimentales, se pueden realizar hasta 100-150 amplificaciones por PCR a partir de una microgota de sangre (20  $\mu$ l). Por el contrario, existe una mayor limitación en el contenido de ADN en células bucales por lo que un menor número de ensayos PCR puede llevarse a cabo (25-50 amplificaciones) (figura 7).

El tercer método que presentamos, extracción directa de ADN en tubo de reacción PCR (proteinasasa K) y posterior amplificación enzimática, está justificado cuando la muestra biológica es claramente limitante

en contenido de ADN (raíz de un pelo). De este modo, la totalidad del ADN extraído de la muestra biológica se utiliza para una única amplificación enzimática o PCR. Nuestros resultados indican una mayor eficiencia para el sexaje cuando se utiliza la raíz de un pelo de la cabeza (75%) en lugar de la raíz de un pelo de la ceja (25%) (figura 8). Esta diferencia en la eficiencia posiblemente obedece a la diferente estructura del folículo piloso en cada caso (figura 3), así como la posible presencia de inhibidores del enzima Taq ADN polimerasa I. Esta última hipótesis se basa en que el sexaje a partir de 2 o más raíces de pelo producen una drástica reducción de la eficiencia del análisis a pesar de ser mayor la cantidad de ADN presente en la reacción (resultados sin publicar). Es por tanto evidente que una limitación del método es la posible persistencia en el tubo de reacción PCR de algún inhibidor del enzima Taq ADN polimerasa I resistente a la degradación proteolítica inespecífica (proteinasas K) y tratamiento térmico. En el caso particular de pelos, se ha descrito que la melanina es uno de ellos (YOSHII *et al.*, 1993), por lo que se han sugerido métodos alternativos de extracción de ADN y posterior amplificación por PCR (WILSON *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1995).

El protocolo consenso de sexaje que presentamos en diferentes especies, mediante amplificación de los loci ZFY/ZFX y su posterior análisis por RFLPs, se ajusta a las condiciones experimentales de nuestro laboratorio, y no difiere mucho del procedimiento descrito por AASEN y MEDRANO (1990). En particular, nuestro protocolo mejora la sensibilidad del análisis por lo que permite utilizar menor cantidad de ADN, diez veces menos en el caso de sangre, así como una menor cantidad de enzima (1.25 unidades de Taq ADN polimerasa I). Por otra parte, y con objeto de mejorar la especi-

ficidad del ensayo, se inicia la amplificación selectiva de ADN en caliente ("hot start PCR") por lo que se reducen los riesgos de amplificación inespecífica ("mis-priming") y de formación de artefactos con los "primers" ("primer-oligomerization"). Asimismo, para el sexaje de muestras biológicas limitantes (raíz de un pelo) la amplificación exponencial de los loci ZFX/ZFY se llevó a cabo con 50 ciclos PCR y 2.5 unidades de enzima obteniéndose unos resultados satisfactorios.

En todas las especies estudiadas se ha amplificado un fragmento de  $\approx 0.45$  Kb que corresponde al tamaño esperado de los loci ZFX/ZFY (figura 6a). La identificación del sexo se realizó mediante análisis con enzimas de restricción (RFLPs). Como novedad y con objeto de mejorar la precisión de esta técnica de sexaje, al producirse con cierta frecuencia una incorrecta asignación del sexo en rumiantes por fallo en la digestión con el enzima de restricción (ABROL *et al.*, 1993), hemos introducido un control interno en el análisis de RFLPs: el vector plasmídico pUC18 (figura 6b). Por otra parte, la utilización de este vector como marcador de pesos moleculares (pUC18/Hae III) (figura 4) abarata el costo del análisis al prescindirse de marcadores de origen comercial y resulta ser muy eficiente para la determinación del tamaño (pb) de los RFLPs obtenidos (figura 9).

Finalmente, en el presente trabajo se describe la tipificación genética de individuos (sexaje) a partir de muestras biológicas obtenidas por un método "no invasivo" (pelos y células bucales). En este sentido, debemos decir que esta práctica será en un futuro próximo de amplia difusión en laboratorios de análisis genéticos al ajustarse en mejor medida a los derechos y normas de protección de animales de experimentación, producción y compañía.

### Agradecimientos

Al Dr. José A. Cebrián, la Dra. Teresa Muño e Inmaculada Gargallo, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria (Zaragoza), por el préstamo inicial de "primers", así como por algunos consejos técnicos. A la Dra. Valérie Manceau (Laboratoire de Biologie des Populations d'Altitude, Université Joseph Fourier, Grenoble) por la cesión de muestras de íbice alpino. A José M<sup>a</sup> Ruiz Maccione por la asistencia técnica en algún experimento. A Pilar Sánchez por su asistencia en la preparación del material fungible y reactivos. Y finalmente, a Jesús Luis Yáñez por la revisión crítica del artículo.

Michel Villalta disfruta de un contrato de reincorporación del M.E.C. (B.O.E. 195, 16 de agosto de 1994).

### Bibliografía

- AASEN, E. and MEDRANO J.F., 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Bio/Technology* 8:1279-1281.
- ABROL et al., 1993. Excess PCR primers inhibit DNA cleavage by some restriction endonucleases. *BioTechniques* 15:630-632.
- ARNHEIM N., WHITE T. and RAINEY W. E., 1990. Application of PCR: organismal and population biology. *BioScience* 40:174-182.
- ARRIGO S. J., 1994. Assesment of therapy effectiveness: infectious disease, 344-356. In "The Polymerase Chain Reaction", K. B. Mullis, F. Ferré, R. A. Gibbs. Ed. Birkhauser Boston, Cambridge, MA02193, USA.
- BEJ, A.K. and MAHBUBANI, M.H., 1994. Thermostable DNA polymerases for in vitro DNA amplifications. 219-237. In "PCR Technology: Current Innovations", Griffin HG and Griffin AM. Ed. CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- BUDOWLE B., SAJANTILA A., HOCHMEISTER M. N. and COMEY C. T., 1994. The application of PCR to forensic sciences, 244-256. In "The Polymerase Chain Reaction", K. B. Mullis, F. Ferré, R. A. Gibbs. Ed. Birkhauser Boston, Cambridge, MA02193, USA.
- CHENG S., CHANG S. Y., GRAVTTT P. and Respress R., 1994. Long PCR. *Nature* 369:684-685.
- D'AURIOL L. and SIGAUX F., 1994. The detection of minimal residual disease (MRD) in acute lymphoblastic leukemia using clone-specific probes directed against V(D)J junctional sequences, 335-343. In "The Polymerase Chain Reaction", K. B. Mullis, F. Ferré, R. A. Gibbs. Ed. Birkhauser Boston, Cambridge, MA02193, USA.
- DE LAMBALLERIE, X.; ZANDOTTI, C.; VIGNOLI, C.; BOLLET, C. and DE MICCO, P., 1992. A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex-100", suitable for gene amplification. *Res Microbiol.* 143:785.
- EHRlich P. R. and WILSON E. O., 1991. Biodiversity studies: science and policy. *Science* 253:758-762.
- HEDRICK P. W. and MILLER P., 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecological Applications* 2:30-46.
- HETZEL J., 1993. Livestock genome research on the march. *Nature genetics* 4:327-328.
- HOELZEL, A.R. and GREEN, A., 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA, 159-187. In "Molecular Genetic Analysis of Populations A Practical Approach"; Hoelzel AR. Ed. IRL Press at Oxford University Press, NY.
- JACKSON D. P., HAYDEN J. D. and QUIRKE P., 1991. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material, 29-50. In "PCR A Practical Approach"; McPherson MJ, Quirke P and Taylor GR. Ed. IRL Press at Oxford University Press, NY.
- LINN Z., KONDO T., MINAMINO T., OHTSUJI M., NISHIGAMI J., TAKAYASU T. and OHSHIMA T., 1995. Sex determination on mummies discovered at Taklamakan desert in 1912. *Forensic Sci. Int.* 75:197-205.
- MAHBUBANI M. H. and BEJ A. K., 1994. Applications of polymerase chain reaction methodology in clinical diagnostics, 307-326. In "PCR Technology: Current Innovations", Griffin HG and Griffin AM. Ed. CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida.

- MASSARI A., NOVELLI G., COLOSIMO A., SANGIUOLO F., PALKA G., CALABRESE G., CAMURRI G., GHIRARDINI G., MILANI G., GIORLANDINO C., GAZZANELLI G., MALATESTA M., ROMANINI C. and DALLAPICOLA B., 1996. Non-invasive early prenatal molecular diagnosis using retrieved transcervical trophoblast cells. *Hum. Genet.* 97:150-155.
- MONTGOMERY G. W., CRAWFORD A. M., PENTY J. M., DODDS K. G., EDE A. J., HENRY H. M., PIERSON C. A., LORD E. A., GALLOWAY S. M., SCHMACK A. E., SISE J. A., SWARBRICK P.A., HANRAHAN V., BUCHANAN F. C. and HILL D. F., 1993. The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nature Genetics.* 4: 410-414.
- PAGE D. C., MOSHER R., SIMPSON E.M., FISHER E.M.C., MARDON G., POLLACK J., MCGILLIURAY B., DE LA CHAPELLE A. and BROWN M.C., 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51: 1091-1104.
- PALMER M.S., BERTA P., SINCLAIR A.H., PYM B. and GOODFELLOW P.N., 1990. Comparison of human ZFY and ZFX transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1681-1685.
- PALMER M.S., SINCLAIR A.H., BERTA P., ELLIS N.A., GOODFELLOW P.N., ABBAS N.E. and FELLOUS M., 1989. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342: 927-939.
- PERUCHO M., 1994. PCR and Cancer Diagnostics: detection and characterization of single point mutations in oncogenes and antioncogenes. 369-394. In "The Polymerase Chain Reaction", K. B. Mullis, F. Ferré, R. A. Gibbs, Ed. Birkhauser Boston, Cambridge, MA02193, USA.
- POLLEVICK G.D., GIAMBIAGI S., MANCARDI S., DE LUCA L., BURRONE O., FRASH A.C. and UGALDE R. A., 1992. Sex determination of bovine embryos by restriction fragment length polymorphisms of PCR amplified ZFX/ZFY loci. *Bio/Technology* 10: 805-807.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS T., 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- SCHNEIDER-GADICKE A., BEER-ROMERO P., BROWN L. G., NUSSBAUM R. and PAGE D. C., 1989. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* 57:1247-1258.
- SCHWARTZMAN R. A. and CIDLOWSKI J. A., 1993. The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* 14: 133-151.
- YAP E.P.H., LO Y.M.D., FLEMING K.A. and MCGEE J.O'D., 1994. False-positives and contamination in PCR. 249-258. in "PCR Technology: Current Innovations", Griffin HG and Griffin AM, Ed. CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- YOSHII T., TAMURA K., TANIGUCHI T., AKIYAMA K. and ISHIYAMA I., 1993. Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal. *Jpn. J. Legal Med.* 47: 323-329.
- WALSH, P.S.; METZGER, D.A. and HIGUCHI, R., 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10:506-513.
- WILSON M. R., POLANSKEY D., BUTLER J., DIZINNO J. A., REPLOGLE J. and BUDOWLE B., 1995. Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *BioTechniques* 18: 662-669.

(Aceptado para publicación el 21 de mayo de 1996)