

Detección de variantes alélicas de la kappa-caseína en bovinos Hartón del Valle

Detection of allelic variants of kappa- casein in Harton del Valle cattle

Julián Naranjo,¹ Andrés Posso,² Heiber Cárdenas,³ Jaime E. Muñoz F.⁴

RECIBIDO: AGOSTO 1/06. ACEPTADO: FEBRERO 15/07

¹ Biól. Universidad del Valle. julian_resis@hotmail.com

² Funcionario Laboratorio de Biología Molecular. Universidad Nacional de Colombia. AA 237. Palmira, Valle. amposso@palmira.unal.edu.co

³ Biól. Ph.D. Universidad del Valle. hecarden@univalle.edu.co

⁴ Ing. Agr. Esp. Universidad Nacional de Colombia. AA 237. Palmira, Valle. Autor para correspondencia. jemunozf@palmira.unal.edu.co

RESUMEN

Se utilizó ADN de 2 machos y 34 hembras de la raza de ganado criollo Hartón del Valle para detectar polimorfismos en el gen que codifica para la kappa-caseína (κ -CN) mediante PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) y PCR-SSCP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo en la conformación de ADN de cadena única). Se identificaron 17 individuos homocigotos AA, 15 heterocigotos AB y 4 homocigotos BB. La identificación de machos jóvenes portadores del genotipo de interés en menos de ocho horas mediante SSCP representa una ventaja para los propietarios de hatos abriendo la posibilidad de aumentar la frecuencia del alelo B, una de las vías para mejorar la eficiencia lechera para la manufactura de queso.

Palabras claves: *Bos taurus*, Kappa-caseína, PCR-SSCP, PCR-RFLP.

SUMMARY

DNA from 2 males and 34 females of Hartón del Valle bovine breed, to detect polymorphisms by PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragments length polymorphism) and PCR-SSCP (polymerase chain reaction– single strand conformation polymorphism) in kappa-casein gene was used 17 homozygote AA, 15 heterozygote AB and 4 homozygote BB individuals were identified. The quick and easy identification of young male genotypic carriers in less than eight hours is an advantage to milk farmers, given to there the possibility to increase the B allelic frequency, one of the ways to improve the milk efficiency for cheese production.

Key words: *Bos Taurus*, Kappa-casein, PCR-SSCP, PCR-RFLP.

INTRODUCCION

La raza criolla Hartón del Valle se originó de bovinos introducidos por los españoles alrededor de 1539; se explota principalmente en sistemas de doble propósito (leche y carne) y puede generar hasta el 65% de los ingresos por concepto de venta de leche y quesos (Casas y Valderrama, 1998).

El contenido total de proteínas en leche bovina es de alrededor de 35 g L⁻¹, con el 80% representado por las caseínas α ₁-, α ₂-, β - y κ -CN, 10% por β -lactoglobulina, 2% por α -lactoalbúmina y pequeñas cantidades de enzimas e inmunoglobulinas (Muysson

y Verrinder, 1989; Braunschweig *et al.*, 2000). Las caseínas α ₁- y α ₂- constituyen aproximadamente el 48% de las caseínas totales, las β -caseínas el 35% y κ -caseínas el 13%. Las α y β caseínas contienen varios grupos serina fosfato, la κ -caseína presenta muy pocos, razón por la cual tiene baja capacidad para unirse al calcio, lo que la hace insensible a la precipitación inducida de las proteínas lácteas (Muysson y Verrinder, 1989).

Las caseínas se precipitan a un pH bajo (4.5-5.0), temperatura de 20°C, seguida de una proteólisis en la porción hidrofílica de la κ -CN ocasionada por

quimosina o pepsina, lo cual permite la formación del cuajo, materia prima para la manufacturación del queso (Ginger y Grigor, 1999).

Las caseínas están codificadas por genes autosómicos estrechamente ligados (Chessa *et al.*, 2003), lo que implica que la unidad de transmisión genética sea el haplotipo. Del gen de la κ -CN se han descrito seis variantes alélicas: A, B, C, E, F y G. La κ -CN está conformada por 169 aminoácidos, con regiones variables en los codones 136 y 148 del tercer exón; la variante A contiene treonina en el codón 136 (ACC) y ácido aspártico en el 148 (GAT), la variante B contiene isoleucina (ATC) y alanina (GCT). La leche bovina que contiene κ -CN del tipo B presenta contenido proteico más alto, mayor estabilidad al calor y a la congelación, menor tiempo de coagulación, cuajo más consistente y 5-10% más de rendimiento quesero (Barroso *et al.*, 1998).

En la detección de los genotipos AA, AB y BB se han utilizado muestras de leche, en hembras lactantes y en el caso de evaluación de machos se requieren 5 a 6 años para una prueba de progenie. Las técnicas moleculares han permitido identificar genotipos de interés en machos jóvenes.

La sustitución nucleotídica permite usar el exón como marcador de selección (Prinzenberg *et al.*, 1996), con técnicas como PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) o PCR-SSCP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo en la conformación de ADN de cadena única). (Barroso *et al.*, 1998). En la técnica PCR-RFLP se amplifica una región del gen de κ -CN y para la detección de las variantes alélicas se digiere con enzimas de restricción que son de alto costo. El método de detección de mutaciones PCR-SSCP (Orita *et al.*, 1989) es una técnica rápida, sencilla y de bajo costo que se basa en la migración diferencial de cadenas desnaturizadas de ADN, debido a que las cadenas simples adquieren estructuras secundarias complejas que dependen de la secuencia de nucleótidos (Hoelzel, 1998). Con los métodos PCR-RFLP y PCR-SSCP pueden identificarse variantes alélicas de forma rápida en muestras de semen o sangre, en animales de cualquier sexo y edad, lo que permite a los productores de hatos lecheros aumentar en corto tiempo la frecuencia del alelo B, mediante la utilización de reproductores homocigotos.

En esta investigación se estandarizaron y compararon las técnicas PCR-RFLP y PCR-SSCP para la identificación de los alelos de la κ -CN, en bovinos Hartón del Valle.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó sangre de 2 machos reproductores y 34 hembras de la raza de ganado criollo Hartón del Valle en dos hatos lecheros situados en Roldanillo (04° 24' 53" latitud norte, 76° 09' 17" longitud oeste) y dos unidades de producción animal pertenecientes a la Universidad Nacional de Colombia, en Palmira (03° 32' 22" latitud norte, 76° 18' 13" longitud oeste) y Candelaria (03° 24' 27" latitud norte, 76° 21' 04" longitud oeste) (Valle del Cauca, Colombia). Los individuos se seleccionaron al azar; las muestras de sangre se tomaron en tubos vacutainer® de 5 ml con anticoagulante EDTA, se conservaron refrigeradas y se extrajo el ADN mediante el protocolo de "Salting Out" (Miller *et al.*, 1998); la valoración del ADN se realizó en geles de agarosa al 1.2% por comparación con concentraciones conocidas de ADN del bacteriófago lambda.

Por medio de PCR se amplificó un fragmento de 453 pb, situado en el tercer exón del gen de κ -CN del cromosoma 6 (Barroso *et al.*, 1998). Se utilizaron 120 ng de ADN en una solución buffer de PCR que contenía 20 nmoles de cada primer (sentido, 5'-TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG TTA TGG-3'; antisentido, 5'-GCG TTG TCT TCT TTG ATG TCT CCT TAG-3'); 2 mM de MgCl₂, 200 μ M de mezcla de dNTP (MBI fermentas) y 2 U de Taq polimerasa (Invitrogen™) en un total de 100 μ l. Las muestras se sometieron a un ciclo de desnaturalización (5 minutos a 94°C) y luego a 35 ciclos (1 minuto 94°C; 1 minuto 65°C; 2 minutos 72°C) con una extensión final de 72°C por cinco minutos.

Para la PCR-RFLP se digirieron 15 μ l de producto de PCR con 2U de cada una de enzimas de restricción HinfI, HaeIII y Tail (estereoisómero de MaeII) (Cuadro 1). Las muestras se incubaron a 37°C por 3 horas para las enzimas HinfI y HaeIII y a 65°C para la enzima TaiI. La visualización de los fragmentos se realizó en geles de poliacrilamida al 12% (relación de acrilamida: N,N'-metilene-bisacrilamida de 29:1) que contenía 0.5XTBE (0.045 M tris-borato, 0.001 M EDTA, pH 8.0). La tinción de los geles se hizo con nitrato de plata (Sambrook y Russell, 1991)

Para PCR-SSCP se mezclaron 2 μ l de los productos de PCR con 8 μ l de buffer desnaturizante (0.05% Xylene-Cianole, 0.05% azul de Bromofenol, 5.5 mM de EDTA pH 8.0), se desnaturizaron a 95°C por dos minutos y luego se enfriaron a 4°C para evitar que el ADN se renaturalice. La electroforesis se realizó en una cámara Biometra (12 x 8 cm), en geles al 12% de poliacrilamida (relación de acrilamida: N,N'-metilene-bis-acrilamida de 100:1), TBE 0.5X (0.045 M tris-borato, 0.001 M EDTA, pH 8.0) y 5% de glicerol. Las

Tabla 1. Longitud (pb) de los fragmentos obtenidos por digestión de los productos de PCR, con las enzimas de restricción HinfI, HaeIII y Tail.

Alelo	Hinf I (5'-GATC-3') 37°C x 3 h				Hae III (5'GGCC-3') 37°C x 3 h			Mae II (Tail) (5'-GATC-3') 65°C x 3 h			
	-	326	100	27	230	223	-	-	-	254	199
A	-	326	100	27	230	223	-	-	-	254	199
B	426	-	-	27	230	223	-	-	-	254	199
C	426	-	-	27	230	223	-	-	453	-	-
E	-	326	100	27	230	-	145	78	-	254	199

muestras se corrieron durante 8 horas a 200 voltios en TBE 0.5X con temperatura regulada a 15°C. La tinción de los gels se hizo con nitrato de plata.

Se calcularon las frecuencias alélicas para evaluar si la muestra poblacional se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg (Klug y Cumming, 1999), usando la distribución chi-cuadrado.

RESULTADOS Y DISCUSION

PCR-RFLP: La enzima HinfI permitió diferenciar los alelos A y E de B y C (Tabla 1 y Figura 1). Con la enzima HaeIII se descartó la presencia del alelo E y con TaiI se descartó la presencia del alelo C. En el patrón de bandas generado, solo se encontraron alelos A y B y se identificaron 17 individuos homocigotos AA, 15 heterocigotos AB y 4 homocigotos BB.

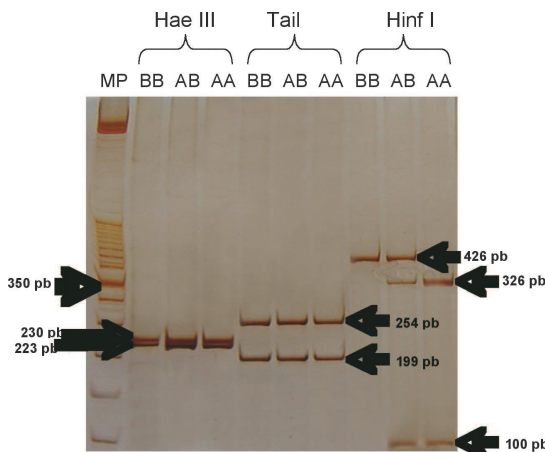


Figura 1. Patrón de bandas obtenido por amplificación del fragmento de 453 pb del gen de la κ-CN, digerido con las enzimas HinfI, HaeIII y Tail.

En la digestión con la enzima HinfI se observó una banda inespecífica alrededor de los 250-300 pb (Figura 2), cuando se utilizó 5U de enzima de restricción por 15 µl de producto de PCR, de acuerdo con la metodología descrita por Barroso *et al.* (1998); esta banda desapareció al reducir a 2U de enzima.

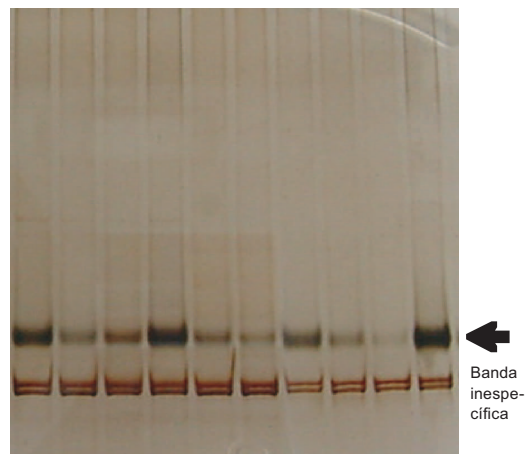


Figura 2. Digestión del fragmento de 453 pb la κ-CN, con 5U de la enzima HinfI, donde se muestra la presencia de una banda inespecífica.

PCR-SSCP: Se detectaron dos patrones de movilidad que corresponden a los alelos A y B (Figura 3). En los gels PCR-SSCP cada cadena de ADN migra de manera independiente. El alelo A de k-caseína genera dos bandas que se diferencian por su ubicación en el gel, de las dos del alelo B; los genotipos homocigotos, por lo tanto presentan dos bandas y los heterocigotos cuatro bandas. Se detectaron 17 individuos homocigotos AA, 15 heterocigotos AB y 4 homocigotos BB, lo que coincidió perfectamente con la técnica PCR-RFLP.

Se detectaron claramente las variantes alélicas en fragmentos de 453 pares de bases, cuando la literatura menciona que la PCR-SSCP es más eficiente para fragmentos entre 176 y 354 pb y enfatizan en la importancia de mantener la temperatura entre 4°C y 10°C con cámaras de electroforesis con sistema de enfriamiento. La PCR-SSCP se simplificó en aspectos técnicos pues se utilizó una cámara Biometra pequeña con dimensiones 12cm x 8 cm, sin sistema de refrigeración, lo cual permitió reducir los costos asociados al tamaño de los gels de poliacrilamida como el de los reactivos para la elaboración del gel,

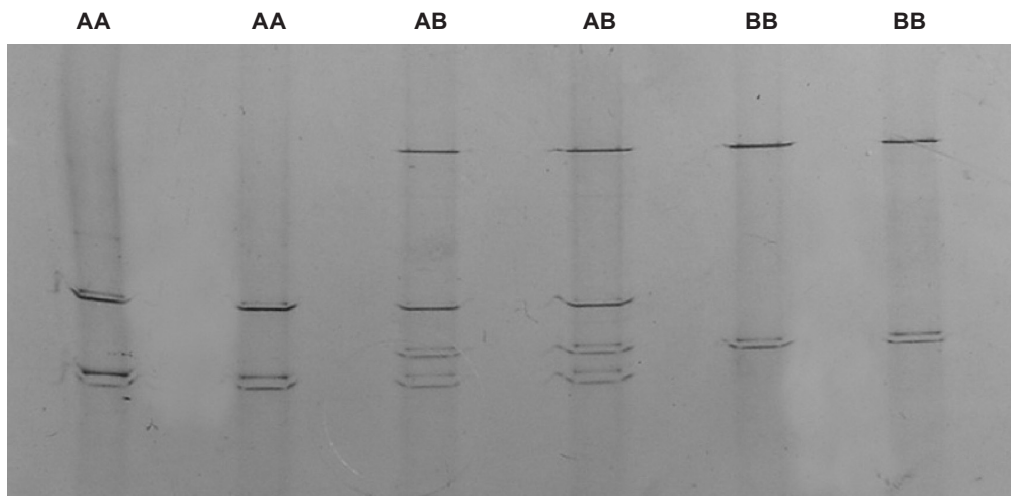


Figura 3. Patrones de corrida de las variantes alélicas de κ -CN obtenidas por PCR-SSCP en Ganado Hartón del Valle donde se presentan los genotipos homocigotos AA y BB y el heterocigoto AB.

fijación, tinción y revelado, además de los costos de refrigeración, así como un equipo más económico. La detección de las variantes se logró con electroforesis a 200 v durante cuatro horas, por lo cual se disminuyó el tiempo de 14 horas recomendado por otros autores (Barroso *et al.*, 1998). Para una detección óptima se puede aumentar a ocho horas, pero para efectos diagnósticos solo se requirieron cuatro horas. Aunque algunos autores (Fan *et al.*, 1993; Cai y Touitou, 1993; Barroso *et al.*, 1998) recomiendan la purificación de los productos de PCR para PCR-SSCP con el fin de evitar exceso de primers o iniciadores que puedan alterar los patrones de bandas, no fue necesario realizarlo, lo que redujo los costos de la técnica.

La detección de los alelos de la κ -caseína utilizando PCR-SSCP tiene la ventaja con relación a la técnica PCR-RFLP que se evita la digestión del fragmento amplificado con tres enzimas de restricción HinfI, HaeIII y Tail proceso costoso por el alto precio de las enzimas y porque cada digestión debe hacerse de manera independiente.

Equilibrio Hardy-Weimberg: Las frecuencias alélicas fueron: $f(A) = 0.681$, $f(B) = 0.319$. La población muestreada resultó en equilibrio ($P \leq 0.05$), aunque el tamaño de muestra es pequeño para hacer inferencias poblacionales. La frecuencia del alelo B (0.319) en Ganado Hartón del Valle fue mayor que en Holstein en EEUU (0.18) (Van Eenennaan y Medrano (1991) y Colombia (0.24) (López *et al.*, 1999). Similar a Bovinos Criollos de Argentina (0.30) (Poli *et al.*, 2002) y menor a los Bovinos Criollos de Uruguay (0.47) Postiglioni *et al.*, (2002), Bovinos Criollos de Argentina (Liron *et*

al., 2002) y a Criollo de la Patagonia (0.395) y Bolivia (0.645) (Liron *et al.*, 2002).

Mediante técnicas moleculares es posible identificar animales portadores del genotipo de interés de cualquier sexo y edad, en forma rápida, lo cual representa una ventaja para los propietarios de hatos lecheros. El incremento de la frecuencia alélica de la variante B es una de las vías para mejorar la eficiencia lechera para su transformación en queso. Para una raza que presente una frecuencia alélica de 0.25 para el alelo B de la kappa-caseína, es posible aumentar la frecuencia alélica si solo se utilizaran toros con el genotipo BB; la frecuencia de este alelo ascendería al 60% en la primera generación y se situaría alrededor del 100% en pocas generaciones (Prinzenberg *et al.*, 1996).

Se recomienda la realización del estudio poblacional completo, utilizando la técnica SSCP, ya que se conocen los patrones de bandas que se obtienen para los alelos A y B y utilizar enzimas de restricción únicamente en el caso de que se obtenga un patrón de bandas diferente del reportado, para reducir drásticamente los costos.

BIBLIOGRAFIA

- Barroso, A; Dunner, S; Cañón, J. (1998) Technical note: Detection of Bovine Kappa-casein variants A, B, C, y E by Means of Polymerase Chain Reaction-single strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). *J. Anim. Sci.* 76:1535-1538.
- Braunschweig, M; Hagger, C; Stranzinger, G; Puhan, Z. (2000) Associations between casein haplotypes and milk production traits of Swiss Brown Cattle. *J. Dairy Sci.* 86(6) 564-569.
- Cai, Q-Q; Touitou, I. (1993) Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. *Nucleic Acids Res.* 21(16):3909-3910.

- Casas, I; Valderrama, M. (1998) El bovino Criollo Hartón del Valle. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.
- Chessa, S; Budelli, E; Gutscher, K; Caroli, A; Erhardt, G. (2003) Short Communication: Simultaneous Identification of Five k-casein (CSN3) Alleles in Domestic Goat by Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism. *J. Dairy Sci.* 86(11): 125-126.
- Fan, E; Levin, D; Glickman, B; Logan, D. (1993) Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutation Res.* 288:85-92.
- Ginger, M; Grigor, M. (1999) Comparative aspects of milk caseins. *Comp. Bioch. Phys. Part B* 1999; 124:133-145.
- Hoelzel A. (1998) Molecular Genetic Analysis of Populations. 2nd ed. New York: Oxford University Press.
- Klug, W; Cumming, M. (1999). Conceptos de genética. 5 ed. Madrid: Prentice Hall Iberia.
- Liron, J. P; Ripoli, M. V ; De Luca, J. C ; Peral-García, P; Giovambattista, G. (2002) Analysis of genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian Creole cattle using five loci related to milk production. *Genet Mol Biol Sao Paulo.* 24 (4): 413-419.
- López, M; Hernández, V; Estrada, L (1999); Correlación entre haplotipos para la k-caseína y características de producción láctea en Bovinos Holstein. *Rev Colomb Biotecnol.* 2 (2); 16-20
- Miller, S; Dykes, D; Polesky, H. (1998) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid. Res* 16:1215.
- Muysson, J; Verrinder, A. (1989) The alteration of milk content by genetic engineering and recombinant DNA-mediated selection techniques. *Can. J. Anim. Sci.* 69(3):517-527.
- Orita, M; Suzuki, Y; Sekiya, T; Hayashi, K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the Polymerase Chain Reaction. *Genomics* 5:874-879.
- Poli M. A., Holgado F. y Rabasa A. E (2002). Frecuencias genotípicas y alélicas de los genes de caseína k y la lactoglobulina B en un rodeo de bovinos criollos en Argentina. *En: Simposio Iberoamericano sobre la conservación de los recursos zoogenéticos locales y el desarrollo rural*, 3,25-27 nov, 2002: Montevideo, Uruguay - UDELAR.. p.12.
- Postiglioni, A., G. Rincón, L. Kelly, S. Llambí, G. Fernández, M. Angelo, G. Gagliardi, J. Trujillo, M. de Bethencourt, K. Guevara, A. Castellano y Arruga M. V (2002) Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. Análisis con marcadores moleculares. *Arch. Zootec.* 51; 195-202.
- Prinzenberg, E; Hiendleder, S; Ikonen, T; Erhardt, G. (1996) Molecular genetic characterization of new bovine kappa-casein alleles CSN3F and CSN3G and genotyping by PCR-RFLP. *Anim. Gen.*; 27:347-349.
- Sambrook, J; Russell, D. (1991) Molecular Cloning: A laboratory Manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Van Eenennaan A. and Medrano J. F (1991). Differences in alelic protein expression in the milk of heterozygous k-casein cows. *J. Dairy Sci.* 74:1491-1496.