

Identificación de polimorfismos del gen de la Kappa caseína bovina: Nariño-Colombia*

Carlos Eugenio Solarte Portilla**, Carol Yovanna Rosero Galindo***, Heiber Cárdenas Henao***, William Orlando Burgos Paz****, Johanna Melissa Eraso Cabrera*****, Gema Lucía Zambrano Burbano*****

Resumen

Introducción. El uso de tarjetas para la colección, almacenamiento y conservación de sangre no es frecuente en investigaciones de biología molecular, donde se prefiere la recolección y conservación en tubos Vacutainer con ácido etileno-diamino-tetraacético como anticoagulante. Sin embargo, por las condiciones topográficas de la zona de estudio, el uso de metodologías convencionales, con transporte refrigerado de las muestras, resulta poco apropiado por las dificultades de acceso a las fincas y las grandes distancias entre hato y hato. **Objetivo.** Estandarizar la técnica (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos de cadena simple) para la identificación de polimorfismos del gen de la kappa-caseína en ejemplares de las razas Holstein, Normando, Jersey y Pardo Suizo en la cuenca lechera del Trópico Alto de Nariño. **Material y métodos.** Se tomaron muestras de sangre de 1087 ejemplares, utilizando tarjetas para la recolección, almacenamiento y preservación del tejido y su posterior análisis en el laboratorio. **Resultados.** Para obtener productos amplificados de alta calidad fue suficiente un disco de 1.2 mm y un tiempo de separación electroforética de 16 horas a 160V. **Conclusión.** Esta investigación permite concluir que las tarjetas fueron un medio eficiente, ya que facilitan el transporte y almacenamiento de tejido sanguíneo y evitan el uso de refrigeración para la conservación de la muestra durante períodos largos de tiempo.

Palabras clave: Gen de la Kappa caseína, DNA, Holstein, Normando, Jersey, Pardo Suizo.

Artículo recibido 17-02 de 2009, última revisión 10-09 de 2009

Identification of polymorphisms of the bovine kappa casein gen. Nariño-Colombia

Abstract

Introduction. The use of cards to collect, store and conserve blood is not enough in molecular biology research, in which these processes are preferably done with Vacutainer tubes with ethylene diamine tetra-acetic acid as an anti coagulant. However, due to the topography of the zone in which such research takes place, the use of conventional methods, with refrigerated transportation of the samples, is not adequate because of the difficult access conditions in the farms and the long distance between herds. **Objective.** To standardize the technique (chain reaction of simple chain polymerase-polymorphisms) for the identification of polymorphisms of the kappa-casein gen in Holstein, Norman, Jersey and Brown Swiss cattle in the dairy basin of the Nariño's high tropical zone. **Material and methods.** Blood samples were taken from 1087 animals, using cards for collecting, storing and keeping the tissues for their analysis in the laboratory. **Results.** To obtain high quality amplified products, one 1.23 mm disc and an electrophoretic time of 16 hours at 160 V were sufficient. This research work allows to conclude that cards were an efficient mean, because they make transportation and storing of blood tissue easy and avoid the use of refrigeration to keep the samples during long periods of time.

Key words: Kappa casein gen. DNA. Holstein. Norman. Jersey. Brown Swiss.

* Este artículo hace parte del Proyecto: 048-2/06 "Determinación de las frecuencias alélicas de los genes de la kappa caseína en la población bovina lechera del Trópico Alto de Nariño"; iniciado en julio de 2006 y finalizado en diciembre de 2008. El proyecto en mención hace parte del Programa de Mejoramiento Genético de los bovinos lecheros del Trópico Alto de Nariño. Financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, CIAT y FEDEGAN.

** Zootecnista. M.Sc. Dr.Sc, Director General, Programa de Mejoramiento Genético Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, programa de Zootecnia csolarte@udenar.edu.co.

*** Biólogos. M.Sc. Dr.Sc, Asesores moleculares, Programa de Mejoramiento Genético Universidad de Nariño.

**** Zootecnista. Candidato a Maestría en Ciencias Animales, Investigador, Programa de Mejoramiento Genético, Universidad de Nariño, Docente Corporación Universitaria Lasallista.

***** Estudiantes de Zootecnia, Investigadoras en formación, Programa de Mejoramiento Genético, Universidad de Nariño.

Identificação de polimorfismos do gene da Kappa caseína bovina. Nariño-Colômbia

Resumo

Introdução. O uso de cartões para a coleção, armazenamento e conservação de sangue não é freqüente em investigações de biologia molecular, onde se prefere a recolha e conservação em tubos vacutainer com ácido etilen-diamino-tetraacético como anti-coagulante. No entanto, pelas condições topográficas da zona de estudo, o uso de metodologias convencionais, com transporte refrigerado das mostras, resulta pouco apropriado pelas dificuldades de acesso às herdades e as grandes distâncias entre produtores e produtores. **Objetivo:** Estandarizar a técnica (reação em corrente da polimerasa-polimorfismos de corrente simples) para a identificação de polimorfismos

do gene da kappa- caseína, em exemplares das raças Holstein, Normando, Malha e Pardo Suíço na fonte leiteira do Trópico Alto de Nariño. **Material e métodos.** Tomaram-se mostras de sangue de 1087 exemplares, utilizando cartões para a recolha, armazenamento e preservação do tecido e sua posterior análise no laboratório. **Resultados.** Para obter produtos amplificados de alta qualidade foi suficiente 1 disco de 1.2 mm e um tempo de separação electroforética de 16 horas a 160V. **Conclusão.** Esta investigação permite concluir que os cartões foram um meio eficiente, já que facilitam o transporte e armazenamento de tecido sanguíneo e evitam o uso de refrigeração para a conservação da mostra durante períodos longos de tempo.

Palavras chaves: Gene da Kappa caseína, DNA, Holstein, Normando, Malha, Pardo Suíço.

Introducción

Muchos países han modificado los objetivos de selección de las características a mejorar genéticamente, orientándose al incremento de sólidos lácteos, longevidad, resistencia a mastitis y mayores tasas de fertilidad (San primitivo Tirados 2001¹). Para alcanzar estos objetivos, se han propuesto estrategias basadas principalmente en el mejoramiento de caracteres cuantitativos a partir de mediciones fenotípicas realizadas en individuos adultos con un progreso genético lento y costoso y un intervalo generacional prolongado como el caso de los bovinos.

Actualmente, con el uso de herramientas moleculares se han logrado extraordinarios avances en el mejoramiento genético de diferentes sistemas de producción, por medio de la estimación de la variabilidad genética a través del estudio de polimorfismos de ADN², identificación de secuencias asociadas a caracteres productivos³, aplicación de tecnologías moleculares para la identificación de loci asociados a características cuantitativas *Identification of quantitative trait loci* por sus siglas en inglés (QTL)⁴, diagnósticos moleculares de enfermedades como mastitis⁵, secuencia de genes asociados con la mortalidad embrionaria temprana⁶ y un énfasis especial en el estudio de los polimorfismos de los genes que codifican las proteínas de la leche⁷⁻⁹.

La kappa caseína (K-CSN) es una de las proteínas, presentes en la leche, más estudia-

das en *Bos taurus*⁸⁻¹⁰, por su importante papel en la industrialización, especialmente en la producción de queso.

Estudios moleculares permiten establecer variantes alélicas involucradas en la expresión del gen K-CSN, y relacionadas con la producción y la calidad de la leche. Este conocimiento constituye una herramienta de aplicación directa en los programas de mejoramiento genético de una población (Chessa *et al.* 2007¹¹; Boettcher *et al.* 2004¹²).

La técnica de PCR-SSCP (por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism*) ha sido ampliamente utilizada en la identificación de los polimorfismos génicos de las caseínas y de otras proteínas (Bonifacio *et al.* 2001¹³). Esta técnica se basa en la migración de moléculas de ADN denaturado a través de geles no denaturantes de poliacrilamida, de acuerdo con las diferencias presentes en la secuencia de nucleótidos, de manera que dos fragmentos de PCR (por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) difieren por puntos de mutación que permiten la movilidad diferencial sobre el gel¹⁴.

Para realizar este análisis, es de vital importancia contar con una muestra de tejido que permita la extracción de ADN de excelente calidad. Las tarjetas FTA^{®15} constituyen un eficaz método de recolección, almacenamiento y transporte de muestras de tejido como sangre periférica,

entre otros. Con ventajas como la facilidad para la recolección de sangre, el transporte de las muestras a lugares con topografía difícil como en la región del trópico alto de Nariño y su almacenamiento sin necesidad de refrigeración. (Burgos-Paz *et al.* 2007²).

El objetivo de este estudio, fue estandarizar el protocolo que permite identificar los polimorfismos para el fragmento del gen de la K-CSN descrito por Barroso *et al* 1998, en muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA[®]. (Por sus siglas en inglés *Fast Technology for Analysis of nucleic acids*).

Materiales y métodos

Zonas de muestreo

Se tomaron 1087 muestras de sangre correspondientes a *Bostaurus*, de las cuales 807 fueron de la raza Holstein, 20 Jersey, 81 Normando, 27 Pardo y 152 de animales cruzados, en 93 fincas localizadas en los distritos lecheros de Pasto, Pupiales y Guachucal. Las coordenadas geográficas y las principales características climáticas de estos tres distritos. Se aprecian en la tabla 1.

Tabla 1. Coordenadas geográficas y principales características climáticas de los tres distritos lecheros del departamento de Nariño – Colombia.

Distrito	Coordenadas	Altitud msnm	Precipitación media mm/año	Temperatura media °C
Pasto	1°, 12', 41'' Latitud norte 77°, 16', 52'' Longitud oeste	2527	960	14
Pupiales	0°, 52', 21'' Latitud norte 77°, 38', 34'' Longitud oeste	2900	960	11
Guachucal	0°, 57', 50'' Latitud norte 77°, 44', 04'' Longitud oeste	3087	940	4

Recolección y almacenamiento de las muestras.

La toma de muestras se inició con la desinfección del área correspondiente a la inserción de la cola de cada ejemplar con alcohol industrial y algodón, luego se ubicó la vena coccígea para extraer 2 cc. de sangre periférica mediante punción con jeringas estériles sin anticoagulante (figura 1).

Una vez extraídas, las muestras de sangre periférica se almacenaron en tarjetas FTA[®] 15. Para ello, se impregnó rápida y cuidadosamente cada fluido sanguíneo en uno de los pozos de la tarjeta. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente en un lugar aséptico para evitar contaminación, luego, se envolvieron en papel aluminio y se almacenaron en un lugar

fresco y ausente de humedad, para continuar el proceso en el laboratorio.

Extracción de ADN usando kit FTA[®] de Whatman Bioscience

Sobre una base estéril (Harris Cutting Mat) se extrajo cuidadosamente un disco de 1.2 mm de la tarjeta FTA[®] con ayuda del sacabocados Micro-puncher que viene con el kit. El disco se transfirió a un tubo de 1.5 ml para continuar con el proceso de purificación del ADN como lo describe la casa fabricante. (Figura 2).

En el tubo que contenía el disco, se adicionó 200 µl de reagente (FTA[®] Purification reagent) y mientras se agitaba por inversión se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos.

Luego, se descartó el reagente, evitando remover el disco del tubo. Este proceso de adición, incubación y descarte del reagente se repitió dos veces más.

Posteriormente, se lavó el ADN contenido en el disco adicionando 200 µl de Buffer TE (10mM Tris-HCL, 0.1 mM EDTA, pH 8.0), y se incubó

por cinco minutos, agitando por inversión. Pasado el tiempo de incubación el buffer fue descartado, repitiendo este proceso dos veces. Finalmente, el disco se transfirió a tubos de 0,2 ml y se secó a 56° C por 10 minutos en un termociclador (MyCycler™ Termal Cyler de Biorad). Los discos se conservaron en este tubo para su posterior amplificación.



Figura 1. Impregnación, secado y almacenamiento de muestras de sangre periférica en tarjetas FTA® (Whatman Bioscience, 2003¹⁵). De izquierda a derecha: la impregnación de la muestra de sangre periférica sobre las tarjetas FTA®, el proceso de secado a temperatura ambiente de las tarjetas FTA® y el almacenamiento a temperatura ambiente de las tarjetas FTA®



Figura 2. Proceso de corte de un disco de 1.2mm (a la izquierda) y transferencia del mismo a un tubo eppendorf de 1.5mL de una muestra de sangre periférica almacenada en tarjeta FTA®.

Amplificación por PCR-SSCP del fragmento del gen K-CSN

La amplificación del gen de la kappa caseína se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por¹⁴ en un termociclador My Cyler™ de

BIORAD. y se hicieron los ajustes para la utilización de discos FTA®. Un fragmento de 453 pares de bases (pb) fue amplificado usando un disco FTA® de de 1.2 mm, el cual contiene aproximadamente 25ng de ADN según lo indicado por la casa comercial que produce las

tarjetas en un volumen total de 20 µl, con Buffer de PCR 1X (Promega) 20 pmol de cada cebador 5'-TGT GCT GAG TAG GTATCC TAG TTATGG-3'; y, 5'-GCG TTG TCT TCT TTGATG TCT CCT TAG-3'), sintetizados en IDT (Integrated DNA Technologies, INC), 2 mM de MgCl₂ (Promega), 200 mM de dNTP's (Promega), y 2 U de *Taq* polimerasa (Promega).

Las muestras fueron sometidas a 94° C por 5 minutos, seguidas de 35 ciclos a 94° C por 1 minuto, 65° C por 1 minuto, y 72° C por 2 minutos y finalmente, se realizó una extensión de 72° C por 5 minutos.

Electroforesis de los productos amplificados de kappa-caseína

Se mezclaron 2 µl de cada producto amplificado con 2 µl de buffer de carga (0.05% Xylene – Cianol, 0.05% azul de bromofenol, 5.5mM de EDTApH8.0). Las muestras se desnaturalizaron en un termociclador (My Cycloer™ de BIORAD), a 95° C por 5 minutos y luego se enfriaron en hielo para evitar que el ADN se renaturalice. Finalmente, los productos amplificados fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 12% (relación de acrilamida: N`N`bis-acrilamida de 100:1); preparada con TBE 1X y 5% de glicerol, en una cámara de electroforesis vertical (OWL- Penguin Emperor). Las muestras se corrieron durante 16 horas a 160 voltios en buffer TBE 1X.

Tinción de los geles de poliacrilamida con nitrato de plata

La fijación de los fragmentos amplificados se realizó adicionando 300 ml de la solución fijadora PRE (Acido Acético Glacial al 0.5% y Etanol al 10%) al gel, y dejando actuar por 10 minutos. Luego se tiñó durante 15 minutos, con 300 ml de solución de Nitrato de plata (500 mg de Nitrato de plata) y se reveló usando 300 ml de solución reveladora (9g de Hidróxido de Sodio y 1ml de Formaldehído al 37%).

Por último, los fragmentos revelados fueron fijados con 300 ml de solución fijadora POST (Acido Acético Glacial al 0.5% y Etanol al 10%.) durante cinco minutos. Para eliminar el exceso

de hidróxido de sodio se lavó el gel 3 veces con agua corriente y se conservó en papel cristal frío a temperatura ambiente.

Resultados y discusión

En total se muestrearon 1087 animales y se identificó sin ambigüedades el genotipo de 1017, lo que indica que el método de conservación de muestras de sangre en FTA®, fue altamente efectivo para el análisis molecular. Es importante destacar que luego de colectar las muestras y dejar secar las tarjetas, éstas se envolvieron en papel aluminio y se conservaron a temperatura ambiente. Esta es una de las principales ventajas que tiene este método de almacenamiento de muestras, ya que dadas las condiciones de campo, la colección directa de sangre está condicionada a un sistema de almacenamiento refrigerado para evitar el daño y la baja calidad del ADN. Por otro lado, el tamaño de estas tarjetas, permite guardar una gran cantidad de muestras en el menor espacio posible.

La composición de las tarjetas, permite obtener ADN de excelente calidad², no obstante la imposibilidad para estimar la cantidad de ADN presente en cada disco FTA®. De ahí la importancia de estandarizar esta técnica con un número diferente de discos por reacción.

En la figura 3 se pueden observar, los genotipos correspondientes al fragmento del gen de la kappa caseína encontrados en la población analizada. La inclusión de un control negativo permitió establecer la limpieza de la reacción PCR-SSCP; además, se garantizó que los genotipos observados correspondieran a los reportados por Barroso y colaboradores al incluir muestras con genotipos conocidos y analizados previamente con la técnica PCR-RFLP (por sus siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Conclusión

Los ensayos realizados permitieron concluir que es posible obtener amplificados del gen de la k-caseína con solo un disco FTA de 1.2 mm previamente purificado y con las recomendaciones realizadas en este estudio.

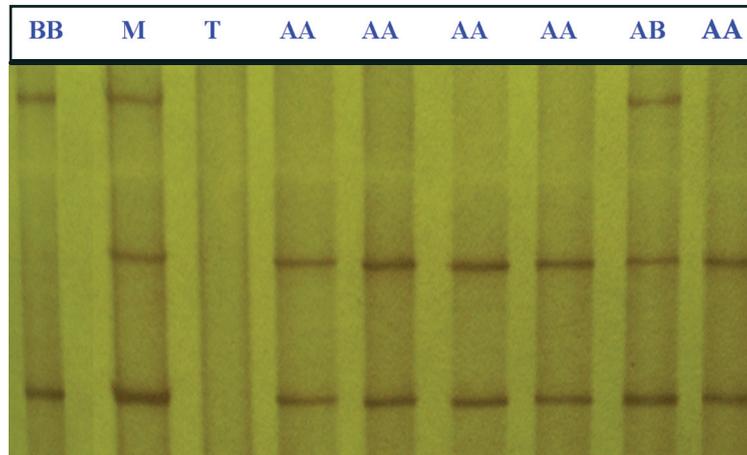


Figura 3. Patrones de bandas generadas por la técnica PCR-SSCP, del gen de la kappa-caseína en bovinos, visualizadas en geles no denaturantes de poliacrilamida al 12%. Aquí se puede distinguir la separación electroforética de los alelos presentes correspondientes a las configuraciones alélicas A y B.

Agradecimientos

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, CIAT y FEDEGAN por la financiación del Programa de Mejoramiento Genético Asistido con Marcadores de ADN. A la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. A la Universidad del Valle. A la Universidad de Nariño y a la Cooperativa de productos lácteos de Nariño-Colácteos.

Referencias

1. SAN PRIMITIVO TIRADOS, Fermín. La mejora genética animal en la segunda mitad del siglo XX. En: Archivos de Zootecnia. Diciembre, 2001. vol. 50, no. 192, p. 517-546.
2. BURGOS-PAZ, William, *et al.* Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA para la especie *Cavia Porcellus* lin. (rodentia: caviidae). En: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Febrero, 2007. vol. 20, no. 1, p.67-72.
3. SOLARTE-PORTILLA, Carlos Eugenio, *et al.* Frecuencias alélicas del gen Kappa caseína en la raza Holstein del trópico alto de Nariño – Colombia. *Livestock Research for Rural Development*. [En línea]. Noviembre- Enero, 2009. vol. 21, no. 1 [citado 19 noviembre de 2008] Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd21/1/sola21003.htm>
4. WELLER, Joel Ira, *et al.* Detection and analysis of quantitative trait loci affecting production and secondary traits on chromosome 7 in Israeli Holsteins. En: *Journal Dairy of Science*. October, 2008. vol. 91, p.802-813.
5. YOUNG, FJ, *et al.* In vitro peripheral blood mononuclear cell proliferation in a crossbred cattle population. En: *Journal Dairy of Science*. March, 2005. vol. 88, no. 7, p.2643-2651.
6. KHATIB, H, *et al.* The Association of Bovine *PPARGC1A* and *OPN* genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. En: *Journal Dairy of Science*. February, 2007. vol. 90, no. 6, p. 2966-2970.
7. KEATING, Aileen F; KENNELLY, John J. and ZHAO, Feng-Qi. Characterization and regulation of the bovine stearoyl- CoA desaturase gene promoter. En: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. May, 2006. vol. 344, no. 1, p. 233-240.
8. TSIARAS, M, *et al.* Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. En: *Journal Dairy of Science* January, 2005. vol. 88, no. 1, p.327-334.
9. PRINZENBERG, EM, *et al.* Polymorphism of the bovine *CSN1S1* promoter: linkage mapping, intragenic haplotypes, and effects on milk production traits. En: *Journal Dairy of Science*. August, 2003. vol. 86, no. 8, p. 2696-2705.
10. UFFO, O, *et al.* Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas

- cubanas. En: Animal Genetic Resources Information. January, 2006. vol. 39, p. 15-24.
11. CHESSA, S, *et al.* Development of a single nucleotide polymorphism genotyping microarray platform for the identification of bovine milk protein genetic polymorphisms. En: Journal Dairy of Science. January, 2007. vol. 90, no. 1, p. 451-464.
 12. BOETTCHER, PJ, *et al.* Effects of casein haplotypes on milk production traits in Italian Holstein and brown swiss cattle. En: Journal Dairy of Science. December, 2004. vol. 87, no. 12, p. 4311-4317.
 13. BONIFACIO, C, *et al.* Single-strand conformation polymorphism (sscp) análisis of Alfa s1-casein, beta-casein and Kappa-casein genes in Charnequeia portuguese indigenous gota breed. En: Archivos de Zootecnia. June, 2001. vol. 50, no. 189-190, p. 105-111.
 14. BARROSO, A; DUNNER, S and CAÑON, J. 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). En: Journal Animal of Science. June, 1998. vol. 76, no. 6, p. 1535-1538.
 15. WHATMAN. Room temperature sample collection, storage and purification of nucleic acids. [en línea]. London: Touch Briefings, 2003. [18, enero de 2008]. Disponible en: www.touchbriefings.com/pdf/16/fdd031_t_whatman.pdf