ITEA (2000). Vol. **96A N.° 3,** 302-310

CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS EN LA κ-CASEÍNA CAPRINA

M. Habib Yahyaoui, A. Coll, A. Sánchez, J.M. Folch

Unitat de Genètica i Millora, Departament de Patologia i Producció Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España

RESUMEN

Se ha analizado el polimorfismo de la k-caseína caprina mediante la técnica *Base Excision Sequence Scanning (BESS)* y secuenciación de ácidos nucleicos. Se han detectado siete posiciones polimórficas, tres de las cuales son silenciosas y las otras cuatro determinan cambio aminoacídico. La asociación entre estos polimorfismos ha sido estudiada y se han identificado tres alelos de la κ-caseína caprina, denominados A, B y C. Se han desarrollado protocolos para el genotipado de la variante C por PCR-RFLP utilizando los enzimas de restricción *Alw*44I y *Bse*NI. La frecuencia de este alelo es muy baja en las razas españolas, pero es más frecuente en la raza francesa Saanen. Serán necesarios estudios adicionales en diferentes poblaciones caprinas para establecer la distribución de estos alelos y determinar sus efectos sobre la calidad y propiedades funcionales de la leche.

SUMMARY

Polymorphisms in the goat k-casein gene were studied using the *Base Excision Sequence Scanning (BESS)* method and sequencing. Seven polymorphic sites were detected, three of these were silent mutations while the other four produced amino acid substitutions. The association between these polymorphisms was investigated, which resulted in the identification of three goat κ-casein alleles, designated A, B, and C. Protocols for rapid genotyping of the C variant were developed by PCR-RFLP using *Alw*44I and *Bse*NI restriction endonucleases. The occurrence of this allele was found to be very low in Spanish breeds but more frequent in the French Saanen goat. Further studies among different goat populations are necessary to establish the distribution of these alleles and their effects on the quality and functional properties of milk.

Introducción

La leche de los rumiantes contiene seis proteínas principales: las caseínas (αs1, αs2, β, y κ) y las proteínas del lactosuero (β-lactoglobulina y α-lactalbúmina). Las cuatro caseínas son el componente mayoritario, constituyendo el 76-86% de la proteína total de la leche (SWAISGOOD, 1992). La κ-caseína (κ-Cn) es esencial para la formación y estabilización de las micelas y tiene un efecto importante sobre las propiedades de la leche. Para la formación del cuajo en la producción del queso, es necesario la digestión de la κ-Cn, produciéndose la precipitación de las micelas. En bovino, se han descrito 6 varian-

tes (A, B, C, E, F, y G) de la κ-Cn (revisado en KAMINSKI *et al.*, 1996). Varios estudios han descrito que el genotipo BB de la κ-Cn determina unas mejores propiedades de la leche para la producción de queso (revisado en NG-KWAI-HANG, 1998). En particular, este genotipo ha sido asociado con un cuajo más firme, una reducción del tiempo necesario para la formación del cuajo y un incremento en el rendimiento en la producción de queso.

La κ-Cn caprina fue aislada de la leche por Zittle y Custer (1966) y su secuencia de 171 aminoácidos fue determinada posteriormente por MERCIER *et al.* (1976a, b). Debido a modificaciones post-traduccionales, la κ-Cn se muestra heterogénea en el análisis por electroforesis, con al menos 5 formas diferentes (ADDEO *et al.*, 1978). La secuencia nucleotídica del ADNc que codifica la κ-Cn caprina y la secuencia promotora del gen han sido aisladas y secuenciadas (COLL *et al.*, 1993, 1995). El gen de la κ-Cn comprende 5 exones, de los cuales el exón 4 contiene más del 90% de la región que codifica para la proteína madura.

En cabras destaca el extenso polimorfismo encontrado en el gen de la *αs1*-Cn. Además, las variantes encontradas han sido asociadas con diferencias en el contenido proteico de la leche, en la relación entre caseína y proteína total y en el rendimiento en la producción de queso (GROSCLAUDE *et al.*, 1994). Debido a la importancia de estos caracteres, se ha incluido el genotipado para la *αs1*-Cn en la evaluación de machos utilizados en inseminación artificial en Francia (BARBIERI *et al.*, 1995). También se ha encontrado polimorfismo en otras caseínas caprinas: tres variantes para el gen de la *αs2*-Cn (A, B, y C) y otras tres para el gen de la β-Cn (A, B, y O), siendo O un alelo nulo de la β-Cn. Por el contrario, no se han descrito variantes para las proteínas del lactosuero, aunque se han descrito diferentes formas que difieren en su movilidad electroforética (revisado en MOIOLI *et al.*, 1998). Recientemente, se han descrito polimorfismos en la región 3' no codificante y en la región promotora del gen de la β-lactoglobulina (PENA *et al.*, 2000; YAHYAOUI *et al.*, 2000).

Debido a la importancia de la κ-Cn en las propiedades tecnológicas de la leche, varios grupos han analizado esta proteína en cabras en busca de variantes genéticas, describiéndose la existencia de polimorfismos (DI LUCCIA *et al.*, 1990; JAUBERT y MARTIN, 1992; LAW y TZIBOULA, 1993; ANGULO *et al.*, 1994; RECIO *et al.*, 1997). Sin embargo, no se han caracterizado las diferencias en la secuencia de aminoácidos de las variantes encontradas. También, se ha descrito un polimorfismo de restricción (DI GREGORIO *et al.*, 1989) en el gen de la κ-Cn por digestión con BamHI, EcoRV y PvuII, e hibridación con una sonda correspondiente al cDNA de la κ-Cn bovina.

En este trabajo hemos evaluado la técnica Base Excision Sequence Scanning (BESS, HAWKINS y HOFFMAN, 1997) para la detección de mutaciones. Esta técnica consiste básicamente en la incorporación por PCR de cantidades limitadas de dUTP y en la posterior digestión del producto con los enzimas: Uracilo N-glicosilasa y Endonucleasa IV. La comparación de los patrones de bandas obtenidos en relación con una muestra control permite la detección de mutaciones en las que una timina está implicada.

El objetivo del presente trabajo fue el estudio del polimorfismo genético en el gen de la κ-Cn caprina. Se caracterizan, por primera vez, variantes del gen de la κ-Cn caprina, localizadas en el exón 4. Se desarrollan protocolos para el genotipado de las posiciones polimórficas y se estudian las frecuencias alélicas en diferentes razas caprinas.

Material y métodos

Muestras de animales

Un total de 147 muestras de ADN caprino han sido utilizadas en este estudio, incluyendo las razas Canaria, Malagueña, Murciano-Granadina, Payoya y Saanen. También se ha analizado una muestra de la cabra salvaje española (*Capra pyreneica sp. hispanica*). El ADN fue aislado a partir de muestras de sangre siguiendo protocolos estándar (AUSUBEL *et al.*, 1987).

Amplificación del gen de la κ-Cn caprina

Un fragmento de 459 pb del exón 4 de la k-CN caprina fue amplificado por PCR a partir de muestras de ADN genómico utilizando los *primers* Kb1 y Kb2 (figura 1), diseñados a partir de la secuencia del ADNc de la κ-Cn caprina (COLL *et al.*, 1993). Los *primers* Kb1 y Kb2 fueron marcados fluorescentemente en el extremo 5' con Hex y 6-Fam, respectivamente.

Detección de polimorfismo mediante el método BESS

Diez muestras de ADN de diferentes animales por cada raza fueron analizadas utilizando el método BESS. La reacción de PCR fue realizada con 200 μM *BESS T-Scan dNTP Mix*. Para la reacción de excisión, se utilizaron 5 μl del producto de PCR, 0,5 μl *BESS T-Scan Excision Enzyme Mix* y 0,6 μl del *BESS T-SCAN EXCISION ENZYME BUFFER*. La reacción fue incubada durante 20 min. a 37°C y enfriada en hielo. Se añadieron 25 μl de formamida y 1 μl del marcador de tamaños *GeneScan* 500 ROX (Perkin Elmer Applied Biosystems) y se desnaturalizó la muestra a 95°C durante 3 min. El producto obtenido fue analizado por electroforesis capilar y detección fluorescente utilizando un equipo de secuenciación automatizada (Genetic Analyzer 310, Perkin Elmer) y el software *GeneScan*. Gracias al marcaje de los dos *primers* con fluorescencias diferentes, se analizaron las dos cadenas del ADN simultáneamente.

Reacciones de secuenciación

Se secuenciaron directamente los productos de PCR para obtener una primera información de la secuencia nucleotídica. En las muestras donde se había encontrado polimorfismo, los productos de PCR se clonaron en plásmido (pTZ18U y pTZ19U), se aislaron clones para los diferentes alelos y se secuenciaron. Ambas cadenas del ADN fueron secuenciadas mediante el método dideoxi, utilizando un secuenciador automático de ADN (ABI Prism 310, Perkin Elmer). Varios clones para cada alelo fueron secuenciados para eliminar posibles errores en la reacción de PCR.

Genotipado mediante PCR-RFLP

Diez μl del producto de PCR fueron digeridos con 10 U del enzima de restricción *Alw*44I (Roche Molecular Diagnosys) a 37°C toda la noche y con *Bse*NI (Roche Molecular Diagnosys) a 65°C durante 6 horas. Los fragmentos obtenidos después de la digestión fueron separados por electroforésis en geles de agarosa al 2%.

Resultados

Detección de polimorfismo utilizando el método BESS

Un fragmento de 459 pb del exón 4 de la κ-Cn fue amplificado por PCR y analizado por el método BESS utilizando electroforesis capilar y detección fluorescente. Tres posibles posiciones polimórficas fueron detectadas, de las cuales 2 fueron confirmadas por secuenciación en las posiciones 471 y 509 de la secuencia del ADNc (figura 1). La tercera mutación detectada fue considerada un artefacto debido a que se localizaba en una región muy próxima al *primer* fluorescente, donde la señal y el ruido de fondo son muy elevados.

Análisis de la secuencia nucleotídica del exón 4 de la κ-Cn

Los productos de PCR de diferentes animales y razas fueron secuenciados. Se confirmaron las mutaciones previamente encontradas con el método BESS en las posiciones 471 y 509 y se identificaron 5 mutaciones adicionales en las posiciones 245, 284, 309, 583 y 591 (figura 1).

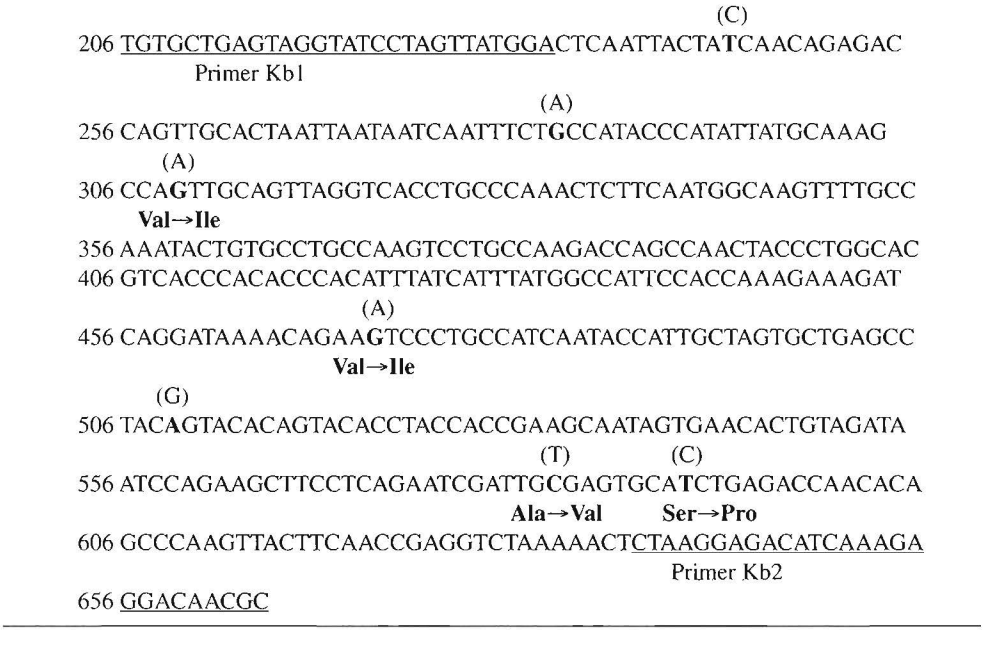


Figura 1. Secuencia nucleotídica del exón 4 de la k–Cn caprina. La numeración en el margen izquierdo corresponde a la secuencia del ADNc de la k–Cn caprina (GeneBank X60763). El doble subrayado indica la localización de los primers Kb1 y Kb2. En negritas se resaltan las posiciones polimórficas. Los nucleótidos alternativos en cada posición polimórfica se indican entre paréntesis. Las substituciones aminoacídicas se indican debajo de la secuencia

Un total de 7 posiciones polimórficas fueron detectadas en la región amplificada (459 pb) del exón 4 de la κ-Cn (figura 1). Todas corresponden a mutaciones puntuales y concretamente a transversiones en las que una T es substituida por una C o bien una G es substituida por una A. Cuatro posiciones polimórficas determinan un cambio aminoacídico en la proteína: de valina a isoleucina (en las posiciones 309 y 471), de alanina a valina (583), y de serina a prolina (591) (figura 1). Las otras tres mutaciones son silenciosas.

Caracterización molecular de nuevas variantes para el gen de la κ-Cn

Los productos de PCR correspondientes a animales de diferentes razas fueron clonados y secuenciados para establecer los haplotipos de las diferentes mutaciones detectadas. Dos clones independientes de cada animal fueron secuenciados.

En el cuadro 1 se muestran las variantes de la κ-Cn y los cambios aminoacídicos producidos. Las variantes identificadas se denominan κ-Cn A, B y C. La κ-Cn A corresponde a la secuencia nucleotídica del ADNc de la κ-Cn previamente descrita (Coll *et al.*, 1993). También se secuenció el exón 4 de la κ-Cn de la cabra salvaje, encontrándose que es diferente a la secuencia nucleotídica de los tres alelos caprinos.

Las variantes A y B difieren sólo en un aminoácido en la posición 119 (A: Valina; B: Isoleucina). La κ-Cn A difiere de la variante C en cuatro substituciones aminoacídicas (Posiciones 65 y 119: Valina/Isoleucina; Posición 156: Alanina/Valina; Posición 159: Serina/Prolina). La primera substitución aminoacídica (posición 65) se localiza en la región N-terminal de la proteína (para-κ-Cn), mientras las otras tres substituciones se localizan en la región C-terminal (caseinomacropéptido).

Genotipado por PCR-RFLP

Se han desarrollado protocolos PCR-RFLP para la detección de las mutaciones localizadas en las posiciones 309 y 591, ambas producen un cambio de aminoácido. El polimorfismo en la posición 309 (G/A) afecta a la diana de restricción *Bse*NI, que se encuentra en las variantes A y B, pero no en la variante C. La digestión del fragmento de 459 pb del exón 4 de la κ-Cn produce tres fragmentos de 54, 51, y 354 pb en los alelos A y B, mientras que el alelo C genera sólo dos fragmentos de 54 y 405 pb. La substitución nucleotídica en la posición 591 (T/C) determina la aparición de una diana de restricción *Alw*44I en el alelo C. Por tanto, la digestión del alelo C con esta endonucleasa produce dos fragmentos (78 y 381 pb) mientras que los productos de PCR de los alelos A y B no son digeridos.

El genotipado de 147 animales de diferentes razas Francesas y Españolas utilizando los dos métodos PCR-RFLP, indicaron que las dos posiciones polimórficas se encuentran siempre ligadas: G/A en la posición 309 con T/C en la posición 591. Por tanto, las variantes A y B pueden distinguirse de la variante C utilizando cualquiera de los dos métodos de genotipado por PCR-RFLP. En el cuadro 2 se muestran las frecuencias génicas obtenidas para estas variantes en las razas caprinas estudiadas.

Discusión

Un fragmento de 459 pb del exón 4 que contiene gran parte de la región codificante

de la κ–Cn caprina (141 aminoácidos de un total de 171), fue amplificado por PCR y se realizó un análisis por el método BESS y por secuenciación para la búsqueda de variantes genéticas. Se identificaron 7 posiciones polimórficas, de los cuales 2 fueron detectadas por el método BESS y 5 por secuenciación.

Debido a que todas estas mutaciones implican un cambio de una timina en una de las cadenas de ADN, deberían ser detectadas por el método BESS. Sin embargo, sólo se detectaron 2 de las 7 mutaciones y no se encontraron diferencias en el patrón de picos generados con el método BESS en las otras 3 mutaciones. Este resultado puede ser explicado por una actividad no específica del enzima de excisión del sistema BESS, cuya actividad depende de la secuencia nucleotídica en la que se encuentra la posición polimórfica. Por tanto, la técnica parece tener limitaciones de sensibilidad en la detección de mutaciones, principalmente en los extremos de la región analizada. Además, las mutaciones identificadas fueron todas detectadas en la cadena marcada con 6-Fam y no en la cadena marcada con Hex, a pesar de que ambas fluorescencias dieron picos de similar intensidad.

De las 7 posiciones polimórficas, 3 corresponden a substituciones silenciosas y las otras 4 determinan cambios aminoacídicos (figura 1). Estas 7 mutaciones son las que diferencian las tres variantes genéticas de la κ–Cn caprina encontradas, denominadas κ–Cn A, B y C (cuadro 1). Las variantes A y B difieren sólo en una substitución aminoacídica en la posición 119, mientras que la variante C difiere de la A en cuatro substituciones aminoacídicas. Las variantes A y B pueden distinguirse de la variante C utilizando cualquiera de los dos protocolos PCR-RFLP descritos anteriormente.

A pesar de que diferentes estudios habían descrito la existencia de polimorfismo en la κ–Cn caprina, no se había caracterizado ninguna variante. MERCIER *et al.* (1976a) secuenció el caseinomacropéptido a partir de la leche de una cabra Alpina-Saanen y describió la presencia en la posición 119 de dos posibles aminoácidos: valina o isoleucina. Estos autores sugirieron que el animal secuenciado era heterocigoto, pero postularon que la isoleucina era el aminoácido más probable en esta posición para la κ–Cn caprina debido a que se encontraba en otras especies relacionadas. Por el contrario, en la secuenciación del ADNc de la κ–Cn caprina (COLL *et al.*, 1993) se encontró el codón que codifica para la valina en esta posición. Esta secuencia de aminoácidos corresponde a la κ–Cn A, mientras que la substitución de valina por isoleucina en la posición 119 corresponde a la variante B.

Otros trabajos describieron la presencia de variantes de la κ–Cn que se caracterizaban probablemente por uno o más cambios aminoacídicos en la región N-terminal de la proteína: Di LUCCIA *et al.* (1990) en una raza local Italiana y Law y Tziboula (1993) en una población Británica de la raza Saanen y en una población comercial Griega. La variante encontrada corresponde a la substitución de una arginina por un residuo neutro (Di LUCCIA *et al.*, 1990). Esta variante no se correspondería a ninguno de los tres alelos descritos en el presente trabajo, ya que sólo la variante C sufre un cambio aminoacídico en la región N-terminal, pero éste no tiene efecto sobre la carga neta de la proteína.

La variante C se ha encontrado con frecuencias bajas en las razas españolas Murciano-Granadina y Canaria, pero no se ha encontrado en las razas Malagueña y Payoya. Sin embargo, el pequeño número de animales analizado no permite afirmar que esté ausente en estas razas. La frecuencia del alelo C en la raza francesa Saanen es más elevada (10%) (cuadro 1). La selección artificial para la producción de leche podría

haber influido en la distribución de estas frecuencias de la κ–Cn, siendo la Saanen francesa una raza muy seleccionada. En este sentido, el análisis del patrón de substituciones nucleotídicas entre secuencias del gen de la κ–Cn de diferentes especies de la familia *Bovidae* (que incluye la cabra), sugiere que una selección positiva ha acelerado la divergencia de la región codificante del gen (WARD *et al.*, 1997). Sin embargo, los efectos de la selección positiva en la distribución de los alelos de la κ–Cn tendría que ser evaluada en un estudio más amplio. Por el contrario, la distribución de alelos de la *αs1*-Cn caprina, estudiada en un número relativamente grande de animales de diferentes razas, no parece estar afectada significativamente por la selección para la producción de leche (JORDANA *et al.*, 1996). Probablemente, la deriva genética y el efecto fundador han jugado un papel importante en la distribución de las frecuencias alélicas de los genes de las proteínas lácteas.

Los aminoácidos de las posiciones 119 (isoleucina) y 159 (prolina) de la κ–Cn están bien conservados entre las diferentes especies analizadas, entre las que se incluyen la vaca, la oveja, el cerdo, la rata, el ratón y el hombre. Las secuencias nucleotídicas de la κ–Cn de los diferentes alelos caprinos y de la cabra salvaje española fueron alineados con las secuencias del exón 4 de otras especies relacionadas. A partir de esta alineación, se obtuvo una secuencia consensus para las 7 posiciones polimórficas caprinas. Esta secuencia es idéntica a la encontrada en la cabra salvaje española, sugiriendo que esta secuencia corresponde a la forma ancestral de la variantes caprinas actuales. El alelo B caprino es el que muestra una mayor similitud nucleotídica con la secuencia ancestral (5 de 7 posiciones nucleotídicas), mientras que el alelo C es el más divergente. Este resultado concuerda con la baja frecuencia del alelo C en las diferentes razas caprinas analizadas.

Diversos trabajos han demostrado los efectos de determinadas variantes genéticas de los genes de proteínas lácteas en la composición y propiedades físico-químicas de

Cuadro 1

Variantes del gen de la κ-Cn caprina. Se indica la posición de los nucleótidos polimorficos y sus correspondientes aminoácidos. En cada variante de la κ-Cn caprina y en la cabra salvaje se indican los nucleótidos que se encuentran en cada posición polimórfica y los cambios aminoacídicos se indican entre paréntesis

Posición nucleóotidos	Posición aminoácidos	Variantes en Cabra			Cabra salvaje	Genotipado
		A	B	C		
245	43	T	T	C	C	
284	56	G	G	A	G	
309	65	G (Val)	G (Val)	A (Ile)	G (Val)	*Bse*NI
471	119	G (Val)	A (Ile)	A (Ile)	A (Ile)	
509	131	A	A	G	A	
583	156	C (Ala)	C (Ala)	T(Val)	C (Ala)	
591	159	T (Ser)	T (Ser)	C (Pro)	C (Pro)	*Alw*44I

Cuadro 2
Distribución de las frecuencias génicas del gen de la κ-Cn caprina en razas Españolas y Francesas. Las frecuencias génicas se obtuvieron genotipando los animales por PCR-RFLP con BseNI y Alw44I. Los alelos A y B tienen una guanina y una timina en las posiciones 309 y 591, respectivamente. El alelo C tiene adenosina y citosina en estas mismas posiciones, respectivamente

Raza	Número de animales	Frecuencias génicas	
		A+B	C
Malagueña	17	1	0
Payoya	11	1	0
Canaria	48	0,989	0,011
Murciano-Granadina	38	0,986	0,014
Saanen	33	0,894	0,106

la leche. En bovino, la variante B de la κ–Cn ha sido asociada con un contenido más elevado de caseína total en la leche y con una relación caseínas / proteínas séricas mayor (revisado en KAMINSKI *et al.*, 1996). Estas propiedades son importantes principalmente en el rendimiento de la producción de queso. El genotipo de la κ–Cn se incluye en algunos catálogos de inseminación artificial y, además, la selección a favor del alelo B se practica en algunos países (NG-KWAI HANG, 1998).

En caprino, los diferentes alelos de la *αs1*-Cn determinan un contenido diferente de esta proteína en la leche, con cuatro niveles de expresión que varían desde cero para el alelo nulo hasta 3·6 g/l para los alelos A, B, y C (GROSCLAUDE *et al.*, 1994). Serán necesarios nuevos trabajos en diferentes razas caprinas para analizar la distribución de los alelos de la κ–Cn descritos en este trabajo, así como para evaluar su posible efecto sobre las propiedades tecnológicas de la leche. El método de genotipado por PCR-RFLP descrito en este trabajo será de utilidad en el genotipado de un mayor número de animales.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca concedida a M.H.Y. del CIHEAM (Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza). Agradecemos a M. Amills y J. Capote por haber facilitado algunas de las muestras de ADN analizadas.

Bibliografía

ADDEO F., SOULIER S., PELISSIER J.P., CHOBERT J.M., MERCIER J.C., RIBADEU-DUMAS B,. 1978. Preparation and fractionation of goat kappa-casein: analysis of the glycan and peptide components. *Journal of Dairy Research* 45 191-196.

ANGULO C., DÍAZ-CARRILLO E., MUÑOZ A., ALONSO A., JIMÉNEZ I., SERRADILLA J.M., 1994. Effect of electrophoretic goat's κ–casein polymorphism on milk

yield and main components yield. *V World Congress on Genetic Applied to Livestock Production* Guelfh 19 333-336.

AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE D.D., SEIDMEN G.G., SMITH J.A., y STRUHL K., (Ed.), 1987. *Current Protocols in Molecular Biology* Green publishing Associates and Wiley-Interscience.

BARBIERI M.E., MANFREDI E., ELSEN J.M., RICORDEAU G., BOUILLON J., GROSCLAUDE F., MAHÉ M.F., BIBÉ B., 1995. [Influence of αs1 casein locus on the milk performances and genetic parameters in the Alpine goat] *Genetics Selection Evolution* 27 437-450.

COLL A., FOLCH J.M., SÁNCHEZ A., 1993. Nucleotide sequence of the goat κ-casein cDNA *Journal of Animal Science* 71 2833.

COLL A., FOLCH J. M., SÁNCHEZ A., 1995. Structural features of the 5' flanking region of the caprine κ-casein gene *Journal of Dairy Science* 78 973-977.

DI GREGORIO P., RANDO A., RAMUNNO L., MASINA P., PERAGOSTINI E., 1989 [Polymorphism of the DNA region containing casein genes in sheep and goat] XXIV *Simposio Internazionale Zootecnica* pp 275-282.

DI LUCCIA A., MAURIELLO R., CHIANESE L., MOIO L., y ADDEO F., 1990. Kappa casein polymorphism in caprine milk *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 41 305-314.

GROSCLAUDE F., RICORDEAU G., MARTIN P., REMEUF F., VASSAL L., BOUILLON J., 1994. [From gene to cheese: the polymorphism of the caprin αs1-casein. its effects and evolution] INRA *Productions Animales* 7 3-19.

HAWKINS G.A., HOFFMAN L.M., 1997. Base excision sequence scanning: a new method for rapid sequence scanning and mutation detection *Nature Biotechnology* 15 803-804.

JAUBERT A., MARTIN P., 1992. Reverse phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of αs1 and αs2 genetic variants. Lait 72 235-247.

JORDANDA J., AMILLS M., DÍAZ E., ANGULO C., SERRADILLA J.M., SÁNCHEZ A., 1996. Gene frequencies of caprine αs1-casein polymorphism in Spanish goat breeds *Small Ruminant Research* 20 215-221.

KAMINSKI S., 1996. Bovine κ-casein gene: molecular nature and application in dairy cattle breeding *Journal of Applied Genetics* 37 179-196.

LAW A.J.R., TZIBOULA A., 1993. Fractionation of caprine κ-casein and examination of polymorphism by FPLC *Milchwissenschaft* 48 68-71.

MERCIER J.C., ADDEO F., y PELISSIER J.P., 1976a. [Primary structure of the caprine caseinomacropeptide] *Biochimie* 58 1303-1310.

MERCIER J.C., CHOBERT J.M., ADDEO F., 1976b. Comparative study of the amino acid sequences of the caseinomacropeptides from seven species *FEBS Letters* 72 208-214.

MOIOLI B., PILLA F., TRIPALDI C., 1998. Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review *Small Ruminant research* 27 185-189.

NG-KWAI-HANG K.F., 1998. Genetic polymorphism of milk proteins: relationships with production traits, milk composition and technological properties *Canadian Journal of Animal Science* 78 (Supplement) 131-147.

PENA R.N., SÁNCHEZ A., FOLCH J.M., 2000. Characterisation of genetic polymorphism in the goat β-lactoglobulin gene *Journal of Dairy Research* 67 217-224.

RECIO I., PÉREZ-RODRÍGUEZ M.L., AMIGO L., RAMOS M., 1997. Study of the polymorphism of caprine milk caseins by capillary electrophoresis *Journal of Dairy Research* 64 515-523.

SWAISGOOD H.E., 1992. Chemistry of the caseins. In *Advanced Dairy Chemistry-1. Proteins*, pp. 63-110 (Ed. P. F. FOX). London: Elsevier Applied Science.

WARD T.J., HONEYCUTT R.L., DERR J.N., 1997. Nucleotide sequence evolution at the kappa-casein locus: evidence for positive selection within the family Bovidae *Genetics* 147 1863-1872.

YAHYAOUI M.H., PENA R.N., SÁNCHEZ A. FOLCH J.M., 2000. Rapid communication: polymorphism in the goat b-lactoglobulin proximal promoter region *Journal of Animal Science* 78: 1100-1101.

ZITTLE C.A., CUSTER J.H., 1966. Identification of the κ-casein among the components of whole goat casein *Journal of Dairy Science* 49 788-791.