CARACTERIZACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA β-LACTOGLOBULINA CAPRINA

Maria Ballester, Armand Sánchez y Josep M Folch
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra

INTRODUCCIÓN

La β-lactoglobulina (βLG) es la proteína sérica más abundante en la leche de los rumiantes. Está presente en la leche de numerosos mamíferos con la excepción del hombre, los lagomorfos y los roedores. En la especie bovina se han caracterizado un total de 11 variantes genéticas, encontrándose las variantes A y B distribuidas por todas las poblaciones bovinas y cebúes. Estas dos variantes genéticas (A y B) han sido asociadas con un efecto importante en la composición de la leche y el rendimiento quesero (Ng-Kwai-Hang y Grosclaude, 1992). En la oveja se han caracterizado tres variantes genéticas (A, B y C; Gaye *et al*., 1986; Erhardt, 1989), siendo la variante A la más frecuente. Aunque se han realizado diferentes estudios sobre el efecto de estos polimorfismos en la composición y producción láctea, no se ha establecido ninguna asociación como en la especie bovina. Por último, aunque en la leche de algunas razas de cabra se ha descrito la existencia de variabilidad proteica para la βLG, no se ha caracterizado ninguna variante genética que afecte a la región codificante del gen.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la identificación y caracterización de polimorfismos genéticos en el gen de la βLG caprina. Se han detectado un total de 15 polimorfismos en la región promotora y en los exones 1, 2, 3 y 6 del gen de la βLG en distintas razas caprinas. Asimismo, se ha desarrollado un protocolo de genotipado rápido por pirosecuenciación para 4 mutaciones de la región promotora, genotipándose 200 cabras pertenecientes a 11 razas distintas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Animal: Se utilizó ADN extraído de muestras de sangre de 200 cabras pertenecientes a las razas: Alpina (n=22, Francia), Saanen (n=22, Suiza), Malagueña (n=21, España), Murciano-Granadiana (n=21, España), Tinerfeña (n=14, España), Palmera (n=14, España), Majorera (n=11, España), Teramana (n=22, Italia), Girgentana (n=19, Italia), Cachemir (n=18, Asia) y Sahel (n=16, Senegal).

Amplificación del gen de la βLG caprina: A partir del ADN genómico de diferentes animales se amplificaron dos fragmentos solapados del gen de la βLG caprina. Los *primers* GOAPF3 y GoatI1R (Tabla 1) amplificaron un fragmento de 833 pb que incluía la región promotora proximal (588 bp), el exón 1 y parte del intrón 1. Los *primers* GOAPF1 y BLG7 fueron utilizados para amplificar un fragmento de 4854 pb que contenía toda la región codificante del gen. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1x PCR buffer, 1mM-$MgCl_2$ para el fragmento de 833 pb o 1.5 mM-$MgCl_2$ para el fragmento de 4854 pb, 200 μM dNTPs, 0.3 μM de cada *primer*, 2.6 U *Expand High Fidelity PCR* (Roche) y 125 ng de ADN genómico en un volumen final de 50 μl. El perfil térmico utilizado para el fragmento de 4854 pb fue: 95ºC 3 min, 10 ciclos de 95ºC 30s, 70ºC 1 min y 72ºC 2.5 min, seguido de 25 ciclos de 95ºC 30s, 70ºC 1 min y 72ºC 2.5 min (aumentando 20s la extensión en cada ciclo). Finalmente una extensión a 72ºC durante 10 min. El perfil térmico para el fragmento de 833 pb

fue similar con la excepción de la temperatura de *anneling* (60ºC) y el tiempo de extensión (1.5 min).

Secuenciación del producto amplificado e identificación de polimorfismos: Los fragmentos amplificados fueron purificados con *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) y posteriormente secuenciados mediante el *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* en el ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems). Los *primers* utilizados para la secuenciación fueron: GOAPF3, GoatE1R2, GoatI1R, GoatI1F, GoatI3R y GoatI6R (Tabla 1). El análisis de la secuencias se realizó mediante el programa MultAlin (Corpet, 1988).

Genotipado mediante pirosecuenciación: Se amplificó un fragmento de 181 pb de la región promotora proximal utilizando los *primers* BLGP-Fpyro y BLGP-Rpyro. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1x PCR buffer, 1.5 mM-$MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 0.5 μM de cada *primer*, 0.625 U de Taq DNA polimerasa (Life Technologies) y 125 ng de ADN genómico en un volumen final de 25 μl. El perfil térmico utilizado fue: 95ºC 5 min, 35 ciclos a 95ºC 30 s, 60ºC 1 min, y 72ºC 1.5 min, con una extensión final de 72ºC 5 min. El genotipado se realizó utilizando el kit SNP (Pyrosequencing AB) a partir de 20 μl de cada PCR. Los *primers* utilizados fueron diseñados sobre la cadena *forward*: BLGSNP134-114 y BLGSNP64-60.

Tabla 1. *Primers* utilizados

Primer	Posición[1]	Tamaño (bp)	Secuencia (5'-3')
GOAPF3	promotor (-588)	20	GTCACTTTCCCGTCCTGGGG
BLGP-Fpyro	promotor (-159)	22	TGGAAGAAGGCCTCCTATTGTC
BLGSNP134-114	promotor (-149)	16	GGCCTCCTATTGTCCT
BLGSNP64-60	promotor (-81)	13	CTCGTGGCTGGGG
BLGP-Rpyro	exón 1 (1)	21	biotin-CTTCTGAGCTCTGCAGGGAGT
GoatE1R2	exón 1 (100)	22	GCCTTTCATGGTCTGGGTGACG
GoatI1R	intrón 1 (226)	20	GCTGCCCTAGCTGACTGATG
GoatI1F	intrón 1 (675)	20	CATTCCCCAGGGTGCAGAGT
GoatI3R	intrón 3 (1960)	21	TCATCACCACCAGCCCCTTAG
GoatI3F	intrón 3 (2900)	20	GCTGGTCGTGGAGGGTGCTG
GoatI6R	intrón 6 (4203)	20	GACCCCAGGGCCTAATGTGG

[1]Se indica utilizando como referencia la secuencia del gen de la β-lg caprina (Folch *et al.,* 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fragmento amplificado (833 pb) de la región promotora del gen de la βLG fue secuenciado en dos animales de cada raza caprina (véase material y métodos) con la excepción de la raza Majorera. El alineamiento de estas secuencias permitió la identificación de 9 polimorfismos (Tabla 2), ocho de los cuales eran substituciones nucleotídicas y uno una deleción/inserción de un nucleótido. Los polimorfismos –341 y –60 han sido previamente caracterizados en distintas razas caprinas (Graciano *et al*., 2003; Yahyaoui *et al*., 2000, respectivamente). Dos de los nuevos polimorfismos caracterizados (posiciones –118 y –64) se encuentran localizados sobre la secuencia consenso de unión del factor de transcripción AP-2.

Con el fin de realizar un genotipado rápido de 4 de las mutaciones caracterizadas en esta región promotora: -134, -118, -64 y –60 se utilizó la técnica de pirosecuenciación. Se genotiparon un total de 200 animales de distintas razas. La

mutación –64 (G/A) resultó ser específica de las razas italianas (Girgentana y Teramana). El otro polimorfismo que afectaba a la región consenso de unión de la AP-2 (-118), se encontró exclusivamente y en baja frecuencia en las razas Alpina, Saanen y Malagueña. Las otras dos posiciones polimórficas se encontraron ampliamente distribuidas entre las distintas razas. A continuación se investigó la asociación de estos 4 polimorfismos, encontrándose 5 de los 16 haplotipos teóricos. El haplotipo GCGC fue considerado el ancestral debido a que se encontró en todas las razas analizadas con una frecuencia de 0.70.

Tabla 2. Polimorfismos en el gen de la βLG caprina

Localización	Posición	Polimorfismo	Raza
promotor	-341	T/C	Gir, Alp, Saa, Tin, Mur, Cac, Sah
	-283	C/T	Ter, Pal, Mur
	-197	G/A	Mal, Cac
	-134	G/T	Ter, Pal, Mur
	-118	C/T	Alp
	-114	-/G deleción/inserción	Gir, Alp, Tin, Mur, Cac, Sah
	-64	G/A	Gir
	-60	C/T	Ter, Saa, Mur
	-22	G/A	Cac
exón 1	100	C/T	Cac
	121	C/T	Pal
exón 2	834	G/A	Alp
	840	C/T	Ter, Saa, Mur, Mal
exón 3	1806	C/T	Gir, Alp, Saa, Tin, Pal
exón 6	4122	T/C	Gir, Ter, Alp, Saa, Tin, Pal, Mur, Mal

Gir: girgentana; Ter: teramana; Alp: alpina; Saa: saanen; Tin, tinerfeña; Pal: palmera; Mur: murciano-granadina; Mal: malagueña; Cac: cachemir; Sah: sahel.

Por último y con el fin de detectar polimorfismos en la región codificante del gen de la βLG caprina, se secuenciaron dos animales de cada raza (con la excepción de las razas Sahel y Cachemir) para el fragmento amplificado de 4854 pb. El análisis de las secuencias reveló la existencia de 6 substituciones nucleotídicas (Tabla 2), cinco de las cuales se encontraron en la región codificante para la proteína. Todas las mutaciones fueron sinónimas.

En el presente trabajo se han caracterizado un total de 15 polimorfismos distribuidos entre la región promotora proximal y los seis primeros exones del gen de la βLG caprina. Aunque hacen falta más estudios para determinar como afectan estos polimorfismos en la expresión del gen de la βLG, estas mutaciones pueden ser utilizadas como marcadores moleculares en estudios de asociación con caracteres de producción láctea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Corpet F (1988) *Nucleic Acids Research* 16, 10881-10890
Erhardt G (1989) *Animal Genetics* 20, 197-204
Folch et al (1994) *Journal of Dairy Science* 77, 3493-3497
Gaye et al (1986) *Biochimie* 67, 1097-1107
Graziano et al (2003) *Italian Journal of Animal Science* 1, 65-68
Ng-Kwai-Hang and Grosclaude (1992) In: *Advanced Dairy Chemistry*-1. *Proteins* pp.405-455 (Ed.PF Fox) London:Elsevier Applied Science
Yahyaoui et al (2000) *Journal of Animal Science* 78, 1100-1101
Trabajo financiado con el proyecto CICYT (AGL2000-0687) y con beca F.I. a Maria Ballester (AGAUR, Generalitat de Catalunya).