



## Determinación del sexo y genotipificación del gen de la $\kappa$ -caseína en embriones bovinos



Ernesto López R <sup>1,2</sup>, Biol, MSc; Neil Vásquez A <sup>1,2</sup>, Biol, MSc.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia- sede de Medellín, AA. 3840, Medellín, Colombia;

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias de la Salud – CES.

(Recibido: 4 marzo, 2004; aceptado: 15 septiembre, 2004)

### Resumen

*La leche de las vacas que portan el alelo B del gen de la  $\kappa$ -caseína presenta un rendimiento cualitativo y cuantitativo superior en la producción de quesos, comparado con el obtenido con la leche de las vacas que tienen el alelo A, este último se encuentra con mayor frecuencia en la raza Holstein, la cual representa el 70% de los hatos lecheros en Colombia. Lo anterior plantea el reto de cambiar las proporciones genotípicas de esta característica al seleccionar individuos utilizando marcadores moleculares, para lo cual se estandarizó una técnica que permite la genotipificación del gen de la  $\kappa$ -caseína y la determinación del sexo en embriones bovinos. Se realizó una PCR “semi-anidada”, en la que se utilizó un juego de cebadores (K01F y JK3.1) para amplificar una región de 563pb del gen de la  $\kappa$ -caseína, el cual fué sometido a una segunda amplificación utilizando el juego de cebadores (JK5.1 y JK3.1), obteniéndose un fragmento de 344pb el cual presenta un polimorfismo que puede ser identificado mediante la digestión con una endonucleasa de restricción (RFLP); donde el patrón de fragmentos de 215 y 129 pb corresponde al alelo B y 344 pb al alelo A, cuando se utilizó Hind III. El patrón de fragmentos de 263 y 81 pb en el alelo B y 132, 131 y 84 pb en el alelo A, cuando se utilizó Hinf I. Finalmente, se utilizó un juego de cebadores (SRY1F y SRY2R) específicos para una región del gen sry de bovino, donde los individuos que presentaron un fragmento de 151pb se clasificaron como machos. Estos resultados muestran la posibilidad de genotipificación simultánea de las variantes de la  $\kappa$ -caseína y la determinación del sexo en embriones de bovino, lo cual permite el desarrollo de un programa de selección de embriones con las características genéticas que la ganadería y la industria de los derivados lácteos requiere en nuestro medio.*

**Palabras clave:** endonucleasa,  $\kappa$ -caseína, PCR, RFLP.

### Introducción

De acuerdo con el interés zootécnico, en la industria ganadera es necesario seleccionar embriones con características genéticas deseables, a través de marcadores de resistencia (a ambientes extremos y a enfermedades) (33) y de producción (masa corporal, cantidad y calidad de grasa y leche) (5,10). Debido a que para el éxito de la industria ganadera es muy importante el óptimo manejo de los recursos (vientres, alimentación, medicamentos y el espacio, entre otros), esto ha hecho que la implementación de las técnicas de selección asistida por marcadores se haya convertido en los últimos años en una opción importante para lograr adecuados rendimientos productivos (41, 48).

Para la producción bovina se requiere información sobre las características fenotípicas, las bondades genéticas y los méritos de cada animal (17), debido a que se cuenta con metodologías que permiten la genotipificación de manera sencilla, rápida, y económica de muchas características de los animales domésticos, las cuales son utilizadas en los programas de mejoramiento genético para la identificación de los ejemplares con un genotipo particular (9). La primera aplicación de estas metodologías fue el diagnóstico de enfermedades genéticas recesivas, como la deficiencia en la adherencia leucocitaria bovina (*bovine leucocyte adhesion deficiency*, BLAD) (23) y la deficiencia

de uridina monofosfato sintetasa (*deficiency of uridine monophosphate synthetase*, DUMPS) (40), luego se aplicaron a la genotipificación de otras características, como la presencia de cuernos (14, 18), el color de la piel (24) y para la selección rasgos de interés económico como: el volumen de masa muscular, la velocidad de crecimiento, la eficiencia reproductiva, la cantidad y calidad de la carne y la leche y la salud animal (8).

Lo anterior permite optimizar los procesos de mejora genética, para obtener descendencia con características determinadas de manera más rápida y eficiente, disminuyendo los intervalos entre generaciones y los costos de producción (7, 17). Estas metodologías presentan ventajas para los caracteres con baja heredabilidad (como los parámetros reproductivos), aquellos que se expresan sólo en un sexo (como la producción láctea), los que se expresan al final de la vida del animal (como la longevidad), o cuando éste ya está muerto (como la calidad de canal) (17). Además permite seleccionar los animales en estadios embrionarios tempranos, incluso antes de ser transferidos a las receptoras (realizando una biopsia embrionaria y analizando los marcadores genéticos de interés en un pequeño número de células), justificando la utilización de programas de reproducción asistida mediante la superovulación, la transferencia de embriones y la fertilización *in vitro* (35).

La calidad de la leche tiene un gran impacto económico en los procesos de industrialización. La leche es un fluido biológico complejo cuya función principal es asegurar el desarrollo de los mamíferos en sus primeras etapas de la vida, pero para que ésta sea asimilada correctamente tiene que coagularse en el estómago gracias a la acción de enzimas proteolíticas (pepsina y quimosina). Este fenómeno es la base de la producción del queso y es posible gracias a una organización especial de las proteínas lácteas, las cuales están divididas en dos grupos, dependiendo de su comportamiento a pH 4.6. En la fracción soluble (proteínas del suero) se encuentran la alfa-lactoalbúmina ( $\alpha$ -La) y la beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) y la fracción insoluble (caseínas totales), esta compuesta de cuatro caseínas: alfa s1 ( $\alpha_{s1}$ -Cn), alfa s2 ( $\alpha_{s2}$ -Cn), beta ( $\beta$ -Cn) y kappa ( $\kappa$ -Cn), estas últimas codificadas por un grupo de genes autosómicos que se encuentran ubicados en una región de 250 kb en la posición 6q31-33 (12,44).

La  $\kappa$ -Cn se diferencia de las demás caseínas por presentar una menor proporción de grupos fosfato

asociados, y por su baja tendencia a precipitarse en presencia de iones calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ). De acuerdo a su solubilidad, esta compuesta de dos regiones; una (aminoácidos 1-105) se caracteriza por la presencia de residuos hidrófobos, y la otra (aminoácidos 106-169), con una marcada naturaleza hidrófila que presenta motivos de carbohidratos, por lo que se comporta como un protector coloidal para las demás caseínas con la formación de micelas (12, 28).

Las caseínas y las proteínas del suero presentan diversos alelos o variantes genéticas codominantes con diferencias en su secuencia de nucleótidos, que se traducen en cambios de aminoácidos en las proteínas, los cuales generan modificaciones en la maduración postraducciona, que generan cambios en las propiedades fisicoquímicas la leche. (12, 13). Debido a que las variantes alélicas pueden afectar la cantidad de proteínas de la leche, por ejemplo los genotipos BB de la  $\kappa$ -Cn y AA de la  $\beta$ -Lg están asociados con una mayor cantidad de proteína total, los animales portadores del alelo A de la  $\beta$ -Lg tienen una mayor capacidad quesera, debido a que producen más caseínas y menos  $\beta$ -Lg en la leche. Esto es bastante importante para la industria quesera, puesto que las caseínas se retienen en el coágulo que forma el queso, por lo tanto, el parámetro más importante para determinar la capacidad quesera de la leche es la proporción de caseínas y  $\beta$ -Lg; donde los genotipos BB de la  $\kappa$ -caseína y AA de la  $\beta$ -Lg están asociados con una capacidad quesera superior (13, 17, 45). La leche de las vacas que presentan el alelo B de la  $\kappa$ -Cn produce micelas de menor tamaño, en las cuales se retienen más sólidos al momento de la coagulación para la producción de quesos, dando lugar a coágulos, contienen más grasa y menos agua y por lo tanto son más firmes por lo cual presentan un rendimiento quesero superior (3.5-8%) (22, 32, 42).

Las variantes A y B de la  $\kappa$ -Cn presentan 169 residuos y un peso molecular de 19,007 KDa; mediante el análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas y de nucleótidos de las variantes génicas que las codifican, se han podido establecer los polimorfismos: el alelo A tiene Treonina en la posición 136, codificado por la tripleta ACT y Aspartato en la posición 148, codificado por la tripleta GAT, mientras que la variante B, presenta Isoleucina codificada por la tripleta ATT y Alanina codificada por la tripleta GCT, en las posiciones antes mencionadas (15, 30). Estos polimorfismos se han utilizado con el fin de identificar la variante que presenta un animal, la reacción en

cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR), acoplada al análisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) (7).

Los alelos A y B de la  $\kappa$ -caseína son los más comunes, se pueden encontrar en la mayoría de las razas bovinas en proporciones variables. El alelo A es el más frecuente en las razas Holstein, Friesian, Ayrshire, Danés Rojo y Cebú Índico (31). La variante B, en cambio, es más frecuente en las razas Jersey, Normando y Cebú Africano (38). Lo anterior plantea una debilidad en la ganadería Colombiana, debido a que la base de la producción lechera es 70% la raza Holstein, 20% Holstein x Cebú, 8 % Jersey y 2% con razas criollas (45). Las poblaciones de ganado Holstein en Colombia (Antioquia y Sabana de Bogotá) y Polonia presentan frecuencias genotípicas de  $\kappa$ -caseína similares (AA>AB>BB), mientras que las frecuencias génicas de las condiciones homocigóticas son mayores (BB>AA>AB) en la población estadounidense, esto último logrado mediante cruces dirigidos mediante la selección asistida por marcadores (*Marker-assisted selection*, MAS) (27, 43, 47).

Lo anterior indica que una adecuada selección del genotipo de las proteínas de la leche podría permitir la determinación de las características físicas y químicas de la leche que sean de interés para su procesamiento tecnológico, aumentar considerablemente la calidad y el rendimiento quesero. Lo anterior implica que los productores se deberán familiarizar con la nueva terminología y aplicaciones de los marcadores moleculares, para poder permanecer en un mercado tan competitivo como el de la producción láctea.

Las técnicas de la biología molecular ofrecen muchas posibilidades para aumentar la eficiencia productiva en el campo agropecuario. En el presente proyecto se estandarizaron las técnicas que permiten la determinación del sexo mediante la PCR (1, 37) y la genotipificación de los alelos A o B del gen de la  $\kappa$ -caseína, mediante PCR-RFLP), en embriones bovinos (5, 29). Esto permitirá la utilización eficiente de los vientres, los materiales y equipos en los programas de producción animal y por consiguiente impulsará el desarrollo del área de la reproducción animal en nuestro medio. Lo anterior permite proponer un programa de tipificación de las variantes del gen de la  $\kappa$ -caseína y la determinación del sexo de embriones bovinos preimplantatorios, lo cual impactará de manera positiva al gremio ganadero, la industria de los productos lácteos y cárnicos y a la comunidad científica relacionada con la biotecnología animal.

## Materiales y métodos

### *Extracción del ADN de células de sangre periférica o semen congelado de bovino*

Se tomaron muestras de sangre periférica de 10 hembras bovinas de la raza Holstein, del hato lechero "El Pantano" en el Municipio de Belmira; asimismo se tomaron muestras de sangre y semen congelado de cinco machos de la misma raza, pertenecientes al Centro de Inseminación Artificial Hacienda San Pablo de la Universidad Nacional de Colombia sede de Medellín, los cuales se utilizaron como controles debido a que previamente se les conocía el genotipo para el locus de la  $\kappa$ -caseína (resultados no publicados). Para la obtención del ADN se realizó una lisis previa de glóbulos rojos centrifugación a 3000 rpm durante 4 minutos en cuatro volúmenes de una solución tampón (10 mM Tris HCl pH 7.6, 320 mM Sucrosa, 5 mM MgCl y 10% de Tritón X-100), luego se utilizó sangre periférica como fuente (20) y se continuó el proceso utilizando el método descrito por Laine *et al* (25).

Para determinar la calidad de ADN se preparó un gel de agarosa al 0.8%, al cual se le adicionó 0.5  $\mu$ g/mL Bromuro de Etidio, utilizando tampón TBE 1X se dejó correr a 80v durante 50 minutos, los geles fueron visualizados y fotografiados bajo luz ultravioleta en un equipo de fotodocumentación de geles (Biometra, Göttingen DE). Se tomó como un ADN de buena calidad aquellas muestras que permanecieron en el pozo y no se observó migración a través del gel.

### *Extracción del ADN a partir de ovocitos y embriones de bovino*

Se tomaron embriones de descarte de un programa de transferencia (35) y ovocitos de bovino obtenidos de ovarios de vacas sacrificadas en la central Ganadera de Medellín obtenidos de acuerdo a la metodología descrita por Olivera (34). Tanto los ovocitos como los embriones fueron tratados durante 30 segundos con ácido de Tirodes, luego se hicieron dos lavados sucesivos con gotas de medio de cultivo de acuerdo al protocolo de Hlinka *et al*. (21) y finalmente se extrajo el ADN incubando las blastómeras y los ovocitos en 4  $\mu$ L de agua tridestilada durante 10 minutos a 98°C en tubos de 200 $\mu$ L, y posteriormente se almacenaron a 4°C hasta el análisis por PCR (36).

### Selección de cebadores

Los cebadores utilizados para amplificar la región del gen sry (véase Tabla 1) fueron seleccionados de un estudio previo (37) y los cebadores para  $\kappa$ -caseína fueron seleccionados a partir de las secuencias reportadas en la literatura (3, 5, 46) y las secuencias

publicadas en el Gene-Bank (2) (véase Tabla 1), las cuales fueron adecuadas hasta alcanzar temperaturas de alineamiento teóricas similares a las que presentan los cebadores para sry, además se hizo una verificación de especificidad consultando las bases de datos internacionales utilizando el programa en línea BLASTN 2.2.6 (4).

**Tabla 1.** Secuencia de los cebadores y Temperaturas de alineamiento teóricas, utilizadas en el presente estudio.

Gen		Secuencia de los cebadores	Pb	%G+C	Tm(°C)	Ta(°C)	Referencia
$\kappa$ -caseína	JK5.1	5'-ATTTATGGCCATTCCACCAAAG-3'	22	40.1	56.041	51.041	(7)
	JK3.1	5'-AGACAATGTCTCTCCGCTTTA-3'	22	45.45	58.20	53.20	(7)
	K01F	5'-GCTGAGTAGGTATCCTAGTTAT-3'	22	40.1	56.41	51.041	(29)
	K02R	5'-CTTCTTTGATGTCTCCTTAGAG-3'	22	40.1	56.41	51.041	(29)
Sry	SRY1BF	5'-TTCATTGTGTGGTCTCGTGA-3'	20	50.3	55.30	50.30	(37)
	SRY2R	5'-GTAGTCTCTGTGCCTCCTC-3'	19	54.18	59.18	54.18	(37)

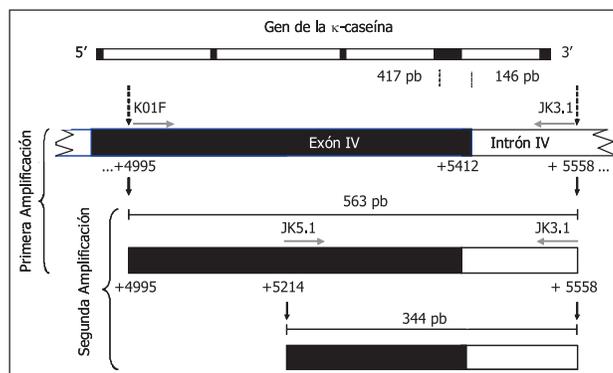
$$T_a = 62.3^\circ\text{C} + 0.41(\%G+C) - (500/A+T+C+G) - 5^\circ\text{C}. \quad (38)$$

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación por PCR, se realizó en un volumen final de 25 y 50  $\mu\text{L}$  que contenía tampón PCR 1X, 0.2  $\mu\text{M}$  de cebadores; 2.5 mM de dNTPs, 0.025 U/ $\mu\text{L}$  de taq polimerasa y ADN de bovino (37), en un termociclador (Biometra, Göttingen DE) programado de la siguiente manera: Un ciclo (4 minutos a 94°C, 1 minuto 49-53°C, un minuto a 72°C), treinta ciclos (1 minuto 94°C, 1 minuto 49-53°C, 1 minuto 72°C) y un ciclo final de (1 minuto a 94°C, 1 minuto 49-53°C, y 9 minutos a 72°C). Las anteriores condiciones térmicas y de reacción fueron optimizadas mediante la experimentación en el trabajo de laboratorio (5, 26, 37).

Los juegos de cebadores específicos para sry (SRY1BF/SRY2R) y  $\kappa$ -caseína (K01F/JK3.1 y JK5.1/JK3.1) fueron evaluados de manera independiente en un volumen de reacción de 25  $\mu\text{L}$ , y luego se procedió a su evaluación utilizando dos juegos de cebadores (PCR múltiple) en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  bajo las condiciones antes descritas utilizando 49, 50, 51, 52 y 53°C como temperaturas de alineamiento ( $T_a$ ). Además, se diseñó una estrategia de amplificación utilizando dos juegos de cebadores para  $\kappa$ -caseína (véanse Tabla 1 y Figura 5) en sesiones de PCR independientes bajo las condiciones antes mencionadas. En la primera amplificación se utilizó un juego de cebadores (K01F/JK3.1) específicos para una región de 563pb, luego se utilizó este fragmento amplificado como plantilla para una segunda ronda de PCR utilizando otro juego de cebadores (JK5.1/JK3.1) específicos para una región de 344 pb

dentro del mencionado fragmento (véase Figura 1), similar a lo reportado en la literatura como PCR anidada (nested PCR) (11, 39) En todos los casos se utilizó como DNA de individuos previamente genotipificados como control positivo y reacciones en ausencia de Taq polimerasa o DNA como control negativo.

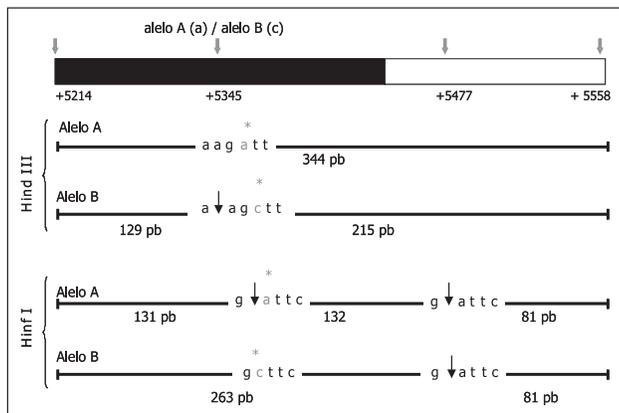


**Figura 1.** Ilustración del gen de la  $\kappa$ -caseína y ubicación de los cebadores.

### Digestión con *Hinf I* y *Hind III*

Los productos de la PCR de 344 se sometieron a digestión con 5U de *Hind III* o *Hinf I* diluidos en tampón R+ bajo las condiciones sugeridas por la casa comercial (Fermentas, Miami FL), e incubados a 37°C durante 12 horas en un termociclador (Biometra, Göttingen DE). Los productos de la digestión fueron resueltos mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% bajo las condiciones antes descritas. Las dianas de corte para las enzimas de restricción y el tamaño

de los productos de digestión esperados se ilustran en la figura 2.



**Figura 2.** Ilustración del lugar de corte para HindIII y HinfI en el producto de PCR de 344 pb en los diferentes genotipos del gen de la  $\kappa$ -caseína.

## Resultados

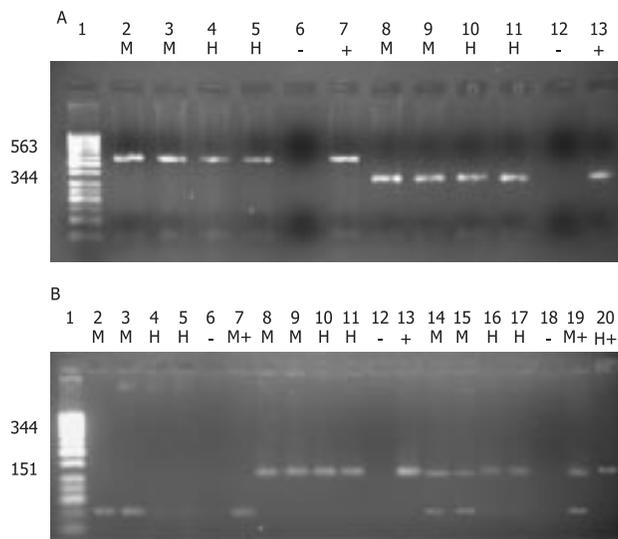
### Selección de cebadores

Se probaron varios juegos de cebadores para la renotificación del gen  $\kappa$ -Cn y se seleccionaron aquellos que presentaron resultados óptimos (véase Tabla 1), en la figura 1 se ilustra un fragmento del gen la de la  $\kappa$ -caseína donde se muestran la ubicación de los cebadores y el par K01F/JK3.1 que flanquea un fragmento de 563pb entre los nucleótidos +4995 y +5558 (417pb del exón IV y 146pb del intrón IV), mientras que el juego de cebadores JK5.1/JK3.1 flanquea un fragmento de 344 pb entre los nucleótidos +5214 y +5558 dentro de la misma región.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizaron las reacciones de PCR sencillas y múltiples utilizando los diferentes juegos de cebadores específicos para los genes de la  $\kappa$ -caseína y sry (véase la Tabla 1). Para  $\kappa$ -caseína se encontraron resultados positivos al utilizar los juegos K01F/JK3.1 con los cuales se obtuvo un fragmento de 563 pb (carriles 2-5 y 7 de la figura 3A y carriles 8-11 de la figura 3B). Éstos productos de PCR fueron utilizados como plantilla en una segunda amplificación en la cual se obtuvo un fragmento de 344pb utilizando el juego de cebadores JK5.1/JK3.1 (carriles 8-11 y 13 de la figura 3A), tanto en hembras (carriles 4, 5, 10 y 11 de la figura 3A y carriles 10 y 11 de la figura 3B) como en machos (carriles 2, 3, 8 y 9 de la figura 3A y carriles 8 y 9 de

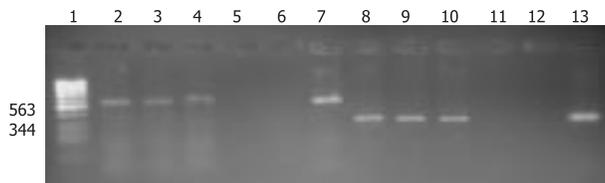
la figura 3B). Para la amplificación específica del gen sry se utilizó el juego de cebadores SRY1BF/SRY2R (37), obteniendo un amplificado de 151pb en los individuos machos (carriles 2 y 3 de la figura 3B) y no en las hembras (carriles 4 y 5 de la figura 3B). Todas las reacciones fueron positivas cuando se utilizaron las temperaturas de alineamiento de 49-53°C. Cuando se realizó la reacción de PCR múltiple utilizando la mezcla de cebadores JK5.1/JK3.1 y SRY1BF/SRY2R, se obtuvieron amplificados observables cuando se realizó la reacción a una temperatura de alineamiento de 53°C encontrándose una banda correspondiente a un fragmento de 344 pb en todos los individuos evaluados (carriles 14-17 y 19-20 de la figura 3B) mientras que se encontró una banda de 151 pb sólo en los individuos machos (carriles 14, 15 y 19 de la figura 3B) y no en las hembras (carriles 16, 17 y 20 de la figura 3B). Controles positivos (carriles 19 y 20 de la figura 3B) y control negativo (carril 18 de la figura 3B).



**Figura 3.** Estandarización de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. A: se presenta un amplificado de 563 pb correspondiente al gen de la  $\kappa$ -Cn (carriles 2-5) con los cebadores K01F/JK3.1, control negativo sin DNA (carril 6) y control positivo (carril 7); en los carriles 8-11 se muestran los productos de amplificación (344pb) utilizando los cebadores JK5.1/JK3.1, control negativo (carril 12) y control positivo (carril 13). B: Los carriles 2-7 muestran los productos de amplificación utilizando los cebadores específicos para sry (SRY1BF/ SRY2R) 151pb, positivo sólo en los machos, control negativo sin cebadores (carril 6) control positivo (carril 7). Los carriles 8-13 muestran los productos de amplificación utilizando los cebadores para  $\kappa$ -CN (JK5.1/JK3.1) 344 pb, control negativo sin cebadores (carril 12) control positivo (carril 13). Los carriles 12-20 muestran los productos de la PCR múltiple utilizando los dos juegos de cebadores para sry y  $\kappa$ -Cn. Carril 1 marcador de peso molecular 50pb.

### Evaluación de la sensibilidad de PCR

Con el fin de determinar el número mínimo de células requerido para obtener un amplificado observable se tomaron grupos de 1, 2 y 4 ovocitos, a los cuales se les extrajo su material genético utilizando la metodología antes descrita y fueron sometidos a la amplificación por PCR utilizando un juego de cebadores (K01F/JK3.1) en las condiciones de reacción descritas. Obteniéndose un amplificado visible de aproximadamente 563 pb (carriles 2-4 de la figura 4), éstos fragmentos amplificados fueron sometidos a una segunda ronda de PCR utilizando el juego de cebadores (JK5.1/JK3.1) obteniéndose un amplificado visible de aproximadamente 344pb correspondiente a una región del gen la  $\kappa$ -caseína (carriles 8-10 de la figura 4). Lo anterior concuerda con lo observado en los ensayos de PCR utilizando DNA de sangre o semen (carriles 8-11 de la figura 3A). Controles positivos (carriles 7 y 13 de la figura 4) y controles negativos (carriles 5, 6, 11 y 12 de la figura 4).

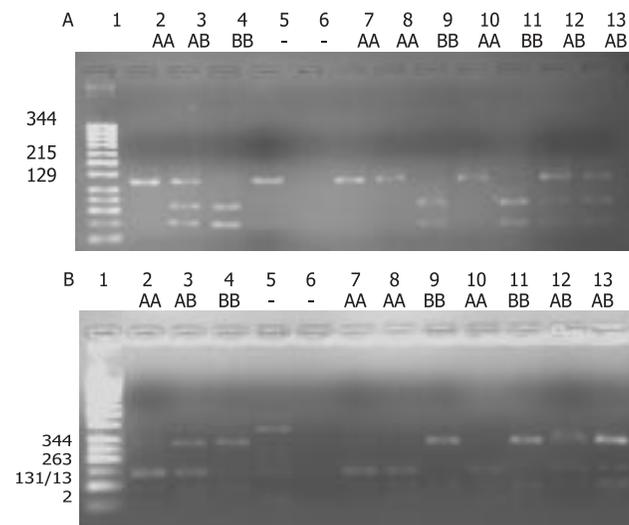


**Figura 4.** Determinación de la sensibilidad de la reacción de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se presentan los amplificados de 563 pb correspondientes al gen de la  $\kappa$ -Cn utilizando los cebadores K01F/JK3.1, a partir del DNA de 1, 2 y 4 ovocitos (carriles 2-4), control negativo sin cebadores (carril 5), control negativo sin DNA (carril 6) y control positivo (carril 7). Los carriles 8-10 muestran los productos de reamplificación (344pb) de los fragmentos mostrados en los carriles 2-4, utilizando los cebadores JK5.1/JK3.1 control negativo sin cebadores (carril 11), control negativo sin DNA (carril 12) y control positivo (carril 13). Carril 1 marcador de peso molecular 50pb.

### Genotipificación del gen de la $\kappa$ -caseína en embriones bovinos

Las reacciones de digestión de los fragmentos de 344pb amplificados a partir de DNA total de embriones bovinos con el juego de cebadores (JK5.1/JK3.1), específicos para una región del gen de la  $\kappa$ -caseína se realizaron bajo las condiciones propuestas por la casa comercial encontrándose resultados similares a los certificados en los individuos evaluados de los diferentes genotipos del mencionado gen, de la siguiente manera: Cuando se utilizó la enzima *Hind* III se confirmó la presencia de un fragmento esperado de

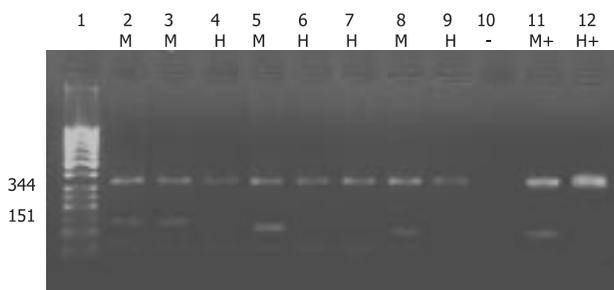
344pb en los embriones que presentan el genotipo AA (carriles 7, 8 y 10 figura 5A), dos fragmentos (215 y 129 pb) en los embriones BB (carriles 9 y 11 de la figura 5A) y tres fragmentos (344, 215 y 129 pb) en los embriones AB (carriles 12 y 13 de la figura 5A). Mientras que cuando se utilizó la enzima *Hinf* I (véase Figura 5B) se encontraron dos bandas (131/132 y 81pb) en los individuos que presentan el genotipo AA (carriles 7, 8 y 10 de la figura 5B), dos fragmentos (263 y 81pb) en los individuos BB (carriles 9 y 11 de la figura 5B) y tres fragmentos (263, 131/132 y 81pb aproximadamente) en los individuos AB (carriles 12 y 13 figura 5B). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en los controles positivos donde se utilizó DNA de sangre periférica o semen de individuos de genotipo conocido (carriles 2-4 de las figuras 5A y 5B). Los controles negativos se efectuaron sin enzima de restricción (carril 5 de la figuras 5A y 5B) y sin DNA (carril 6 de las figuras 5A y 5B).



**Figura 5.** Genotipificación de la  $\kappa$ -Cn en embriones de bovino: Electroforesis en gel de agarosa al 2%. A: en los carriles 2-7 se utilizó DNA de sangre periférica o semen de individuos con genotipo conocido se muestra el patrón de restricción utilizando *Hind*III. Donde una banda de 344bp correspondiente al gen de la  $\kappa$ -caseína genotipo AA (carril 2), tres bandas 344, 215 y 129 pb genotipo AB (carril 3) y 215 y 129 pb genotipo BB (carril 4), el carril 5 presenta un fragmento sin digerir y el carril 6 sin DNA. Carriles 7, 8 y 10 embriones AA, carriles 9 y 11 BB y carriles 12 y 13 AB. B: en los carriles 2-7 se utilizó DNA de sangre periférica o semen de individuos con genotipo conocido se muestra el patrón de restricción utilizando *Hinf*I. Donde dos bandas (81, 131/132 pb) corresponden al genotipo AA al gen de la  $\kappa$ -caseína (carril 2), tres bandas 263, 131/132 y 81 pb genotipo AB (carril 3) y dos bandas 263 y 81pb genotipo BB (carril 4), el carril 5 presenta un fragmento (344pb) sin digerir y el carril 6 sin DNA. Los carriles 7, 8 y 10 embriones AA, carriles 9 y 11 BB y carriles 12 y 13 AB. El carril 1 marcador de peso molecular 50pb.

### Determinación del sexo en embriones bovinos

En la figura 11 se ilustran los resultados de las reacciones de PCR realizadas utilizando muestras de DNA total de embriones bovinos con los cebadores JK5.1/JK3.1 y SRY1BF/SRY2R específicos para  $\kappa$ -Cn y sry (PCR múltiple). Se observa que todos los embriones evaluados (carriles 2-9 de la figura 6) presentan un fragmento de 344pb correspondiente al gen de la  $\kappa$ -Cn el cual se encuentra tanto en hembras como en machos, mientras que en los carriles 2, 3, 5 y 8 de la misma figura se observa una banda adicional de 151 pb, correspondiente a un fragmento del gen sry, el cual se presenta sólo en los machos, como quedó demostrado en los experimentos de estandarización utilizando muestras de DNA de individuos adultos de sexo conocido (macho carril 11 y hembra carril 12 de la figura 6), de acuerdo con lo esperado, según el diseño de la prueba. El control negativo se realizó sin DNA (véase el carril 10 de la figura 6).



**Figura 6.** Determinación del sexo en embriones bovinos. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se presenta el amplificado de 344bp correspondiente al gen de la  $\kappa$ -Cn en todos los individuos analizados (carriles 2-9, 11 y 12), los carriles 2, 3, 5 y 8 muestran una banda de 151pb correspondiente al gen sry exclusivo de los machos la cual fue obtenida por amplificación por PCR con los cebadores SRY1BF/SRY2R. Carril 10 control sin DNA, carriles 11 y 12 control positivo macho y hembra. Carril 1 marcador de peso molecular 50pb.

### Discusión

La selección asistida por marcadores (MAS) emplea las estrategias de la bioquímica, la biología molecular, la genética y los registros fenotípicos, con el fin de determinar el genotipo de los individuos adultos, los fetos durante los primeros estadios de la gestación o los embriones antes de la implantación, lo cual, según Dentine (1999), ofrece la posibilidad de disminuir el tiempo requerido para el cambio genético en las poblaciones de ganado en los programas de mejoramiento animal (9).

Algunas características de interés en los procesos de producción animal pueden estar asociadas a la presencia de una variante genotípica de un solo gen, en otras ocasiones se trata de rasgos con comportamientos “cuantitativos”, cuando la característica está asociada a diversos eventos (*quantitative trait loci*, QTL), éstos últimos muy difíciles de analizar debido a la infinidad de variables que tienen que ser controladas para obtener resultados adecuados (9).

En el caso de la producción de leche están implicados varios aspectos que deben ser tenidos en cuenta: la raza, el clima, la alimentación y el manejo de los rebaños, los cuales pueden ser controlados directamente por el productor con el fin de obtener los volúmenes y la calidad deseados. Pero, existen otros rasgos que son inherentes exclusivamente a los individuos, como las variantes genéticas de las proteínas lácteas, las cuales tienen efectos importantes sobre las propiedades de transformación tecnológica de la leche en la fabricación de quesos y otros productos, lo anterior ha sido demostrado en numerosas investigaciones realizadas durante los últimos 30 años dentro de las que podrían mencionarse los trabajos de Sherbon *et al* (1967) (42), Ng-Hang *et al.* (1984) (32), Grosclaude (1988) (16), Horne & Muir (1994) (22) y Viana *et al* (2001) (49), en los cuales se demostró que las caseínas representan casi el 80 % de las proteínas lácteas bovinas, donde el genotipo de la  $\kappa$ -caseína es el factor más importante, debido a que la leche procedente de animales con genotipo BB para este locus presenta mayores porcentajes proteicos, mejores propiedades de coagulación, mejores efectos sobre la sinéresis del queso y, en consecuencia, todo se traduce en un mayor rendimiento en la producción quesera.

Teniendo en cuenta la necesidad de cambiar las proporciones genotípicas de la  $\kappa$ -caseína en los hatos de producción lechera se han realizado estudios tendientes a estandarizar las metodologías que pueden ser implementadas en los sistemas de producción ganadera del país, con las cuales se obtuvieron resultados similares a los obtenidos por diferentes investigadores en Estados Unidos (29, 33) y en Europa (6, 7).

En el presente trabajo se evaluaron las secuencias de los cebadores utilizados por los mencionados autores, las cuales fueron modificadas hasta obtener temperaturas de alineamiento (DA) entre 49-53°C, se realizaron ensayos experimentales utilizando combinaciones de los cebadores hasta obtener un amplificado de 563pb con el par KO1F/JK3.1R. En

esta región se alinean de manera específica los cebadores JK5.1R/JK3.1F flanqueando un fragmento de 344pb dentro del cual se encuentra el polimorfismo que diferencia los alelos A y B, los cuales pueden ser cortados específicamente con *Hinf* I y *Hind* III, respectivamente, dando la posibilidad de genotipificar las variantes de la  $\kappa$ -caseína utilizando DNA de sangre periférica de animales adultos, semen, ovocitos y embriones de bovino. De esta manera, se tienen dos estrategias para determinar el genotipo de un individuo, debido a que estas enzimas generan patrones de bandas diferentes en cada genotipo. Aprovechando los resultados obtenidos por Rodríguez (37), se utilizaron los cebadores específicos para sry y  $\kappa$ -caseína en una PCR múltiple, lo cual permitió determinar el sexo además de la genotipificación de la  $\kappa$ -caseína. Encontrándose correspondencia entre los genotipos obtenidos con ambas enzimas de restricción, lo cual fue corroborado utilizando DNA de individuos hembras y machos con genotipos de la  $\kappa$ -caseína certificados.

El abordaje experimental utilizado en este estudio comprende una serie de estrategias que permiten optimizar los procesos de mejoramiento genético mediante el cruce de individuos con genotipos conocidos. Además, se tienen las bases para la

implementación de un programa de genotipificación de embriones, lo cual deberá ir de la mano con los trabajos de optimización de los procesos de obtención (MOET, FIV) y micromanipulación de embriones para la obtención de biopsias de blastómeras como fuente de ADN para los procesos de análisis molecular.

Finalmente, queda planteada la posibilidad de estandarizar los procesos de genotipificación de otras rasgos de interés económico (7, 8) con los que se busca mejorar el volumen de masa muscular, la tasa de crecimiento, la eficiencia reproductiva, la calidad y calidad de la carne y la leche mediante el análisis de las variantes de la hormona de crecimiento, la prolactina, la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\alpha$ -lactoalbúmina, entre otros. De igual manera, se podría utilizar para renotificar características relacionadas con la salud animal por ejemplo el diagnóstico de BLAD y DUMPS (23, 40), o la predicción de rasgos físicos como la presencia de cuernos y el color de la piel (14, 18, 24).

Los presentes resultados tienen un alto potencial para la implementación de programas de extensión impulsados desde la academia, que podrían beneficiar los hatos de la Universidad, la empresa privada, y a los campesinos que podrían tener acceso a servicios de alta calidad y posiblemente de muy bajos costos.

### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, Sede de Medellín- DIME (030802-589), y a la Cooperativa Lechera de Antioquia - COLANTA, Hacienda el Progreso - SENA.

### Summary

#### *Sex determination and genotyping the $\kappa$ -casein gene of bovine embryo*

*Milk of cows that carries the B allele of  $\kappa$ -casein gene displays a qualitative and quantitative superior yield in cheese production, compared with that obtained in milk of cows that carrying the A allele, this last allele is most frequent in Holstein, which represents 70% of milk cattle in Colombia. One possible challenge to be undertaken is to change the genotypic proportions of this characteristic selecting individuals by using molecular markers. We have standardized a technique that allows to genotipification of  $\kappa$ -casein gene and the determination of sex in bovine embryos. Semi-nested PCR was used for genotyping bovine embryo  $\kappa$ -Cn gene using K01F and JK3.1 primers. A 563 bp fragment was obtained, corresponding to the  $\kappa$ -Cn gene which was submitted to further amplification with JK5.1 and JK3.1 primers, yielded a 344 bp fragment which could be genotyped by digestion with a restriction endonuclease. The B allele yielded a 215 and 129 bp band pattern using *Hind*III, whilst the A allele showed a 344 bp fragment. On the other hand, when *Hinf*I was used the B allele generating a 263 and 81 bp pattern and the A allele 132, 131 and 84 bp. A set of primers (SRY1BF and SRY2R) was then used which was specific for a bovine sry gene region. Individuals showing a 151 bp fragment were classified as males. The possibility of simultaneous genotyping of  $\kappa$ -Cn and sex determining in bovine embryos was demonstrated; this will allow proposing the embryos selection programme having characteristics required in our setting.*

**Key words:** *endonuclease,  $\kappa$ -casein, -PCR-RFLP*

## Referencias

1. Aasean E, Medrano JF. Amplification of the *zfy* and *zfx* genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotech* 1990; 8:1279-1281.
2. Access Gene Bank No. X14908. Bovine gene for kappa-casein exons 3-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list\\_uids=00000180&dopt=GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=00000180&dopt=GenBank)
3. Alexander LJ, Stewart AF, Mackinlay AG, Kapelinskaya TV, Tkach TM *et al.* Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. *Eur J Biochem* 1988; 178:395-401.
4. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 1997; 25:3389-3402.
5. Ashwell MS, Van-Tassel CP, Vanraden PM, Miller RH, Rexroad CE. Detection of putative loci affecting milk production and composition, health, and type traits in a United States Holstein population. *J Dairy Sci* 1998; 81:3309-14.
6. Bredbacka P, Kankaanpää A, Peippo J. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. *Theriogenology* 1995; 44:167-176.
7. Chrenek P, Boulanger L, Heyman Y, Uhrin P, Laurincik J *et al.* Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology* 2001; 55:1071-1081.
8. Cowan CM, Meland OM, Funk DC, Erf DF. Realized genetic gain following marker assisted selection of progeny test dairy bulls. in *Proc. Int. Plant Anim. Genome V Conf., San Diego, CA (Abstr.)* 1997; p296
9. Dentine MR. Marker-assisted Selection. En: Fries R, Ruvinsky A (eds). *The Genetics of Cattle*. New York, CAB International, 1999; 497-509
10. Falaki M, Prandi A, Corrandini C, Sneyers M, Gengler N, *et al.* Relationships of growth hormone gene and milk protein polymorphisms to milk production traits in simmental cattle. *J Dairy Res* 1997; 64:47-56.
11. Farrell RE. *RNA methodologies*, 2 ed. New York, Academia Press, 1998; p 314-315
12. Formaggioni P, Summer A, Malacarne M, Mariani P. Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in bos genus. *Univ degli Studi di Parma An della Facoltà di Med Vet* 1999; URL:<http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/index2.htm>
13. Freyer G, Liu Z, Erhardt G, Panicke L. Casein polymorphism and relation between milk production traits. *J A Breed Gen* 1999; 116:87-97.
14. Georges M, Drinkwater R, King T, Mishra A, Moore SS, *et al.* Microsatellite mapping of a gene affecting horn development in *Bos taurus*. *Nat Genetics* 1993, 4, 206–210.
15. Gorodetskij SI, Kaledin AS. Analysis of nucleotide sequence of bovine  $\kappa$ -casein. *Genética USSR* 1987; 23:596-604.
16. Grosclaude F. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. *INRA Prod Anim* 1988; 1:5-17.
17. Gutiérrez A, Pintado B, de la Fuente J. Uso del polimorfismo genético de las lactoproteínas para mejorar la calidad de la producción lechera. *Boletín Anembe* 2000; URL: [http://www.anembe.com/revista/indice.cgi?folder=mar\\_abr\\_00](http://www.anembe.com/revista/indice.cgi?folder=mar_abr_00).
18. Harlizius B, Tammen I, Eichler K, Eggen A, Hetzel DJ. New markers on bovine chromosome 1 are closely linked to the polled gene in Simmental and Pinzgauer cattle. *Mam Genome* 1997; 8, 255–257.
19. Harper JC, Wells D. Recent advances and future development in PGD. *Pren Diagnos* 1999; 19:1193-1199.
20. Helms C. Manual Isolation of Human DNA from Lymphoblasts or Whole Blood. In: Donis-Keller Lab: Lab Manual [http://hdklab.wustl.edu/lab\\_manual/dna/dna1.html](http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/dna/dna1.html), 1990.
21. Hlinka D, Dudas M, Herman M, Kalina I. Experimental attempts to extended the current preimplantation genetic diagnosis with individual karyotypization of human blastomeres. *Reprod Nutrition Dev* 2001; 41:91-106.
22. Horne DS, Muir DD. Genetic polymorphism of  $\kappa$ -casein and rennet coagulation time. Effects of serum phase components. *Milchwissenschaft* 1994; 49:446-449.
23. Kehrlí ME, Ackermann MR, Shuster DE, van der Maaten MJ, Schmalstieg FC *et al.* Bovine leukocyte adhesion deficiency: beta 2 integrin deficiency in young Holstein cattle. *Am J Pathob* 1992; 140:1489–1492.
24. Klungland H, Vage DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mam Genome* 1995;6:636–639.
25. Laine ML, Farr'e MA, Crusius JBA, van Winkelhoff AJ, Salvador A. The mouthwash: A non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J Periodont.* 2000; 71:1315-1318.
26. Lequarre AS, Grisart B, Moreau B, Schuurbiers N, Massip AG, *et al.* Glucose metabolism during bovine preimplantation development: Analysis of gene expression in single oocytes and embryos. *Mol Dev* 1997; 48:216-226.
27. López-Benavidez M. Correlación entre la constitución genética para la kappa-caseína y características de producción de leche en vacas holstein de primer parto en la sabana de Bogotá. 1998; URL: <http://www.lasalle.edu.co/investigacion/lopez.html>
28. MacKinlay AG, Wake RG. The heterogeneity of  $\kappa$ -casein. *Bioch Bioph Acta* 1964; 93:378-386.
29. Medrano JF, Aguilar-Cordoba E. Genotyping of bovine kappa-casein loci following ADN sequence amplification. *Biotechnol* 1990; 8:144-146.
30. Mercier JC, Brignon G, Ribadeau-Dumas B. Structure primaire de caseine  $\kappa$  bovine. Séquence Complète. *Eur J Biochem* 1973; 35:222-235.
31. Murphy RF, Downey WK. Milk protein polymorphism in the Kerry breed of cattle. *J Dairy Sci* 1969; 52, 1113-1115.
32. Ng-Kwai-Hang KF, Hayes JF, Moxley JE, Monardes HG. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat and protein production bay dairy cattle. *J Dairy Sci* 1984; 67:835-840.
33. Ojala M, Famula TR, Medrano JF. Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of

- Holstein and Jersey cows in California. *J Dairy Science* 1997;80:1776-1785.
34. Olivera M. De la fertilización in-vitro al trasplante de los embriones: Manual de laboratorio. Ed. Medellín, Editorial Universidad de Antioquia, 1993: 40p.
  35. Palma GA. Biotecnología de la reproducción 1ed. Balcacere, Argentina, 2001. 701p.
  36. Park JH, Lee JH, Choi KM, Joung SY. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogenology* 2001; 55:1843-1853.
  37. Rodríguez A. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias génicas asociadas al sexo molecular en cuatro especies de mamíferos. Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede de Medellín, Medellín, 2001. 52p
  38. Russo V, Mariani P. Polimorfismo delle proteine del latte e relazioni tra varianti genetiche e caratteristiche di interesse zootecnico, tecnologico e caseario. *Riv ZootVet* 1978; 6:289-304
  39. Ruth L, Larka L, George LV, Zwick M, Eng K, *et al.* Alkmi Quick Guide™ for PCR: A laboratory reference for the polymerase chain reaction. 1ed. Miami, Alkmi Biosystems Inc, 1999. 156p.
  40. Schoeber S, Simon D and Schwenger B. Sequence of the cDNA encoding bovine uridine monophosphate synthase. *Gene* 1993,124:307-308.
  41. Shea BF. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six year retrospective study. *Theriogenology* 1999; 5:841-54.
  42. Sherbon IW, Ledford RA, Regenstein I, Thompsom MP. Variants of milk proteins and their possible relation to milk properties. *J Anim Sci.* 1967;50:951-964.
  43. Strzalkowska N, Krzyzewski J, Zwierzchowski L, Ryniewicz Z. Effects of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin loci polymorphism, cows' age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black-and-White cattle. *Anim Sci Pap Rep* 2002; 20:21-35.
  44. Threadgill DW, Womack JE. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucl Ac Res.* 1990; 18:6935-42.
  45. Trujillo E, Camargo M, Norieda D. Genotipificación de kappa-caseína bovina y evaluación de frecuencias genotípicas y alélicas de sus polimorfismos en cuatro razas. *Act Biol* 2000; 22:145-152.
  46. Vaiman D, Mercier D, Moazami-Goudarzi K. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mamm Genome* 1994; 5:288-297
  47. Van Eenennaam AL, Medrano JE. Differences on allelic protein expression in the milk of heterozygous k-casein cow's. *J Dairy Sci* 1991;74:1491-1496.
  48. Velmala RJ, Vilkki HJ, Elo KT, de Koning DJ, Mäki-Tanila AV. A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. *Anim Gen* 1999; 30:136-143.
  49. Viana JL, Fernández A, Iglesias A, Sánchez y Becerra J. Análisis de los genotipos más frecuentes de la  $\kappa$ -caseína en la raza vacuna Rubia Galega mediante PCR/RFLPs. *Arch Zoot* 2001; 50:91-96.