



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

EL PERÚ PRIMERO

“Identificación de proteínas lácteas asociadas a características de importancia en la industria lechera”

Proyecto 232_PI

Blga. Judith García Cochagne
Investigadora Responsable del Proyecto



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego

CONTENIDO

1. Financiamiento.
2. Antecedentes.
3. Objetivos:
 - 3.1 Detectar variantes genéticas de las proteínas lácteas α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína y β -caseína en ganado bovino.
 - 3.2 Genotipificación de SNPs mediante PCR en tiempo real.
4. Conclusiones.



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

“Identificación de proteínas lácteas asociadas a características de importancia en la industria lechera”

Periodo de Ejecución 2018-2020

Monto total del Proyecto : S/ 650,750.00

(Seiscientos cincuenta mil setecientos cincuenta 00 soles)

Aporte PNIA: S/ 482,000.00

PNIA
Programa Nacional de
Innovación Agraria



UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE
MENDOZA DE AMAZONAS





PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego

Antecedentes

- La leche de vaca contiene proteínas como las caseínas y lactoglobulinas, que están asociadas a características de producción como contenido de leche, contenido y rendimiento proteico, contenido y rendimiento de grasas
- Alrededor del 75% de producción de leche en el mundo contiene variantes genéticas asociadas a características no deseadas, lo cual ha ocasionado la pérdida de la popularidad en el consumo de la leche de vaca.



https://elpais.com/elpais/2015/10/08/buenavida/1444317381_497336.html



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

- La leche de vaca contiene las proteínas α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína y β -caseína, las cuales constituyen aproximadamente el 70% del contenido proteico.
- Además, están asociadas a efectos sobre la salud humana como es el caso particular de la reacción alérgica causada por la variante A1 de β -caseína.



<https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/lechecruda/index.html>



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

- La existencia de ganado bovino con proteínas hipoalergénicas y que proporcionen mejores características productivas representa una alternativa para la elaboración de productos lácteos naturales hipoalergénicos y con un mayor rendimiento lechero.



<https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/sabe-usted-de-que-se-trata-la-leche-con-beta-caseina-a2>



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego

Objetivos

1. Detectar variantes genéticas de las proteínas lácteas α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína y β -caseína en ganado bovino.
2. Genotipificación de SNPs mediante PCR en tiempo real.



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego

OBJETIVO 1

Detectar variantes genéticas de las proteínas lácteas α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína y β -caseína en ganado bovino.



Actividad 1.1: Colecta de material genético de bovinos de raza lechera (Holstein y Brown Swiss) y poblaciones de bovinos criollos

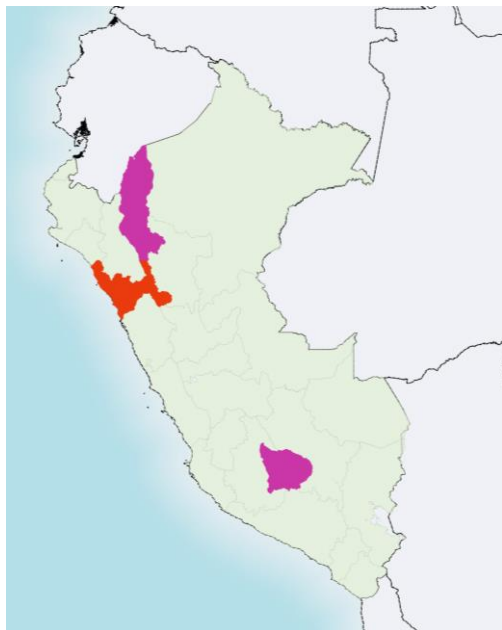
Colecta de muestras de pelo y sangre de bovinos Holstein y Brown Swiss de la empresa Láctea S. A. - Trujillo.



Colecta de muestras de pelo y sangre de bovinos criollos de Apurímac y Amazonas.



Lugares de colecta de material biológico

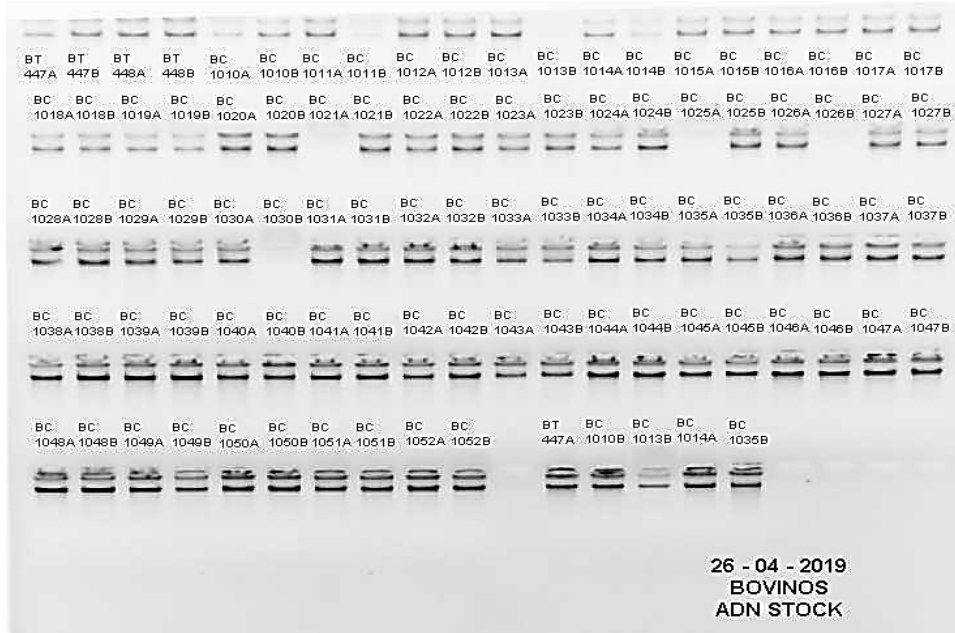
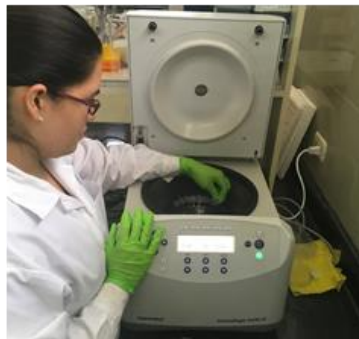
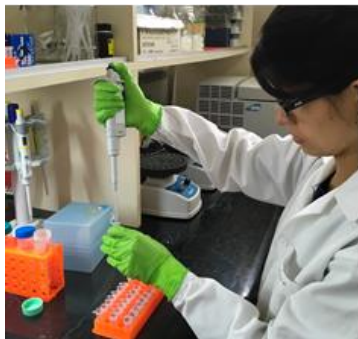
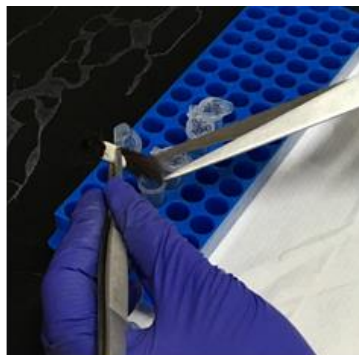
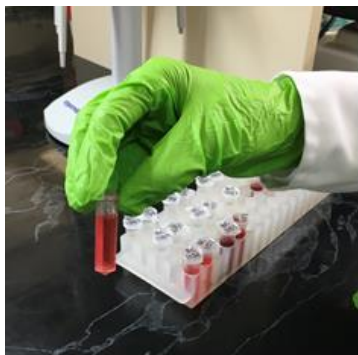


Departamento	Holstein	Brown Swiss	Criollos
Apurímac	-	-	100
Amazonas	-	-	69
La Libertad (LACTEA S.A.)	100	99	
Total	100	99	169



Se colectaron muestras de bovinos de razas lecheras de la empresa Lactea S. A., para determinar las frecuencias de las variantes alélicas de la beta caseína y comparar con las frecuencias alélicas en bovinos criollos procedentes de dos zonas con condiciones climáticas y geográficas diferentes (Apurímac y Amazonas).

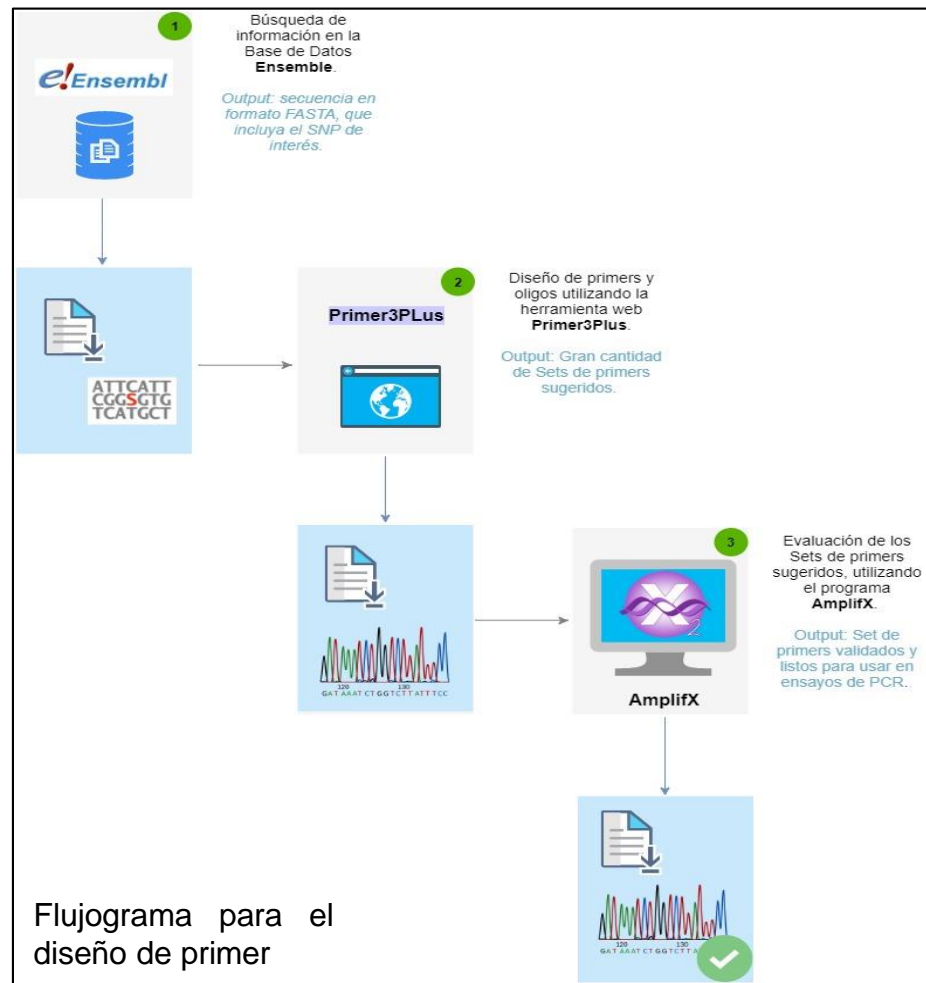
Actividad 1.2: Extracción de ADN de bovinos de raza lechera (Holstein y Brown Swiss) y bovinos criollos



26 - 04 - 2019
BOVINOS
ADN STOCK

Actividad 1.3: Diseñar "*primers*" específicos para los genes de las proteínas α S1-caseína (CSN1S1) y α S2-caseína (CSN1S2)

El diseño de primers se realizó utilizando el flujograma recomendado por el programa AmplifX.

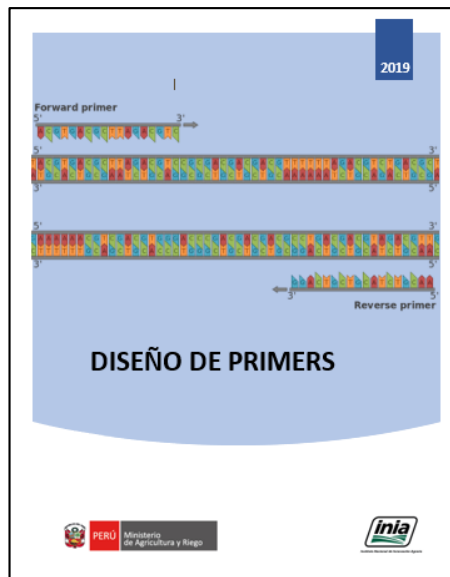


Flujograma para el
diseño de primer

Lista de los *primers* para la amplificación de los SNPs en estudio

Proteína	Gen Exón	SNP	Primers	Tamaño del amplicón	Referencia
α_{s1} - caseína	CSN1S1 Exón 17	rs43703010	CSN1S1-F223: 5` CAC TGT TGC TTT TTC AAT GGT C 3` CSN1S1-R223: 5` AAG GCA ACA ATA TGC AGT CAT TT 3`	223 bp	Jann, O., Prinzenberg, E. M., Brandt, H., Williams, J. L., Ajmone-Marsan, P., Zaragoza, P., Özbeyaz, C., & Erhardt, G. (2002). Intragenic haplotypes at the bovine CSN1S1 locus. <i>Archives Animal Breeding</i> , 45(1), 13-21.
α_{s2} - caseína	CSN1S2 Exón 3	rs441966828	B α S2_6090F: 5`-CCT AAA AGT CTC TTG CCA TC-3` B α S2_6342R: 5` ACA GTT CTA GAC TCA CTG GAG A 3`	255 bp	Ibeagha-Awemu, E. M., Prinzenberg, E. M., Jann, O. C., Lühken, G., Ibeagha, A. E., Zhao, X., & Erhardt, G. (2007). Molecular characterization of bovine CSN1S2* B and extensive distribution of zebu-specific milk protein alleles in European cattle. <i>Journal of Dairy Science</i> , 90(7), 3522-3529.

El diseño de *primers* fue en base a referencias bibliográficas.



SNPs específicos estudiados por el Proyecto 232_PI.

GEN	ID SNP	DESCRIPCIÓN
CSN2	rs43703011	Asociado a la sustitución del aminoácido prolina (CSN2*A2) por histidina (CSN2*A1)
CSN1S1	rs43703010	Asociado a la sustitución del aminoácido glutamina(CSN1S1*B) por el aminoácido glicina (CSN1S1*C)
CSN1S2	rs441966828	Asociado a la sustitución del aminoácido serina (CSN1S2*A) por el aminoácido fenilalanina (CSN1S2*B)

El SNP rs43703011, genera 2 alelos A1y A2, esta mutación puntual genera un cambio de aminoácido de Prolina por Histidina, involucrado con la generación de un péptido bioactivo en la salud humana.

Mientras que el SNP rs43703010 se encuentra en el exón 17, este SNP permite diferenciar las variantes *CSN1S1* B* y *CSN1S1*C*. Este SNP está relacionado con la cantidad de leche y cantidad de proteína de la leche.

Por último, el SNP rs441966828 se encuentra en el exón 3 del gen *CSN1S2*, este SNP diferencia las variantes *CSN1S2*A* y *CSN1S2*B*. Este SNP se usa como marcador de ascendencia cebú en razas europeas.

Guía de diseño de primers.



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego

OBJETIVO 2

Genotipificación de SNPs mediante PCR en tiempo real





PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

Variantes genéticas de proteínas de la leche en diferentes mamíferos

Principales variantes genéticas de las proteínas lácteas.

Component	Bovine (RECIO <i>et al.</i> 1997b)	Ewe (AMIGO <i>et al.</i> 2000)	Goat (MOIOLI <i>et al.</i> 1998)
α_{S1} -casein	A, B, C, D, E	A, B, C, D, E	A, B ₁ , B ₂ , B ₃ , C, D, E, F, G, O
α_{S2} -casein	A, B, C, D	A, B	A, B, C
β -casein	A ¹ , A ² , A ³ , B, C, D, E, X (named F 5P) (VISSER <i>et al.</i> 1995)	A, B, C	A, B, O
κ -casein	A, B, C, E	none existing	A, B
α -lactalbumin	A, B (VOELKER 1997)	A, B	A, B
β -lactoglobulin	A, B, C, D, E, F, G	A, B, C	A, B

Borkova, M., & Snaselova, J. (2005). Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. *Czech J. Food Sci*, 23(2), 41-50.

Organización estructural génica del clúster Caseína del Cromosoma 6 bovino

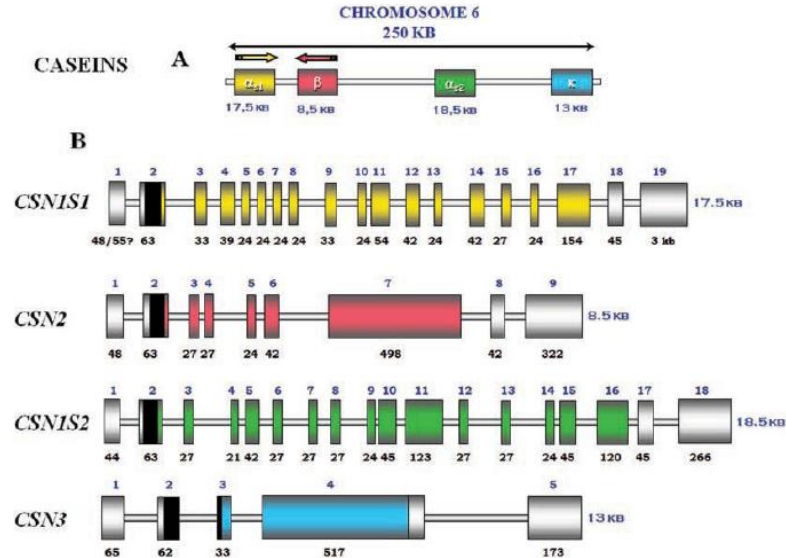


Figure 1. Structural organization of the transcription units encoding the 6 main milk proteins. Caseins: α_{1} -CN (*CSN1S1*), β -CN (*CSN2*), α_{2} -CN (*CSN1S2*), and κ -CN (*CSN3*). Whey proteins: α -LA (*LAA*) and β -LG (*LGB*). A) Genomic organization of the bovine casein locus. B) Structural organization of the 6 milk protein transcription units. Open bars represent introns; exons are depicted by large, gray 5' and 3' untranslated regions), black (part of exon encoding the signal peptide), and colored (exons and part of exons encoding matured proteins) boxes. Size of exons is given, in base pairs, under each exon with its number indicated on the top (modified from Martin et al., 2002).

Variantes del gen de la α -caseína

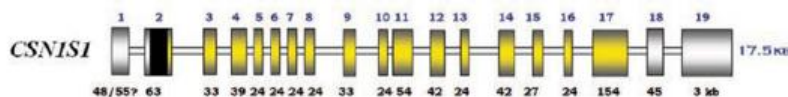
Variantes del gen *CSN1S1*

Table 4. Protein variants detected at the *CSN1S1* locus¹

Protein variant	Polymorphism compared with genomic reference	Location within gene	Amino acid exchange	No. of breeds	
				Taurine	Indicine
CSN1S1*B	None (reference)	—	—	14	3
CSN1S1*C	c.619A > G	Exon 17	Glu207Gly	9	3
CSN1S1*I	c.296A > T ²	Exon 11	Gln99Asp	1	3
CSN1S1*J	c.543G > T ²	Exon 17	Val182Phe	1	1

¹Alterations of the coding sequence are described in comparison with the cDNA of the genomic reference sequence X59856.2 representing the preprotein variant *CSN1S1*B*. The protein variant newly identified within the current study is highlighted in boldface. The letter assigned to the variant is proposed within the current study.

²In addition to c.619A > G.



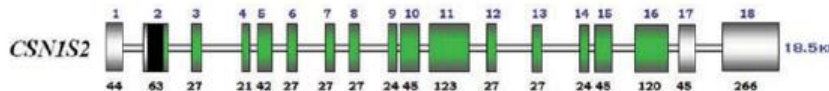
Variantes del gen *CSN1S2*

Table 6. Protein variants detected at the *CSN1S2* locus based on resequencing of genomic DNA¹

Protein variant	Polymorphism compared with genomic reference	Location within gene	Amino acid exchange	No. of breeds	
				Taurine	Indicine
CSN1S2*A	None (reference)	—	—	14	3
CSN1S2*B	c.68C > T	Exon 3	Ser23Phe	3	3
CSN1S2*D	c.221G > T	Exon 8	Glu74Asp	6	—
CSN1S2*E	c.64G > A	Exon 3	Val22Ile	1	—

¹Alterations of the coding sequence are described in comparison with the cDNA of the genomic reference sequence M94327 representing the preprotein variant *CSN1S2*A*. The protein variant newly identified within the current study is highlighted in boldface. The letters assigned to these variants are proposed within the current study.

²Leads to the skipping of exon 8 and, hence, to the deletion of the amino acids 51 to 59.





PERÚ

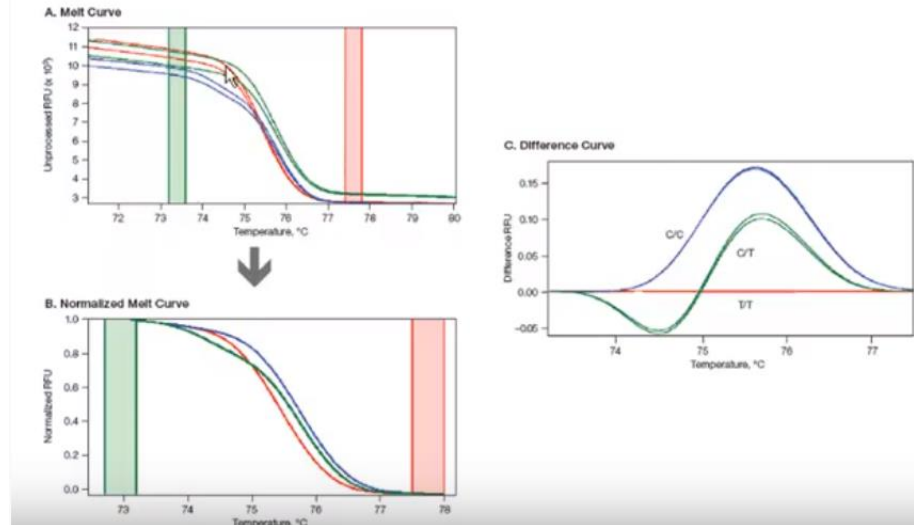
Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

Actividad 2.1. Genotipificación de las variantes *CSN1S1**B/C (rs43703010) y de las variantes *CSN1S1**A/B (rs441966828)

Metodología propuesta : *High Resolution Melting*



HRM es una técnica que permite la detección de mutaciones puntuales con el uso de un colorante intercalante fluorescente y el aumento de la temperatura. Dependiendo del contenido de nucleótidos la separación de la doble cadena difiere con la temperatura, lo cual se evidencia con el intercalante fluorescente. Es así que se observará diferentes curvas dependiendo del alelo presente.



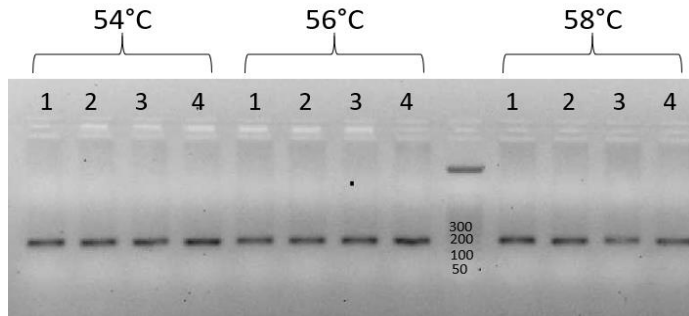
PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego

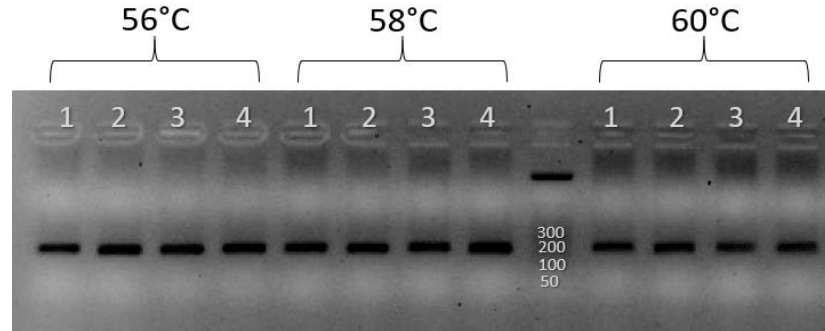


Instituto Nacional de Innovación Agraria

Amplificación por PCR conteniendo el SNP rs43702010 (*CSN1S1*) y SNP rs441966828(*CSN1S2*)



Amplificación de una región que contiene el exón 17 del gen *CSN1S1* (223 bp).



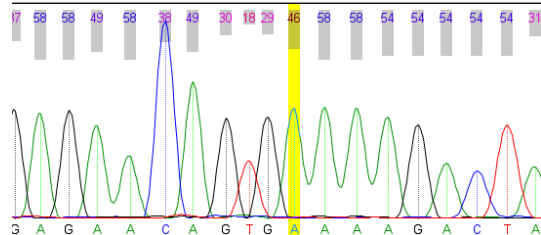
Amplificación de una región que contiene el exón 3 del gen *CSN1S2* (255 bp).



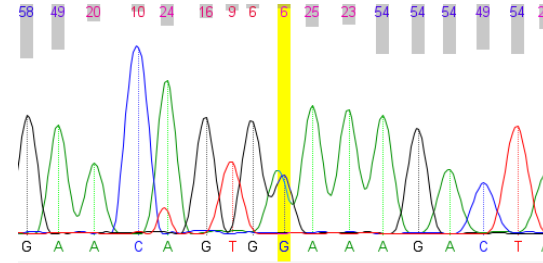
Secuenciamiento del exón 17 del gen *CSN1S1* conteniendo el SNP rs43703010, búsqueda de muestras controles para el ensayo HRM

Species/Abbrv	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
1. CSN1S1_ref	G	G	C	T	C	T	G	A	G	A	A	C	A	G	T	G	A	A	A	G	A	C	T	A	C	T	A	T	G	C	C	A	C
2. BT-248_CSN1S1-R.ab	G	G	C	T	C	T	G	A	G	A	A	C	A	G	T	G	A	A	A	G	A	C	T	A	C	T	A	T	G	C	C	A	C
3. BT-367_CSN1S1-R.ab	G	G	C	T	C	T	G	A	G	A	A	C	A	G	T	G	A	A	A	G	A	C	T	A	C	T	A	T	G	C	C	A	C
4. BT-338_CSN1S1-R.ab	G	G	C	T	C	T	G	A	G	A	A	C	A	G	T	G	R	A	A	G	A	C	T	A	C	T	A	T	G	C	C	A	C
5. BT-373_CSN1S1-R.ab	G	G	C	T	C	T	G	A	G	A	A	C	A	G	T	G	R	A	A	G	A	C	T	A	C	T	A	T	G	C	C	A	C

A/A

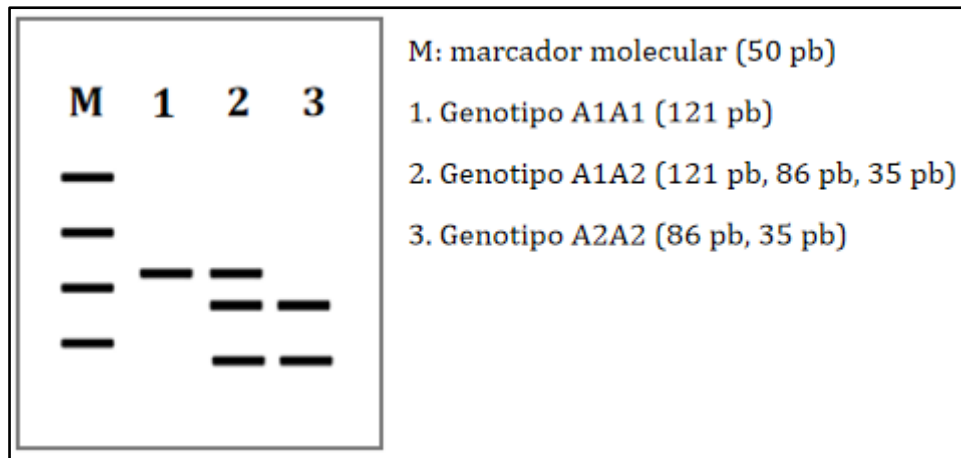


A/G Arginina=R



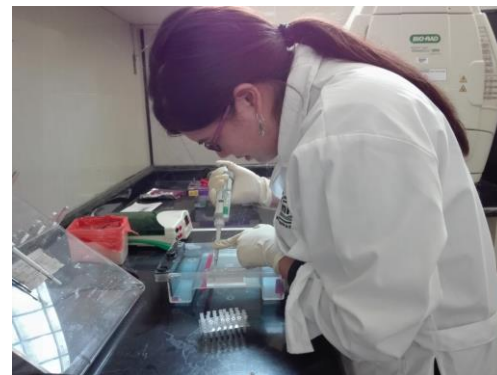
Actividad 2.2 Análisis del ensayo de Discriminación Alélica

Genotificación de las variantes A1/A2 de la proteína β -caseína (codificado por el gen *CSN2*) en bovinos de raza Holstein y Criollos del departamento de Apurímac.



Esquema de PCR-RFLP del gen *CSN2*.

Mediante un ensayo de PCR-RFLP se identificaron las variantes genéticas de la proteína β -caseína. Con esta técnica se realizó la identificación de los genotipos homocigotos (*CSN2**A1A1, *CSN2**A2A2) y heterocigoto (*CSN2**A1/A2).



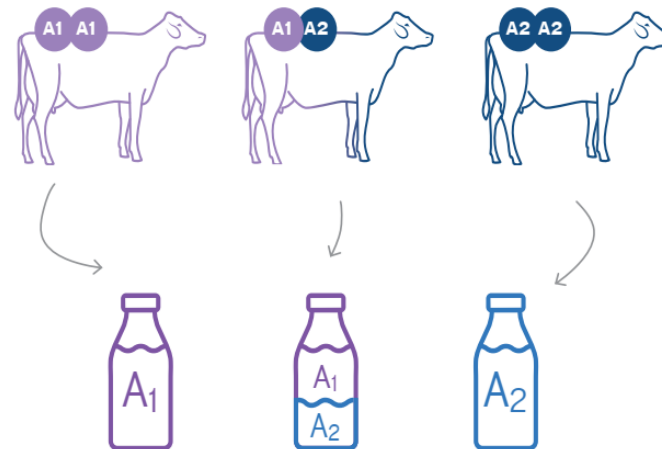
Actividad 2.2 Análisis del ensayo de Discriminación Alélica



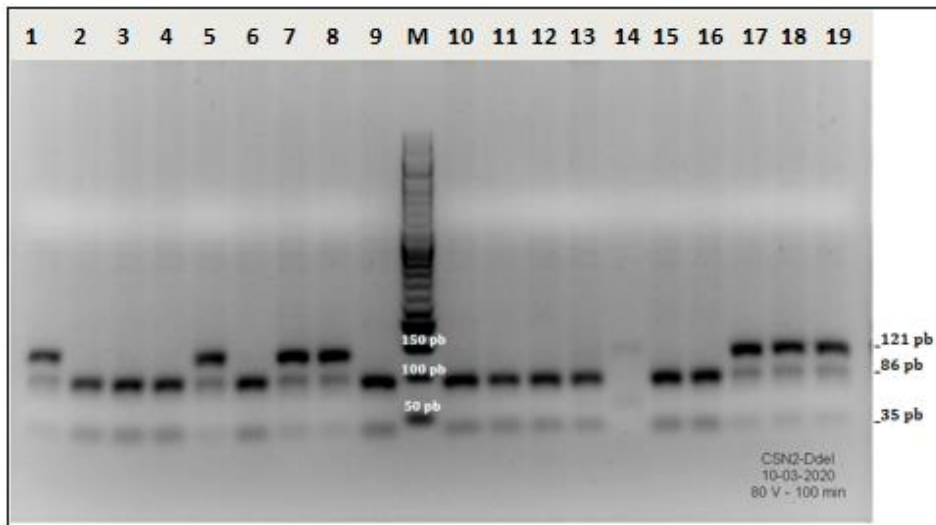
Genotipificación de muestras biológicas de bovinos de raza lechera (Holstein y Brown Swiss) y muestras de bovinos criollos de Apurímac y Chachapoyas colectados junto con las Estaciones Experimentales del INIA.

DIFERENÇA NO AMINOÁCIDO

Na posição 67 da B-caseína A1 e A2 e a sua consequente quebra e liberação da B-casomorfina-7.



Genotipificación por PCR-RFLP de las variantes genotípicas de la proteína β -caseína (genotipos CSN2*A1/A1, CSN2*A1/A2 y CSN2*A2/A2)



Patrón de electroforesis de fragmentos obtenidos de un ensayo PCR-RFLP para el gen *CSN2* con la enzima *Ddel* en gel de agarosa 3%. M: marcador de peso molecular (50 pb).

Se procesaron 159 muestras de ADN de bovinos: 75 muestras de ADN de bovinos raza Holstein y 57 de bovinos criollos del departamento de Apurímac.



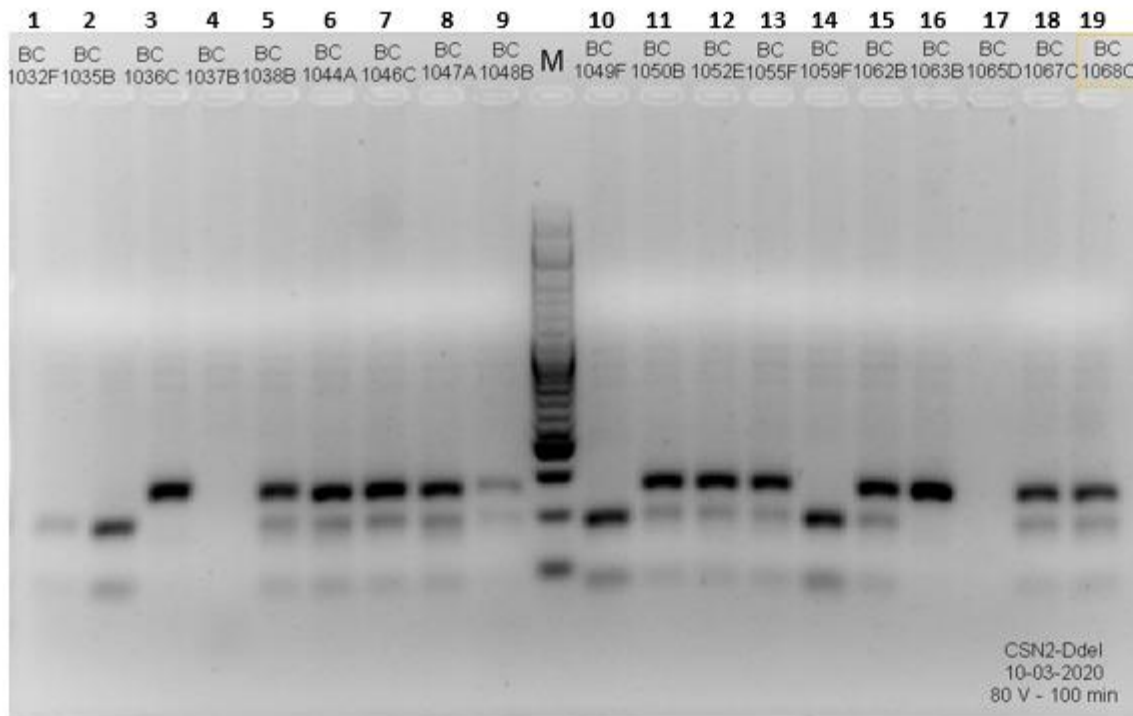
PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

Genotipificación de las variantes genotípicas de la proteína β -caseína por PCR- RFLP



Genotipos obtenidos

- 1) A2A2
- 2) A2A2
- 3) A1A1
- 4) -
- 5) A1A2
- 6) A1A2
- 7) A1A2
- 8) A1A2
- 9) A1A2
- 10) A2A2
- 11) A1A2
- 12) A1A2
- 13) A1A2
- 14) A2A2
- 15) A1A2
- 16) A1A1
- 17) -
- 18) A1A2
- 19) A1A2

Patrón de electroforesis de fragmentos obtenidos de un ensayo PCR-RFLP para el gen CSN2 con la enzima *DdeI* en gel de agarosa 3%. M: marcador de peso molecular (50 pb).



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

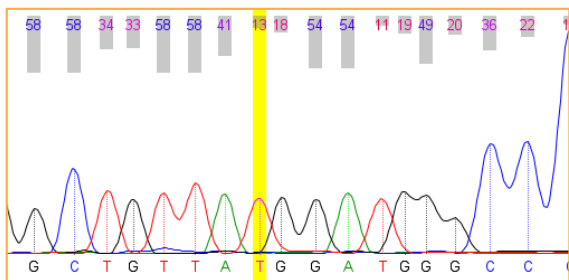
Frecuencias genotípicas y alélicas del gen CSN2 en bovinos raza Holstein y bovinos criollos del departamento de Apurímac y Amazonas

Población	N° Animales	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
		<i>CSN2^{A1A1}</i>	<i>CSN2^{A2A2}</i>	<i>CSN2^{A1A2}</i>	<i>CSN2^{A1}</i>	<i>CSN2^{A2}</i>
Bovinos raza Holstein	75	0.2	0.35	0.45	0.425	0.575
Bovinos criollos de Apurímac	57	0.05	0.49	0.46	0.28	0.72
Bovinos criollos de Amazonas	27	0.111	0.48	0.41	0.31	0.69

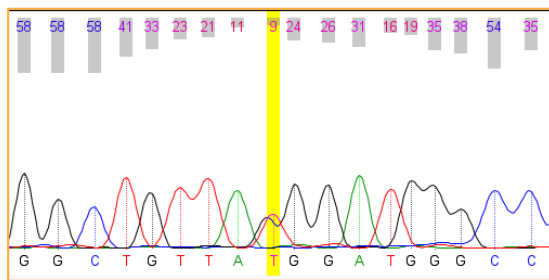


Secuenciamiento de beta caseína CSN2

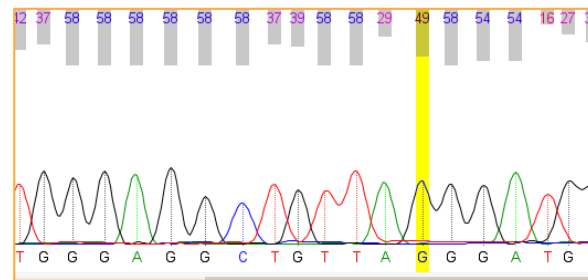
A1/A1 (T)



A1/A2 (T/G)



A2/A2 (G)



K: T/G

K: Lisina

Species/Abbrv	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*				
1. CSN2_ref	G	G	G	A	G	G	C	T	G	T	T	A	T	G	G	A	T	G	G	G	C	C	C	A	G	G	G	A	A
2. BT-248C_bKHRM2-R.ab1	G	G	G	A	G	G	C	T	G	T	T	A	T	G	G	A	T	G	G	G	C	C	C	A	G	G	G	A	A
3. BT-325D_bKHRM2-R.ab1	G	G	G	A	G	G	C	T	G	T	T	A	T	G	G	A	T	G	G	G	C	C	C	A	G	G	G	A	A
4. BT-296A_bKHRM2-R.ab1	G	G	G	A	G	G	C	T	G	T	T	A	K	G	G	A	T	G	G	G	C	C	C	A	G	G	G	A	A
5. BT-311B_bKHRM2-R.ab1	G	G	G	A	G	G	C	T	G	T	T	A	K	G	G	A	T	G	G	G	C	C	C	A	G	G	G	A	A
6. BT-254C_bKHRM2-R.ab1	G	G	G	A	G	G	C	T	G	T	T	A	G	G	G	A	T	G	G	G	C	C	C	A	G	G	G	A	A
7. BT-323A_bKHRM2-R.ab1	G	G	G	A	G	G	C	T	G	T	T	A	G	G	G	A	T	G	G	G	C	C	C	A	G	G	G	A	A



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

Conclusiones

- En bovinos criollos, el genotipo más frecuente de la proteína β -caseína es el $CSN2^*A2A2$ comparado con la raza Holstein.
- En bovinos de raza Holstein, el alelo más frecuente de la proteína β -caseína es el $CSN2^*A1$, relacionado al péptido BCM-7 (vinculado con alergia alimentaria y otros efectos negativos a la salud).
- Los bovinos criollos de Apurímac y Amazonas presentan genotipos potenciales para producir leche A2.



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

Logros obtenidos a través del proyecto

- Se logró estandarizar un protocolo para la caracterización de genotipos de β -caseína, la cual formará parte de la Guía de Servicios Biotecnológicos del INIA.
- Se logró establecer tres metodologías: para la colecta de material biológico en campo, extracción de ADN (laboratorio) y marcadores moleculares (diseño de primers).
- Se logró desarrollar Protocolos de PCR para la amplificación del gene α S1-caseína y α S2-caseína.
- Se logró desarrollar un protocolo de PCR-RFLP para la detección de variantes de β -caseína.
- Se logró un proyecto de tesis aprobada por la Universidad Católica de Santa María-Arequipa, titulada “Determinación de frecuencia de los alelos A1 y A2 del gen CSN2 en bovinos de raza Holstein y bovinos criollos del departamento de Apurímac”.
- Se logró fortalecer a la Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología (DRGB) a través de adquisición y mantenimiento de equipos.
- Se logró establecer un Protocolo para la Eliminación de Residuos Sólidos Peligrosos del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la DRGB.

Investigadores Responsables:

Blga. Judith García Cochagne.

Ing. Eudocio Veli Rivera.

Equipo Técnico:

Blga. Wendy Acuña Rodríguez.

Blga. Claudia Esther Yalta Macedo.

Blgo. Henry Mallqui Montilla.

Tesistas:

M.Sc. Claudia Lilliannie Ocampo Acuña.

Bach. Dayana Milagros Zúñiga Aranibar.

Apoyo:

Bach. Juan Torres Chuquillanqui.

Téc. Yris Tenazoa Armas.





PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

EL PERÚ PRIMERO