



IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO ALELO H DO GENE DA KAPPA-CASEÍNA (CSN3) EM ANIMAIS COM GENÉTICA ZEBUÍNA

Emanuele **Camonda**¹; Rodrigo **Giglioti**²; Fernanda Moralez Leme **Gomes**³; Anibal Eugênio Vercesi **Filho**⁴.

Nº 24715

RESUMO – *Variações alélicas no gene da kappa-caseína (k-CN, CSN3) em bovinos tem sido associadas com quantidade de gordura e proteína no leite, melhor coagulação da massa e produção de queijo. Quatorze variantes alélicas do gene k-CN já foram descritas, sendo as de maior frequência os alelos A, B e E. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia para a identificação e genotipagens de quatro variantes alélicas (A, B, E e H) do gene CSN3 que produzem 10 diferentes genótipos (AA, AB, AE, AH, BB, BE, BH, EE, EH e HH) pelo método de HRM (High Resolution Melting). Amostras de DNA de 121 e 82 vacas das raças Holandesa e de Girolando, respectivamente, previamente genotipados para o gene k-CN foram utilizados. Foram desenhados primers que flanqueiam uma região específica do gene k-CN. Reações de HRM foram padronizadas usando o corante intercalante EvaGreen®. O método de HRM foi capaz de discriminar os 10 genótipos com elevada acurácia.*

Palavras-chave: alelos, HRM, genotipagem, especificidade, CSN3.

1 Emanuele Camonda, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação Biomedicina, FAM, Americana-SP; manucamonda@gmail.com,

2 Colaborador, Pesquisador do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP

3 Colaborador, Pesquisador do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP

2 Orientador: Pesquisador do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP; aefilho@sp.gov.br



ABSTRACT – *Allelic variations in the kappa-casein gene (k-CN, CSN3) in cattle have been associated with fat and protein content in milk, milk coagulation properties and cheese production. Fourteen allelic variants of the k-CN gene have already been described, the most frequent being the A, B and E alleles. The objective of this study was to develop a methodology for the identification and genotyping of four allelic variants (A, B, E and H) of the CSN3 gene that produce 10 different genotypes (AA, AB, AE, AH, BB, BE, BH, EE, EH and HH) using the HRM (High Resolution Melting) method. DNA samples from 121 and 82 cows of the Holstein and Girolando breeds respectively, previously genotyped for the k-CN gene were used. Primers that flank a specific region of the k-CN gene were designed. HRM reactions were standardized using EvaGreen® intercalating dye. The HRM method was able to discriminate the 10 genotypes with high accuracy.*

Keywords: *alleles, HRM, genotyping, specificity.*

1. INTRODUÇÃO

Na composição do leite bovino existem dois grandes grupos de proteínas: as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas constituem 80% das proteínas lácteas (Goulding et al., 2020) e são divididas em quatro tipos: α -S1- (CSN1-S1, 39–46%), α -S2- (CSN1-S2, 8–11%), β - (CSN2, 25–35%) e κ -caseína (CSN3, 9–15%) que ocorrem aproximadamente nas proporções 4:1 e 4:1 respectivamente (Grosclaude, 1988; Visser et al., 1991).

Dentre as caseínas, a K-CN é considerada a menor, sendo formada por 169 aminoácidos e com quatorze variantes genéticas já descritas (Gai et al. 2021; Hewa Nadugala et al. 2022). A maior parte dos trabalhos e artigos acadêmicos apresentam estudos apenas das variantes A e B (Silva, 2022). Dado ao fato de sua maior frequência e estarem correlacionadas à características produtivas (Jiménez-Montenegro et al. 2022).

A K-CN estabiliza as micelas do leite, evitando que se agreguem e ajuda a manter o fosfato de cálcio em solução (Boland et al., 2001; Dalgleish and Corredig, 2012), se tornando a proteína do leite com maior importância para a coagulação da massa e estabilidade da micela da caseína, fornecendo repulsão estérica e eletrostática entre as micelas para evitar a agregação através da camada superficial 'cabeluda' das micelas (Comin et al., 2008; Jensen et al., 2012).

As diferenças entre os alelos A e B são devidas a duas mutações nos aminoácidos 136 e 148, respectivamente por uma Treonina (Thr) e Aspartato (GAT) substituídas por uma isoleucina



(ATC) e Alanina (GCT) (Neelin, 1964; Schmidt, 1964), enquanto na posição 155, uma serina (Ser) no alelo A é substituída por uma glicina (Gly) no alelo E (Miranda et al, 1993). No alelo H assim como no alelo B na posição 136 a diferença é dada por uma isoleucina (Ile) no lugar da Treonina (Thr) no alelo A, porém na posição 146 se mantém o Aspartato (Asp) (Farrell, et al.2004).

Jiménez-Montenegro et al (2022) afirmam que as variantes alélicas estão relacionadas com o teor de proteína, gordura e produção de leite. Dentre as variantes alélicas, a B está relacionada a um maior teor de proteína (Rachagani and Gupta, 2008; Bonfatti et al., 2010a; Khastayeva et al., 2021), assim como com maior porcentagem de gordura e resistência ao calor do leite em pH natural.

A variante E está relacionada com um menor teor de proteína em comparação com as variantes A e B, embora os genótipos que contenham o alelo E estejam associados a alta produção de leite (Ikonen et al., 1999). De acordo com Gai et al., (2021), o genótipo AA está relacionado a produção de coalhada ácida mais firme. Sobre a variante H, não há estudos que comprovem sua relação direta com teor de proteína, gordura e produção de leite (Silva, 2022).

Segundo Martin et al (2002) queijos produzidos a partir de leite de vacas BB apresentaram maior teor de proteína, maior rendimento e melhor qualidade do que os produzidos por vacas que possuam outros genótipos O que justifica a utilização do gene da kappa caseína como marcador molecular em programas de melhoramento genético que visem melhorar as propriedades físico-químicas do leite para a fabricação de diversos produtos lácteos.

Os métodos anteriormente para genotipagem da K-CN em bovinos eram de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP-PCR) (Medrano e Aguilar-Cordova, 1990; Soria et al., 2003), Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples-PCR (SSCP-PCR) (Barroso et al., 1998), Sistema de Amplificação-Mutação Refratária-PCR (ARMS -PCR) (Fonseca et al., 2013) e análise de fusão de alta resolução pós qPCR (qPCR-HRM) (Kysel'ová et al., 2012; Ilie et al., 2017).

Kysel'ová et al. (2012) desenvolveram um método HRM para genotipar animais e identificaram os genótipos AA, AB, BB, AE e BE, não sendo possível incluir o genótipo homozigoto EE e os genótipos heterozigotos *AH*, *BH*, em sua análise.

O presente estudo teve como objetivo desenvolver um método de High Resolution Melting (HRM) para a genotipagem das variantes alélicas A, B, E e H que produzem dez genótipos diferentes (AA, AB AE, AH, BB, BE, BH, BE, EE, EH e HH).



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras experimentais e extração de DNA

Vinte e quatro amostras de DNA bovino (quatro de cada genótipo: AA, BB, EE, AB, AE e BE) previamente genotipadas para o gene K-CN por sequenciamento de DNA Sanger são fornecidas a partir da coleção de DNA do Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Zootecnia-IZ, Nova Odessa, estado de São Paulo, Brasil. Até o momento, as amostras contendo os genótipos EH e HH não foram identificadas. Essas amostras de DNA foram extraídas de amostras de folículos capilares usando um kit Easy-DNA™ (Cat. nº K1800-01—Protocolo nº 1—Pequenas amostras de sangue e folículos capilares; Invitrogen, Carlsbad, EUA), conforme recomendado pelo fabricante. A quantidade e a pureza do DNA extraído foram estimadas por leituras espectrofotométricas em 260 nm e razões de 260/280 nm, respectivamente. As concentrações de DNA de todas as amostras testadas foram ajustadas para 5 ng/μL

2.2. Desenho dos primers design e sequenciamento do DNA

Um conjunto de primers de reações de PCR e qPCR foi projetado a partir de sequências que flanqueiam o gene que codifica a Kappa-caseína bovina (gene CSN3; ID: AY380229.1) (Tabela 1). O primers foram desenhados usando o software PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). A especificidade e a qualidade das sequências foram testadas usando as ferramentas online NetPrimer, OligoAnalyzer IDT e BLAST (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>)(<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Doze amostras, duas amostras de cada genótipo, foram novamente genotipadas por sequenciamento de DNA e serviram como controle para o desenvolvimento dos ensaios. Os ensaios foram realizados para um volume final de 50 μL usando 0,2 μL de Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (5 U/μL; Invitrogen), 1,5 μL de MgSO₄ (Invitrogen), 5 μL de Taq DNA Polymerase PCR Buffer 10 × [(600 mM Tris–SO₄ (pH 8,9), 180 mM (NH₄)₂SO₄; Invitrogen)], 1 μL de mistura dNTP 10 mM (Sigma–Aldrich, St. Louis, EUA), 2 μL de cada iniciador direto e reverso de 10 μM (Tabela 1) e 2 μL de DNA (10 ng). As condições da PCR foram: 95°C por 5 minutos (ativação enzimática), seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 45 segundos (annealing) e 68°C por 1 minuto (extensão), com extensão final a 68°C por 5 minutos.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram purificados usando um Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, EUA) de acordo



com as recomendações do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada usando um kit de sequenciamento de ciclo BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e, em seguida, analisada por um analisador de DNA ABI Prism 3730XL (Applied Biosystems).

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas no software CLUSTAL/W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) e comparadas com as já depositadas no GenBank. As sequências contig também foram avaliadas pelo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabela 1. Sequências de primers usados em PCR para sequenciamento de DNA, qPCR-HRM em tempo real.

Assay	Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
PCR sequencing	KPCR-F	TCACCCACACCCACATTTATC	371
	KPCR-R	TTAGCCCATTTCGCCTTCTC	
qPCR-HRM*	KqPCR-F	GGTGAGCCTACAAGTACA	122
	KqPCR-R	GCAGTTGAAGTAACTTGGAC	

*Eficiência média da reação (E) = $97,8 \pm 0,04$ (obtida pela ferramenta LinReg).

2.3. Ensaios de qPCR-HRM

Uma PCR quantitativa em tempo real quantitativa (qPCR), seguida de análise de HRM, foi realizada em volumes de reação de 10 µL usando um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Venlo, Holanda). Cada reação continha 5,4 µL de água estéril, 2 µL de mistura 5 × HOT FIREPol EvaGreen® HRM (Solis Biodyne, Tartu, Estônia), 0,3 µM de cada iniciador (KqPCR-F1 ou KqPCR-F2 e KqPCR-R) e 2 µL de DNA (10 ng).

Um controle de modelo negativo foi incluído em cada execução de PCR. A qPCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 12 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação (95 °C por 15 segundos), anelamento (63,0 °C por 30 segundos) e extensão (72 °C por 20 segundos).

Após a amplificação, a análise HRM para genotipagem foi realizada usando duas curvas de dissociação de 65 a 95 °C em incrementos de 0,2 °C e 0,1 °C, aumentando a 0,1 °C/2 s. O gradiente de temperatura para anelamento dos primers também foi testado, com amplitude entre 59 °C a 65 °C.

As reações foram realizadas em microtubos de 100 μ L (tubos e tampas de tiras de PCR®; Produto nº PCR-0104-C; Axygen®, Nova York, EUA) usando um Rotor-Gene Q (Qiagen) equipado com um rotor de 72 poços. O software RotorGene Q foi usado para analisar e determinar os genótipos, usando um valor de confiança de $\geq 90\%$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os testes de genotipagem por HRM para a genotipagem do gene kappa-caseína (CSN3) em bovinos onde o objetivo era fazer a genotipagem dos alelos A, B e E, uma parte das amostras de Girolando apareceu uma genotipagem inespecífica que não se encaixava em nenhuma das amostras controles. Essa amostra foi sequenciada descobrindo ser o alelo H.

Para as análises qPCR-HRM, o conjunto de primers foi capaz de diferenciar os oito genótipos (Fig. 1 A e B).

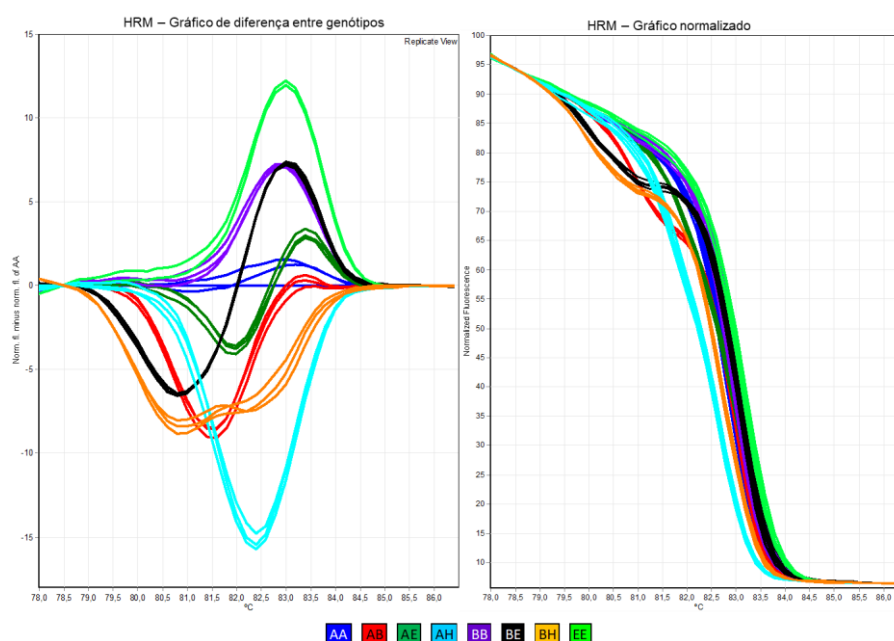


Figura 1 Análise qPCR-HRM dos genótipos



A análise permitiu determinar a frequência dos genótipos e os alelos em ambas as raças apresentadas.

Tabela 2 Frequência genética

Genetic group	Genotype frequency (%)		Allelic frequency (%)	
Holstein	AA	24.8 (30)	A	45.3
	AB	42.1 (51)	B	41.9
	AE	13.2 (16)	E	12.8
	BB	14.1 (17)		
	BE	5.8 (7)		
Girolando	AA	18.3 (15)	A	44.8
	AB	23.2 (19)	B	25.9
	AE	15.8 (13)	E	11.9
	AH	20.7 (17)	H	17.5
	BB	7.3 (6)		
	BE	4.9 (4)		
	BH	9.8 (8)		

4. CONCLUSÃO

O método sequenciamento de sangue e qPCR-HRM foi capaz de discriminar os oitos genótipos avaliados, com alta acurácia, e pode ser aplicado em análises de genotipagem para a discriminação desses oito genótipos Kappa-caseína.

Tendo em vista a importância que as variantes alélicas da k-CN têm sobre os efeitos da quantidade e/ou qualidade do leite de vaca e derivados para uma produção mais rentável de derivados os é de grande importante se fazer a genotipagem do rebanho de maneira em que todos os animais do rebanho sejam genotipados corretamente e é fundamental o desenvolvimento de métodos precisos e de baixo custo para a discriminação dessas variantes.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.



Bibliografia

- Azevedo, A.L.S., Nascimento, C.S., Steinberg, R.S., Carvalho, M.R.S., Peixoto, M.G.C.D., Teodoro, R.L., Verneque, R.S., Guimarães, S.E.F., Machado, M.A. 2008. **Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle**. Genet. Mol. Res. 7, 623–630.
- Boland M, MacGibbon A and Hill J (2001). **Designer milks for the new millennium**. Livest. Prod. Sci. 72: 99-109.
- Bonfatti, V., Di Martino, G., Cecchinato, A., Vicario, D., & Carnier, P. (2010a). Effects of b-k-casein (CSN2-CSN3) haplotypes and b-lactoglobulin (BLG) genotypes on milk production traits and detailed protein composition of individual milk of Simmental cows. **Journal of Dairy Science**, 93, 3797e3808.
- Botaro, B.G., Lima, I.V.R., Cortinhas, C.S., Prada e Silva, L.F., Rennó, F.P., Santos, M.V. 2009. **Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk**. Animal Production. R. Bras. Zootec. 38 (12).
- Comin, A.; Cassandro, M.; Chessa, S.; Ojala, M.; Dal Zotto, R.; de Marchi, M.; Carnier, P.; Gallo, L.; Pagnacco, G.; Bittante, G. **Effects of Composite β - and κ -Casein Genotypes on Milk Coagulation, Quality, and Yield Traits in Italian Holstein Cows**. J. Dairy Sci. 2008, 91, 4022–4027.
- Dalgleish DG and Corredig M (2012). **The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing**. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 3: 449-467.
- FARRELL JR, H. M. et al. **Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision**. Journal of dairy science, v. 87, n. 6, p. 1641-1674, 2004.
- Fonseca, P. A. S. et al. 2013. **A new tetra-primer ARMS-PCR for genotyping bovine kappa-casein polymorphisms**. Genet. Mol. Res. 12, 6521–6526..
- Gai, N., Uniacke-Lowe, T., O'Regan, J., Faulkner, H., Kelly, A.L. 2021. **Effect of Protein Genotypes on Physicochemical Properties and Protein Functionality of Bovine Milk: A Review**. Foods, 10, 2409.
- Goulding, D.A., Fox, P.F., O'Mahony, J.A. 2020. **Milk proteins: An overview**. In M. Boland, H. Singh (Eds.), **Milk proteins: From expression to food** (3rd ed., pp.21-98). London, UK: Academic Press.
- Grosclaude, F. (1988). **Le polymorphisme e génétique des principales lactoprotéines bovines: Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait**. INRA Productions Animales 1:5-17.



- Hewa Nadugala, B., Pagel, C.N., Raynes, J.K., Ranadheera, C.S., Logan, A., 2022. **The effect of casein genetic variants, glycosylation and phosphorylation on bovine milk protein structure, technological properties, nutrition and product manufacture.** Int. Dairy J. 133, 10544
- Ikonen, T., Ojala, M., Ruottinen, O. 1999. **Associations Between Milk Protein Polymorphism and First Lactation Milk Production Traits in Finnish Ayrshire Cows.** J Dairy Sci 82:1026–1033.
- Ilie, D. E., Neamț, R. I., Popescu, C. & Săplăcan, G. 2017. **Preliminary report on CSN3 and LGB genes polymorphism among two Roma-nian cattle breeds.** Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol. 50, 69–73.
- Jensen, H.B.; Holland, J.W.; Poulsen, N.A.; Larsen, L.B. **Milk Protein Genetic Variants and Isoforms Identified in Bovine Milk Representing Extremes in Coagulation Properties.** J. Dairy Sci. 2012, 95, 2891–2903.
- Jiménez-Montenegro, L., Mendizabal, J.A., Alfonso, L., Azparren, L., Urrutia, O. 2022. **Development of a duplex qPCR assay with locked nucleic acid probes for A, B and E kappa-casein variants detection.** Sci. Rep., 12(1):16387.
- Khastayeva, A.Z., Mamayeva, L.A., Abylgazinova, A.T., Zhamurova, V.S., Karimov, N.Z., Muratbekova, K.M. 2021. **Influence of the kappa casein genotype on the technological properties of cow milk of Simmental and Alatau breeds.** Functional & Integrative Genomics (2021) 21:231–238.
- Kysel'ová, J., Rychtářová, J., Sztankóová, Z. & Czerneková, V. 2012. **Simultaneous identification of CSN3 and LGB genotypes in cattle by high-resolution melting curve analysis.** Livest. Sci. 145, 275–279.
- Martin, P.; Szymanowska, M.; Zwierzchowski, L.; Leroux, C. **The Impact of Genetic Polymorphisms on the Protein Composition of Ruminant Milks.** Reprod. Nutr. Dev. 2002, 42, 433–459.
- Medrano, J.F., Aguilar-Cordova, E. 1990. **Genotyping of bovine Kapp-casein loci following DNA sequence amplification.** Biotechnology, 8, 144-146.
- Neelin, J.M. 1964. **Variants of κ -casein revealed by improved starch gel electrophoresis.** Journal of Dairy Science 47: 506-509.
- Rachagani, S., Gupta, I.D. 2008. **Bovine kappa-casein gene polymorphism and its association with milk production traits.** Genetics and Molecular Biology, 31, 4, 893-897.
- Rincó, G. & Medrano, J. F. 2003. **Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR.** J. Anim. Breed. Genet. 1, 331–337.
- SILVA, R. C.. **Análise quantitativa da produção de artigos científicos para CSN3 em bovinos de aptidão leiteira.** 2022. 49f. Trabalho de conclusão de curso (ZOOTECNIA). Pontifícia universidade católica de goiás escola de ciências medicas e da vida. Goiânia ,Goiás, 2022.



18º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2024

27, 28 e 29 de agosto de 2024

ISSN: 2965-2812

Schmidt, D.G. 1964. **Starch gel electrophoresis of κ -casein**. Biochimica Biophysica Acta 90: 411-414.

Visser, S., Slangen, C.J., Rollema, H.S. (1991). **Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography**. Journal of Chromatography, 548, 361-370.