

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS  
DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA  
PROTEINA BETA-LACTOGLOBULINA EN LECHE DE VACA  
JERSEY”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**L.B.T. MARTHA ANGÉLICA TELLO SÁNCHEZ**

**DIRIGIDA POR**

**DRA. BLANCA ESTELA GARCÍA ALMENDÁREZ**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, NOVIEMBRE 2019.**



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

# “EVALUACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA PROTEINA BETA-LACTOGLOBULINA EN LECHE DE VACA JERSEY”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

L.B.T. Martha Angélica Tello Sánchez

Dirigido por:

Dra. Blanca Estela García Almendárez

Dra. Blanca Estela García Almendárez  
Presidente

Dr. Carlos Regalado González  
Secretario

M. en C. Carlos Raúl García Ugalde  
Vocal

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Suplente

Dr. Aldo Amaro Reyes  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Noviembre 2019  
México

## RESUMEN

La leche materna provee los requerimientos nutricionales para el desarrollo infantil, no obstante, en México, el consumo de fórmulas infantiles (FI) aumenta 5.5 % anualmente. Las FI se fabrican mayormente con leche de bovino, que tiene diferencias importantes en proteínas como caseínas,  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg). La  $\beta$ -Lg no está presente en la leche humana, por ello es uno de los principales alérgenos en leche bovina. Existen alrededor de 12 variantes genéticas, con pesos moleculares y puntos isoeléctricos muy similares, A y B son las más comunes. La respuesta inmune, mayormente a la variante A, puede causar desórdenes gastrointestinales, alteraciones en la proliferación celular y diabetes infantil tipo 2. El objetivo de este trabajo es la purificación, identificación e inmunodetección de las variantes de  $\beta$ -Lg en leche de vaca Jersey y el desarrollo de una técnica para la genotipificación del ganado. El esquema de purificación diseñado se aplicó a leche cruda. La cuantificación de proteínas por el método fluorométrico Qubit y se probaron tres métodos electroforéticos para la separación de las variantes. Se llevaron a cabo la inmunodetección de  $\beta$ -Lg y su variante B y la genotipificación por la longitud de los fragmentos de restricción de los polimorfismos (PCR-RFLP) por digestión con la enzima *HaeIII*. Mediante la estrategia de purificación, se obtuvo un concentrado de proteínas de suero con 83 % de  $\beta$ -Lg. La separación de dos bandas cercanas a 18.4 kDa, peso molecular de la  $\beta$ -Lg, se logró por SDS-PAGE con geles de gradiente. La inmunodetección confirmó que las bandas obtenidas correspondían a las variantes de  $\beta$ -Lg, sin embargo no fue posible la distinción por la detección de la variante B. Con muestras de DNA genómico se obtuvo un producto de amplificación de 252 pb (Exón IV del gen  $\beta$ -Lg). La digestión con *HaeIII* reveló que el genotipo de mayor frecuencia fue el heterocigoto AB con un 45 %. Este trabajo permitió sentar las bases para desarrollar un método de identificación y diferenciación de las variantes genéticas de  $\beta$ -Lg en ganado, generando la oportunidad de continuar investigaciones para su estandarización y aplicación como método de rutina a nivel industrial.

Palabras clave: Variantes genéticas de  $\beta$ -lactoglobulina, leche de ganado Jersey, fórmulas infantiles.

## SUMMARY

Breast milk provides nutritional requirements for infant development, however, in Mexico the consumption of infant formulas increases 5.5 % annually. Infant formulas are manufactured mostly with bovine milk, which has important differences in proteins such as caseins,  $\alpha$ -lactoalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg). B-Lg is not present in human milk, so it is one of the main allergens in bovine milk. There are about 12 genetic variants, with very similar molecular weights and isoelectric points, A and B are the most common. The immune response to  $\beta$ -Lg, mostly variant A, can cause gastrointestinal disorders, alterations in cell proliferation and childhood diabetes type 2 in the childhood stage. The objective of this work is the purification, identification and immunodetection of the variants of  $\beta$ -Lg in Jersey cow's milk and the development of a technique for genotyping the cattle. The designed purification scheme was performed on raw milk samples. The quantification of proteins by the fluorometric method Qubit and three electrophoretic methods were tested for the separation of the variants. The Immunodetection was performed for  $\beta$ -Lg and its variant B, and genotyping were carried out by analyzing the restriction fragment length of the polymorphisms (PCR-RFLP) by digestion with *HaeIII*. Through the purification strategy, it was possible to obtain a whey protein concentrate with 83 %  $\beta$ -Lg. The separation of two bands close to 18.4 kDa, molecular weight of  $\beta$ -Lg, was achieved by the SDS-PAGE method with gradient gels. The immunodetection confirmed that the bands obtained corresponded to the  $\beta$ -Lg variants, however, the distinction by the detection of the B variant was not possible. With genomic DNA samples a 252 bp amplification product was obtained, corresponding to exon IV of the  $\beta$ -Lg gene. Digestion with *HaeIII* resulted in restriction fragments that allowed genotyping, which revealed that the most frequent genotype was heterozygous AB with 45 %. This work allowed us to lay the foundations for the development of a method of identifying and differentiate the genetic variants of  $\beta$ -Lg present in cattle, generating the opportunity to continue research for the standardization and application as a routine method at industrial level.

Key words:  $\beta$ -lactoglobulin genetic variants, Jersey cow's milk, infant formulas.

## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca que me fue otorgada periodo (2017-2019) y el apoyo como proyecto PEI-INNOVAPYME 252440 (2018).

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Química y al Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos por permitirme realizar mis estudios en esta valiosa institución.

A las empresas Nucitec y Ecológico Tierra Viva, brindarme las herramientas necesarias para este proyecto.

A mi tutora Dra. Blanca García, a M. en C. Carlos Raúl García Ugalde y a mi comité por sus valiosas aportaciones al proyecto y por ser grandes mentores en mi desarrollo académico.

A mi familia y amigos, en especial a mi madre y a mi esposo, por el cariño, el apoyo incondicional y por estar siempre pendientes de mi crecimiento personal y profesional.

A mis amigos de generación Sandra, Karla, Keila, Pablo y Martín, por compartir conmigo esta experiencia académica y hacerla lo más agradable y divertida posible.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Alimentos Ivanna y Ángel, por regalarme parte de su tiempo y conocimiento, que fueron clave para lograr mis objetivos.

A todos los que directa o indirectamente formaron parte de este logro.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	Página
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. La leche y su consumo.	1
1.1.1. Composición de la leche de bovino.	1
1.1.2. Composición de la leche en función de la raza, Holstein-Friesian y Jersey.	3
1.2. Beta-lactoglobulina.	5
1.3. Alergenicidad a beta-lactoglobulina.	7
1.4. Fórmulas lácteas infantiles especializadas.	8
1.5. Análisis de proteínas en leche.	9
1.5.1. Concentración de la proteína por ultrafiltración.	10
1.5.2. Cuantificación de proteínas mediante el sistema Qubit Protein.	11
1.5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida, discontinuo y desnaturalizante.	13
1.5.4. Inmunodetección (Western blot).	17
1.5.5. Genotipificación por PCR-RFLP (Reacción en cadena de la polimerasa - Longitud de los fragmentos de restricción de los polimorfismos), utilizando la endonucleasa <i>HaeIII</i> .	18
<b>2. OBJETIVOS</b>	21
2.1. OBJETIVO GENERAL.	21
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.	21

<b>3. METODOLOGÍA</b>	22
3.1. Estrategia de purificación de $\beta$ -Lg en suero de leche de ganado Jersey.	22
3.1.1. Muestreo.	22
3.1.2. Descremado.	22
3.1.3. Purificación de las proteínas de suero de leche.	22
3.2. Cuantificación de proteína de suero de leche mediante el sistema Qubit.	22
3.3. Métodos Electroforéticos en gel de poliacrilamida.	24
3.3.1. SDS-PAGE.	24
3.3.2. SDS-PAGE con gel de gradiente %T	26
3.3.3. Urea-PAGE.	26
3.3.4. Tinción con azul de Coomassie brillante G-250.	27
3.4. Identificación de las variantes de beta-lactoglobulina mediante inmunodetección (Western blot).	28
3.5. Genotipificación por PCR-RFLP	31
<b>4. RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	33
4.1 Efectividad de la estrategia de purificación de $\beta$ -Lg en suero de leche de ganado Jersey.	33
4.2 Separación electroforética de las variantes de beta-lactoglobulina por SDS-PAGE.	37
4.3 Separación electroforética de las variantes de beta-lactoglobulina por Urea-PAGE.	43
4.4 Separación electroforética de las variantes de beta-lactoglobulina por SDS-PAGE con gradiente de entrecruzamiento.	45
4.5 Inmunodetección de las variantes de $\beta$ -Lg.	51
4.6 Genotipificación de beta-lactoglobulina por PCR-RFLP	56

<b>5. CONCLUSIONES</b>	62
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	64

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.		Página
1	Composición en porcentaje de la leche de humano y bovino.	2
2	Composición típica de las proteínas mayoritarias en leche de humano y de bovino.	3
3	Diferencias principales en la composición de la leche de bovinos Jersey y Holstein-Friesian.	3
4	Composición de proteínas en función de la raza.	4
5	Características fisicoquímicas de las proteínas de la leche.	4
6	Frecuencia de las variantes A, B y C de $\beta$ -Lg en función de la raza.	7
7	Fragmentos de restricción de los polimorfismos de $\beta$ -Lg con <i>HaeIII</i> .	20
8	Características técnicas del fluorómetro Qubit.	23
9	Volúmenes de preparación para ensayo Qubit.	24
10	Preparación de diferentes concentraciones de gel separador y concentrador SDS-PAGE.	25
11	Tabla de purificación de $\beta$ -Lg	35
12	Descripción de las muestras de leche	35
13	Cálculo de la concentración de proteínas en cada muestra.	36
14	Cuantificación de proteínas para las muestras J1R, J2R y J1C	36
15	Volúmenes establecidos para la separación electroforética	37
16	Muestras de permeado de ultrafiltración de leche jersey, para el gel SDS-PAGE 15 % T.	38
17	Orden de inyección de muestras de permeado para SDS-PAGE 15 % T, S1806141.	38
18	Estimación del peso molecular, carril 5 muestra de permeado de ultrafiltración de suero de leche Jersey S1806141.	40
19	Muestras de retenido de ultrafiltración de leche jersey, para el gel SDS-PAGE 15 % T.	41

20	Orden de inyección de muestras de retenido para SDS-PAGE 15 % T S180642.	41
21	Estimación del peso molecular, carril 3 muestra de retenido de ultrafiltración de suero de leche Jersey S1806142.	43
22	Muestras de permeado y retenido de ultrafiltración de leche jersey, en gel Urea-PAGE 20 % T.	44
23	Orden de inyección de muestras para Urea-PAGE 18 % T, U1806061.	44
24	Muestras de retenido de ultrafiltración de leche jersey, en gel SDS-PAGE 4 – 20 % T.	45
25	Orden de inyección de muestras para SDS-PAGE 4 – 20 % T, S1808101.	46
26	Estimación de peso molecular para beta lactoglobulina en gel de gradiente 4 – 20 % T, carriles 7 y 8, S1808101.	47
27	Muestras de retenido de ultrafiltración de leche jersey, en gel SDS-PAGE 8 – 16 % T.	48
28	Orden de inyección de muestras para SDS-PAGE 8 – 16 % T, S1811301.	48
29	Análisis de muestras de retenido, gel de gradiente 8 – 16 % T.	50
30	Muestras de retenido de ultrafiltración de leche jersey AA, AB y BB.	51
31	Orden de inyección gel de gradiente 8 – 16 % T para inmunoblot (1)	51
32	Orden de inyección gel de gradiente 8 – 16 % T para inmunoblot (2)	53
33	Orden de inyección gel de gradiente 8 – 16 % T (3)	54
34	Cuantificación de material genético y medición de calidad del DNA por la relación $A_{260}/A_{280}$ en vacas Jersey.	56
35	Cuantificación de material genético y medición de calidad del DNA por la relación $A_{260}/A_{280}$ en vacas Holstein.	59
36	Genotipos en las muestras digeridas con <i>HaeIII</i> .	60

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Estructura y dimerización de la $\beta$ -lactoglobulina.	5
2	Alineamiento de los polimorfismos en las variantes genéticas A y B de Beta-lactoglobulina.	6
3	Métodos de separación de proteínas lácteas.	10
4	Fluorocromo NanoOrange, complejo fluorocromo-proteína y longitudes de onda de emisión y excitación.	12
5	Patrones de migración esperados a diferentes porcentajes (% T) del gel de poliacrilamida.	15
6	Etapas del inmunoblot.	18
7	Digestión mediante enzima de restricción <i>Hae</i> III.	19
8	Guía de preparación de muestras para Qubit 2.0.	23
9	Manejo de la interfaz Qubit 2.0.	24
10	Sistema de transferencia Trans-blot Turbo.	29
11	Ensamblado del sándwich para transferencia.	29
12	SDS-PAGE 12 % T.	33
13	SDS-PAGE 15 % T para muestras de permeado de ultrafiltración de leche de ganado Jersey 14JUN18.	39
14	Análisis del marcador de peso molecular 14JUN18.	39
15	SDS-PAGE 15 % T para muestras de retenido de ultrafiltración de leche de ganado Jersey 14JUN18.	42
16	Análisis del marcador de peso molecular 14JUN18 (2).	42
17	Urea-PAGE 18 % T para muestras de retenido de ultrafiltración de leche de ganado Jersey 06JUL18.	44
18	SDS-PAGE 4 – 20 % T para muestras de retenido de ultrafiltración de leche de ganado Jersey 10AGO18.	46

19	Análisis del marcador de peso molecular, gel de gradiente 4 – 20 % T.	47
20	SDS-PAGE 8 – 16 %T para muestras de retenido de ultrafiltración de leche de ganado Jersey 30NOV18.	48
21	Análisis del marcador de peso molecular en gel de gradiente 8 – 16 % T.	49
22	Resultado del Inmunoblot para beta-lactoglobulina (1).	52
23	Resultado de Inmunoblot para beta-lactoglobulina (2)	53
24	Resultado del Inmunoblot para beta-lactoglobulina B	54
25	Verificación de la integridad del material genético.	56
26	Condiciones de amplificación del gen $\beta$ -Lg.	57
27	Resultado de la amplificación del gen $\beta$ -Lg	57
28	Genotipificación del gen $\beta$ -Lg mediante la restricción de <i>Hae</i> III.	58
29	Genotipificación de $\beta$ -Lg mediante la digestión con <i>Hae</i> III de muestras de ganado Jersey y Holstein.	60

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La leche y su consumo.

La leche es uno de los alimentos de origen animal más importantes y completos en la dieta humana, siendo indispensable en los primeros años de vida, cuando el organismo es incapaz de procesar otros alimentos.

El Codex Alimentarius la define como la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior (FAO y OMS, 2011).

La leche tiene como función principal brindar los requerimientos nutricionales de los neonatos mamíferos, como las necesidades nutricionales y fisiológicas de cada especie son únicas, la composición de cada leche muestra marcadas diferencias (Fox et al., 2015).

Los humanos consumimos leche de diferentes tipos de animales, pero la principal es la obtenida de bovinos, con un promedio de 83 % de la producción mundial, seguida de la leche de búfala 13 %, cabra 2.4 %, oveja 1.4 % y camella 0.3 % (Muehlhoff et al., 2013).

#### 1.1.1. Composición de la leche de bovino.

La leche de vaca es considerada una fuente de lípidos, proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales. Adicionalmente, contiene agentes anti-infecciosos, hormonas, factores de crecimiento, citosinas, nucleótidos, péptidos, poliaminas y enzimas (Haug et al., 2007).

La composición de la leche de bovino es similar a la leche humana, aunque se encuentran diferencias significativas en los carbohidratos y proteínas, como lo muestra la Tabla 1.

Tabla 1. Composición en porcentaje de la leche de humano y bovino.  
(Fox et al., 2015).

<b>Especie</b>	<b>Humano (p/p)</b>	<b>Bovino (p/p)</b>
Sólidos totales	12.2 %	12.7 %
Grasa	3.8 %	3.7 %
Proteína	1.0 %	3.4 %
Carbohidratos	7.0 %	4.8 %
Cenizas	0.2 %	0.7 %

En particular, la fracción proteica de la leche de vaca, es rica en péptidos y proteínas bioactivas, algunas de las cuales tienen actividad antimicrobiana como la inmunoglobulina, lisozima, lactoperoxidasa y lactoferrina (Crittenden y Bennet, 2005).

El valor de la leche de bovino para consumo humano está determinado por la composición de grasa y proteína. La fracción proteica comprende 6 principales nutrientes: cuatro caseínas ( $\alpha$ 1-caseína,  $\alpha$ 2-caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína) y dos proteínas de suero, la  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La) y la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg). En la Tabla 2, se puede observar la concentración de proteínas de leche de vaca en comparación con la leche humana, donde claramente se muestra la ausencia de algunas caseínas y de  $\beta$ -Lg en la leche materna humana (Ganai et al., 2009).

Tabla 2. Composición típica de las proteínas mayoritarias en leche de humano y de bovino (Crittenden y Bennet, 2005).

<b>Proteína</b>	<b>Humana (mg/mL)</b>	<b>Bovina (mg/mL)</b>
$\alpha$ -lactoalbúmina	2.2	1.2
$\alpha$ <sub>1</sub> -caseína	0	11.6
$\alpha$ <sub>2</sub> -caseína	0	3.0
$\beta$ -caseína	2.2	9.6
$\kappa$ -caseína	0.4	3.6
$\gamma$ -caseína	0	1.6
Inmunoglobulinas	0.8	0.6
Lactoferrina	1.4	0.3
<b><math>\beta</math>-lactoglobulina</b>	<b>0</b>	<b>3.0</b>
Lisozima	0.5	Trazas

#### 1.1.2. Composición de la leche en función de la raza, Holstein-Friesian y Jersey.

Las vacas Jersey y Holstein-Friesian son las dos razas más comunes utilizadas para la producción de fórmulas infantiles, Jensen y colaboradores en 2012, encontraron que existen diferencias significativas en la concentración de grasa, proteína y lactosa entre ambas razas, lo cual se puede observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Diferencias principales en la composición de la leche de bovinos Jersey y Holstein-Friesian (Jensen et al., 2012).

<b>Raza</b>	<b>Jersey (g/100 g)</b>	<b>Holstein-Friesian (g/100 g)</b>
Grasa	5.93 - 6.05	3.51 - 4.43
Proteínas	4.15 - 4.49	3.28 - 3.67
Lactosa	4.62	4.71 - 4.78

Adicionalmente, la investigación mostró que las concentraciones de la fracción proteica variaban en función de la raza, los resultados se muestran en la Tabla 4, algunas características fisicoquímicas se observan en la Tabla 5.

Tabla 4. Composición de proteínas en función de la raza (Farrell et al., 2004; Jensen et al., 2012).

Proteína	Jersey (p/p)	Holstein-Friesian (p/p)
$\alpha_{s1}$ -caseína	23.7 - 25.75 %	22.70 - 24.66 %
$\alpha_{s2}$ -caseína	5.25 - 6.03 %	5.35 - 5.89 %
$\beta$ -caseína	29.73 - 31.59 %	32.94 - 34.36 %
$\kappa$ -caseína	7.48 - 9.51 %	8.19 - 10.85 %
$\alpha$ -lactoalbúmina	2.38 - 2.73 %	3.06 - 3.15 %
<b><math>\beta</math>-lactoglobulina</b>	<b>6.75 - 7.18 %</b>	<b>6.51 - 7.33 %</b>

Tabla 5. Características fisicoquímicas de las proteínas de la leche (Jensen et al., 2012).

Proteína	Variante	Peso Molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico
$\alpha_{s1}$ -caseína	B	23.62	
	C	23.54	4.44 - 4.76
$\alpha_{s2}$ -caseína	A	25.23	
	A <sup>1</sup>	24.02	
$\beta$ -caseína	A <sup>2</sup>	23.98	4.83 - 5.07
	B	24.09	
$\kappa$ -caseína	A	19.04	5.45 - 5.77
	B	19.01	5.3 - 5.8
Lactoferrina	-	76.11	7.8 - 8.81
Lactoperoxidasa	-	78.00	9.2 - 9.9
$\alpha$ -lactoalbúmina	B	14.18	4.2 - 4.8
<b><math>\beta</math>-lactoglobulina</b>	<b>A</b>	<b>18.36</b>	
	<b>B</b>	<b>18.28</b>	<b>5.13</b>

Las proteínas del suero son estructuras globulares, hidrosolubles y de rápida digestibilidad, las cuales tienen un papel importante como fuente de aminoácidos esenciales. Existe una relación entre la cantidad de caseína y las proteínas del suero, particularmente con la  $\beta$ -Lg, en esta proporción a mayor concentración de caseína, generalmente hay menor concentración de  $\beta$ -Lg (Haug et al., 2007; Ganai et al., 2009).

## 1.2. Beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg).

La  $\beta$ -Lg, es una proteína globular homóloga a la seroglobulina humana. Pertenece a la familia de las lipocalinas, está presente en la leche de rumiantes y no rumiantes, como el cerdo, caballo, perro, gato, delfín y marsupiales, interesantemente está ausente en la leche de los humanos, lagomorfos y roedores (Pérez et al., 1989).

Tiene un peso aproximado de 18.4 kDa, su punto isoeléctrico es 5.13 y forma oligómeros a pH mayor a 3.0, ésta dimerización disminuye su alergenicidad. Su presencia en la leche significa aproximadamente el 7 % del total de proteínas y del 50 al 60 % de las proteínas de suero. La estructura secundaria está compuesta por 15 % alfa hélice, 50 % láminas beta y 15 a 20 % giros reversa. En la Figura 1 se puede observar un modelo de su estructura terciaria y su dimerización (Mercadante et al., 2012).

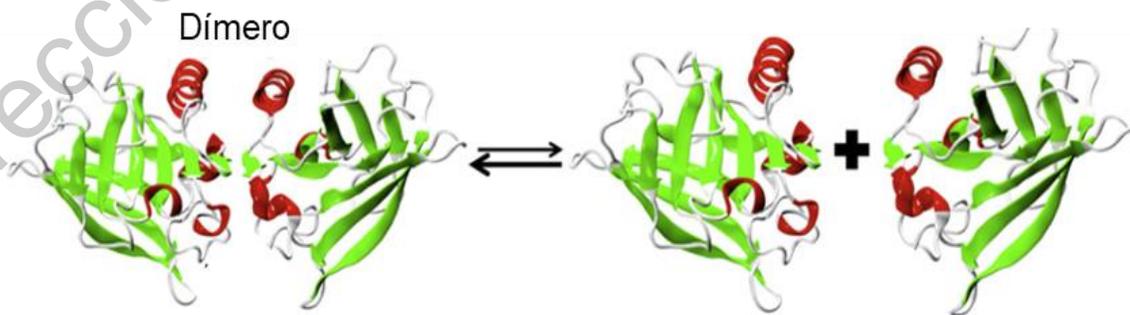


Figura 1. Estructura y dimerización de la  $\beta$ -lactoglobulina (Mercadante et al., 2012).

El gen de la  $\beta$ -Lg (GenBank: DQ489319.1) consta de 7677 pares de bases, el cual contiene la secuencia de 537pb (GenBank: X14712.1), que codifican para la proteína de 162 aminoácidos (Alexander et al., 1989; Braunschweig, 2006). Se han identificado al menos 12 variantes de la proteína, siendo la A y la B las más comunes, la presencia de estas variantes, puede ser determinante en la concentración de la  $\beta$ -lactoglobulina. Los pesos moleculares correspondientes son de 18.36 kDa para la variante A y 18.28 kDa para la variante B y el punto isoeléctrico de ambas se encuentra cerca del pH de 5.13, esta información es de vital importancia para el diseño de una estrategia de purificación efectiva (Ganai et al., 2009).

La diferencia entre las variantes es únicamente en dos residuos, Asp en la posición 64 y Val 118 para la variante A (GeneBank: U31361.1) y para la variante B (GeneBank: Z48305.1), Gly en la posición 64 y Ala en la 118 (Figura 2). Ambas contienen 5 residuos de cisteína en la posición 66,106, 119, 121 y 160. Estas cisteínas forman 2 puentes disulfuro, 66-160 y 106-119, 121 es un grupo tiol libre y se encuentra “enterrado” en el centro de la estructura y participa en la estabilidad de la proteína nativa (Hyttinen et al., 1995; Medrano, 1995; Farrell et al., 2004).

		Variante B GenBank: Z48305.1 <i>B.taurus</i> gene for beta-lactoglobulin variant B			Variante A GenBank: U31361.1 <i>Bos taurus</i> beta lactoglobulin A gene										
Puntuación	Método	Identidades	Positivos	Vacíos											
357 bits(916)	Compositional matrix adjust.	176/178(99%)	176/178(98%)	0/178(0%)											
Consulta 1	MKCLLLALALTCGAQALIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVE	60													
Sujeto 1	MKCLLLALALTCGAQALIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVE	60			<b>Inicio</b>										
Consulta 61	ELKPTPEGDLEILLQKWENGECAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKYLL	120			<b>64</b>	Gly/Asp	<table border="0"> <tr><td>[</td><td>C</td><td>C</td><td>A</td></tr> <tr><td>]</td><td>C</td><td>T</td><td>A</td></tr> </table>	[	C	C	A	]	C	T	A
[	C	C	A												
]	C	T	A												
Sujeto 61	ELKPTPEGDLEILLQKWENDECAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKYLL	120													
Consulta 121	FCMENSAPAEQSLVFCQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI	178			<b>118</b>	Ala/Val	<table border="0"> <tr><td>[</td><td>C</td><td>A</td><td>G</td></tr> <tr><td>]</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> </table>	[	C	A	G	]	C	G	G
[	C	A	G												
]	C	G	G												
Sujeto 121	FCMENSAPAEQSLVFCQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI	178													

Figura 2. Alineamiento de los polimorfismos en las variantes genéticas A y B de beta-lactoglobulina. Obtenido de la interfaz Blast a partir de las secuencias obtenidas por Hyttinen y colaboradores (1995) y Medrano (1995).

La variante genética A, tiene una concentración más alta que la B, es probable que la diferencia no sea causada por la sustitución de aminoácidos, sino por los diferentes niveles de expresión correspondientes a los alelos A y B del gen. Esta expresión diferencial puede deberse a polimorfismos en las secuencias regulatorias. La frecuencia de las variantes genéticas más comunes en función de la raza, se muestran en la Tabla 6 (Jensen et al., 2012).

Tabla 6. Frecuencia de las variantes A, B y C de  $\beta$ -Lg en función de la raza (Jensen et al., 2012).

<b>Variante</b>	<b>Jersey (p/p)</b>	<b>Holstein-Friesian (p/p)</b>
A	44.4 - 56.0 %	38.5 - 58.3 %
B	36.0 - 53.7 %	41.7 - 61.5 %
C	1.9 - 8.0 %	0 %

Se han identificado más de 50 polimorfismos, algunos de ellos en la región promotora del gen  $\beta$ -Lg bovino y otras en las secuencias regulatorias, se cree que algunos de estos polimorfismos pueden causar diferencias en las concentraciones de cada variante (Ganai et al., 2009).

### 1.3. Alergenicidad a beta-lactoglobulina.

La alergenidad o potencial alergénico, es la capacidad que tiene un material a causar reacciones alérgicas, frecuentemente asociadas a una respuesta de inmunoglobulinas E. En el caso de los alimentos, existen diversos alérgenos, que pueden provocar una reacción adversa mediada por los mecanismos inmunológicos, entre los cuales se destacan las proteínas de la leche y el huevo (Verhoeckx et al., 2015).

Los principales alérgenos de la leche son las caseínas, la  $\beta$ -Lg y la  $\alpha$ -La. Los menos comunes son la albúmina de suero bovino y las inmunoglobulinas. La mayoría

de las proteínas en la leche que se consideran alérgenos, son glicoproteínas (Bu et al., 2009; O’Riordan et al., 2014).

Numerosas proteínas de la leche han sido implicadas en respuestas alérgicas y muchas de estas han mostrado contener múltiples epítopes, a los cuales responden más de un mecanismo inmunológico. La incidencia y dominancia de los mecanismos alérgicos cambia con la edad, las reacciones más comunes en la infancia son mediadas por la inmunoglobulina E (IgE) y en la adultez muestran mecanismos diferentes (Olivier et al., 2012; Tai et al., 2016).

Las proteínas del suero, primordialmente la  $\beta$ -Lg que como se había mencionado, no se encuentra en la leche humana, es una de las fuentes más importantes de alérgenos, provocando respuesta de inmunoglobulinas E y asociada también a la inducción de la proliferación celular anormal. La incidencia de alergias por proteínas de leche (CMPA por sus siglas en inglés) varía con la edad, mostrando mayor prevalencia en la niñez temprana con 2 a 6 % y decrece en la adultez a un 0.1 a 0.5 % (Crittenden y Bennet, 2005; Tai et al., 2016; Lamberti et al., 2017).

A pesar del alto contenido de alérgenos en la leche bovina, el alto contenido en nutrientes ha sido el motivo por el que es utilizada ampliamente como ingrediente esencial en la manufactura de alimentos especializados en la industria farmacéutica y alimentaria, siendo uno de los productos más importantes la nutrición infantil (Haug et al., 2007).

#### 1.4. Fórmulas lácteas infantiles especializadas.

La OMS recomienda la alimentación exclusiva con leche materna durante los primeros seis meses de vida y a alargarse hasta los 18 de ser posible, no obstante la ENSANUT 2012 en México, reveló que el consumo de fórmulas infantiles aumenta alrededor de 5.5 % cada año, generando una derrama económica de aproximadamente 30,000 millones de pesos, resultando en que sea el único alimento

de 6 de cada 7 niños desde los primeros meses de vida (OMS, 2009; INSP, 2012; González-de Cosío et al., 2013).

Según el Codex Alimentarius las fórmulas infantiles se definen como el producto en forma líquida o en polvo utilizado como sustituto de la leche materna para satisfacer las necesidades nutricionales normales de los lactantes; o como el producto destinado a lactantes con necesidades nutricionales especiales. Las fórmulas infantiles deberán ser nutricionalmente adecuadas para favorecer el crecimiento normal y el desarrollo de los lactantes cuando se emplean de acuerdo con sus instrucciones de uso. Se caracterizan por cubrir, al menos en cuanto al contenido en macro y micronutrientes, todas las necesidades del lactante durante los primeros cuatro o seis meses de vida, y pueden ser utilizadas junto con otros alimentos hasta la edad de un año (FAO y OMS, 2007).

Actualmente, las fórmulas infantiles están basadas en su mayoría en leche de origen bovino y se aplican para la nutrición en etapas tempranas cuando no es posible la alimentación con leche materna. Sin embargo la tendencia a la formulación de leches especializadas, es muy alta, sobre todo para reducir posibles efectos negativos en lactantes. Por ejemplo, trabajos previos de la unidad de trabajo como la producción de leche libre de  $\beta$  caseína, para disminuir riesgos importantes a la salud de lactantes (Duarte et al., 2017) o la remoción de  $\beta$ -Lg de concentrados de suero para fórmulas y suplementos infantiles realizados por Lucena y colaboradores (2006).

#### 1.5. Análisis de proteínas en leche.

Como se menciona anteriormente, la leche contiene diferentes proteínas, cada una de ellas con sus particulares propiedades físico-químicas. Debido a que únicamente es de nuestro interés la  $\beta$ -Lg, es necesario llevar a cabo un tratamiento de las muestras de leche para separar la fracción del suero. Existen distintos métodos de separación de las proteínas de la leche como se observa en la Figura 3. En

nuestro caso, se seguirá la separación las proteínas del suero por precipitación ácida y ultrafiltración.

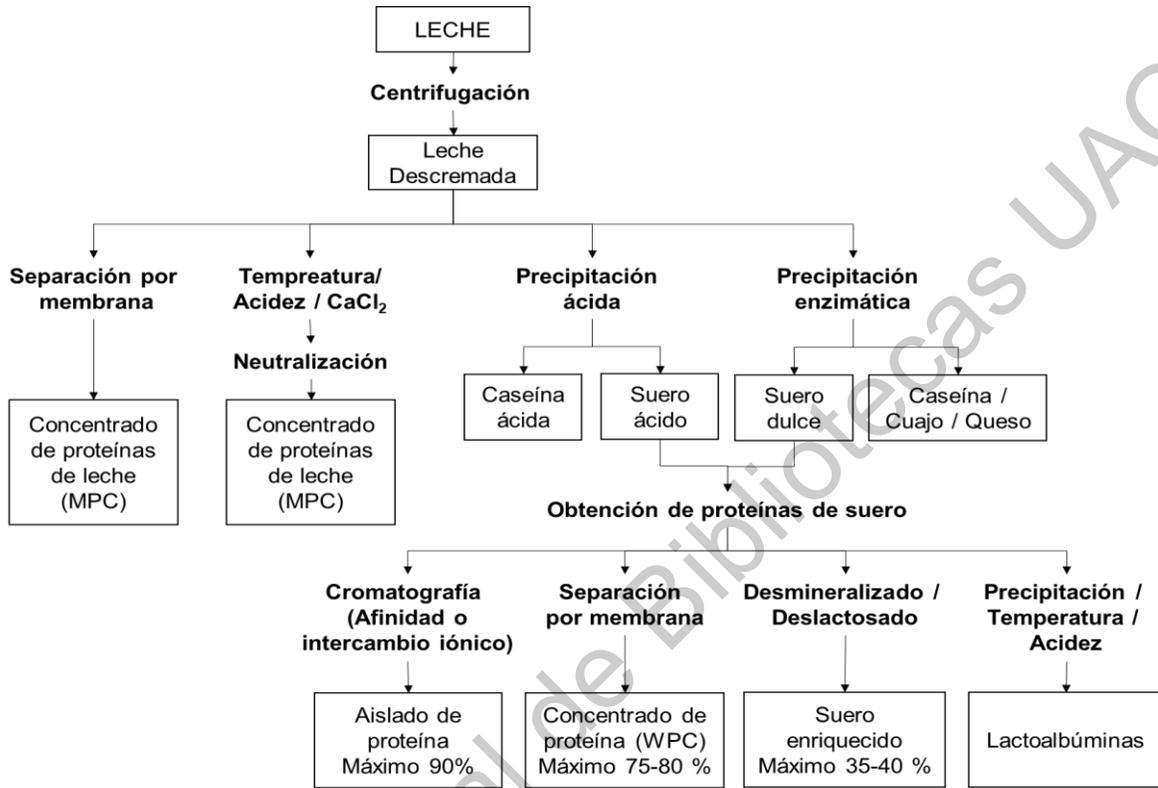


Figura 3. Métodos de separación de proteínas lácteas (Maubois, 1984; Gaso-Sokac, et al., 2011; Labrou, 2014).

### 1.5.1. Concentración de la proteína por ultrafiltración.

La ultrafiltración es el proceso de separación por membrana, mediante el cual un fluido pasa a través de una membrana semipermeable por el efecto de fuerzas hidrostáticas, osmóticas o un gradiente de potencial (Vincent y Hall, 2012). Las membranas de ultrafiltración, están diseñadas para proveer una alta retención de proteínas y otras macromoléculas, la matriz se basa en una variedad de polímeros sintéticos con una estabilidad térmica alta y resistividad química (Van Reis y Zydney, 2007).

La elección de la membrana usualmente se guía por su peso molecular de corte (MWCO por sus siglas en inglés), el MWCO es definido como el equivalente de peso molecular de la proteína más pequeña que presentaría un rechazo superior al 90 % (Zydney, 2001). Es recomendado que se elija un punto de corte al menos dos veces menor al peso molecular del soluto que se desea concentrar. Algunos factores que pueden afectar el porcentaje de recuperación son la concentración inicial de la proteína, naturaleza hidrofóbica, temperatura, tiempo de centrifugación y pH (Merck-Millipore, 2013).

A diferencia del método convencional de concentración térmica del suero, cuyas desventajas son el alto consumo de energía, alto contenido de cenizas y lactosa en el concentrado, además de los cambios en las características del suero por la aplicación de calor, la ultracentrifugación se ha convertido en la opción más aceptada. En previas investigaciones, la separación de  $\beta$ -Lg de las proteínas de suero bovino, fue lograda al fraccionar la porción proteica mediante ultrafiltración con una membrana de polietilensulfona de 10 y 30 kDa MWCO (Baldasso et al., 2011; Bhattacharjee et al., 2006).

Las unidades Amicon® ultra, están diseñadas para lograr una concentración de las proteínas de una muestra de 25 a 80 veces en un tiempo corto, constan de una membrana vertical de celulosa y tubos de polipropileno para recuperar la muestra. La elección de la unidad depende del peso molecular de la proteína, el volumen final y el factor de concentración deseado (Merck-Millipore, 2015).

#### 1.5.2. Cuantificación de proteínas mediante el sistema Qubit Protein.

El ensayo fluorométrico Qubit para proteínas, se basa en la asociación del fluoróforo NanoOrange a las regiones hidrofóbicas de las proteínas y a las interacciones en los complejos detergente-proteína (Jones, 2003; Invitrogen, 2007).

El fluorocromo NanoOrange, es una merocianina con un rango de detección de 10 ng/mL a 10 µg/mL. Tienen una fluorescencia extremadamente baja hasta que interacciona con las proteínas, la diferencia de emisión entre el fluorocromo unido a la molécula y el no unido, son extremadamente diferentes, ya que al formar la unión, asume una estructura más rígida y emite intensamente por 3 horas (Haugland, 1996; Invitrogen, 2010).

Debido a la especificidad del fluorocromo, la interferencia de contaminantes no proteicos no es muy alta, a excepción de detergentes y sales no contenidos en el reactivos Qubit, lo cual permite realizar mediciones precisas. La fluorescencia, es detectada por un fluorómetro a longitudes de onda de 485 nm de excitación y 590 nm de emisión, el equipo tiene una sensibilidad de 0.25 a 5 µg en 1 a 20 µL (Thermo Fisher Scientific, 2016).

A una cantidad específica de fluorocromo, la señal de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de la proteína, el fluorómetro toma la señal y la compara con los estándares para mostrar los resultados de la cuantificación (Jones, 2003; Ahnert et al., 2007; Thermo Fisher Scientific, 2016).

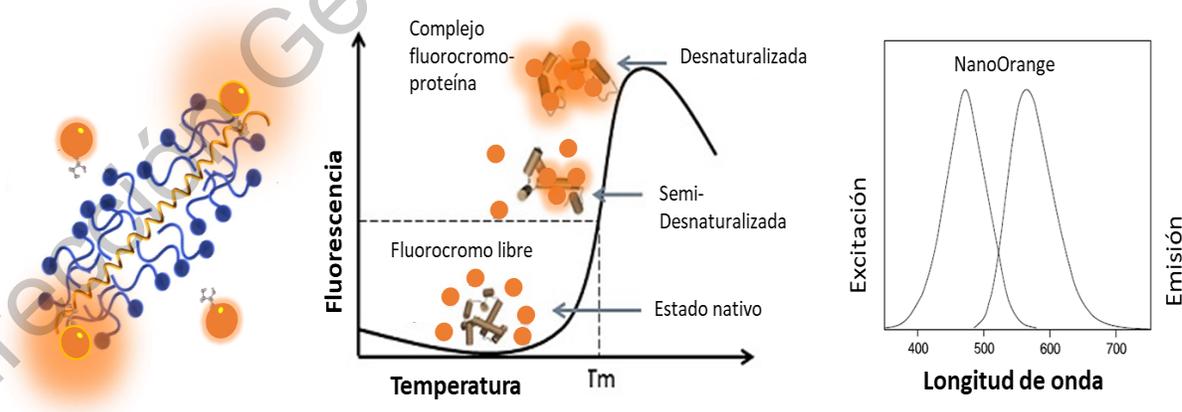


Figura 4. Fluorocromo NanoOrgange, complejo fluorocromo-proteína y longitudes de onda de emisión y excitación.

### 1.5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida, discontinuo y desnaturizante.

La electroforesis en poliacrilamida es un método de separación de proteínas según su movilidad en un campo eléctrico a través de una matriz porosa que actúa como tamiz molecular, separando unas de otras por su peso molecular, carga y forma (Laemmli, 1970; Berg et al., 2002).

Para prever la velocidad de migración en un sistema de electroforesis se debe tomar en cuenta que es afectado por la viscosidad del medio (tamaño de poro), la carga neta de las moléculas, el coeficiente de fricción y el tamaño de las moléculas (Lodish et al., 2000).

La electroforesis en gel unidimensional bajo condiciones desnaturizantes, separa las proteínas en base a su peso molecular mientras viajan a través de una matriz de poliacrilamida en dirección al ánodo, esto se logra mediante la adición del dodecil sulfato de sodio (SDS) o urea y el 2-mercaptoetanol, que modifican las características de las proteínas para que el factor que influya en la migración sea la longitud de su cadena, número de aminoácidos o masa molecular (Laemmli, 1970; Ausubel, 2002).

El SDS, es un detergente aniónico utilizado para desnaturizar proteínas, dándoles las mismas propiedades conformacionales y bloqueando interacciones entre ellas durante la electroforesis, también enmascara la carga intrínseca de las proteínas y les da una carga neta negativa similar y uniforme. El SDS envuelve las proteínas y les da un radio carga-masa constante, lo que significa una migración y resistencia idéntica en relación a la carga, lo que hace que la influencia mayor para migrar, sea el tamaño de la proteína. La relación es 1 molécula de SDS: 2 aminoácidos o 1.4 g de SDS/g proteína, para ello se calienta la muestra en exceso de SDS (Creighton et al., 1997).

La urea es una amida, también utilizada como agente desnaturizante, interfiere con las reacciones hidrofóbicas de las proteínas, provocando la disrupción de los puentes de hidrógeno, desdoblado la estructura de las proteínas y separando las cadenas polipeptídicas que pudieran formarlas (Anfinsen y Redfield, 1956).

El 2-mercaptoetanol o beta-mercaptoetanol es un agente reductor, que rompe los puentes disulfuro en las proteínas, junto con el SDS o la urea, forman las condiciones desnaturizantes. Por medio de la ruptura de los puentes S-S, la estructura terciaria así como la estructura cuaternaria de algunas proteínas se pueden ver alteradas. Si una proteína consta de varias cadenas polipeptídicas distintas unidas mediante puentes disulfuro, la acción del 2-mercaptoetanol separará las cadenas polipeptídicas distintas (Creighton et al., 1997).

El amortiguador de carga tiene como fin brindar peso, densidad y color a la muestra, lo que facilita su depósito en el pocillo y evita su salida del gel, además de monitorear la migración de la muestra en el gel. La elección está en función de la concentración de proteína de la muestra cuantificada previamente. La guía de corrida en el amortiguador de carga es el azul de bromofenol, una molécula colorante pequeña que migra por delante de las proteínas, de modo que se puede hacer el seguimiento del movimiento de las muestras en el gel (Lomonte, 2007).

Para poder evaluar nuestra muestra, se utiliza como referencia, un marcador de peso molecular con proteínas de tamaños conocidos. La elección del mismo dependerá del tamaño esperado de las proteínas de interés, ya sea de bajo, medio o alto peso molecular. La concentración del gel junto con el tipo de amortiguador, influenciará la movilidad de las proteínas a través del gel, para la técnica de SDS-PAGE, el gel es preparado en dos partes, el gel separador y el gel concentrador (Alberts, 2007).

Los patrones de migración estimados como referencia para seleccionar un sistema de corrida acorde a la proteína de interés se pueden observar en la Figura

5, se utiliza un amortiguador de Tris-glicina y bajo estas condiciones, la sensibilidad máxima es a proteínas con un tamaño de 10 a 15 kDa (Låås, 1989; Lomonte, 2007).

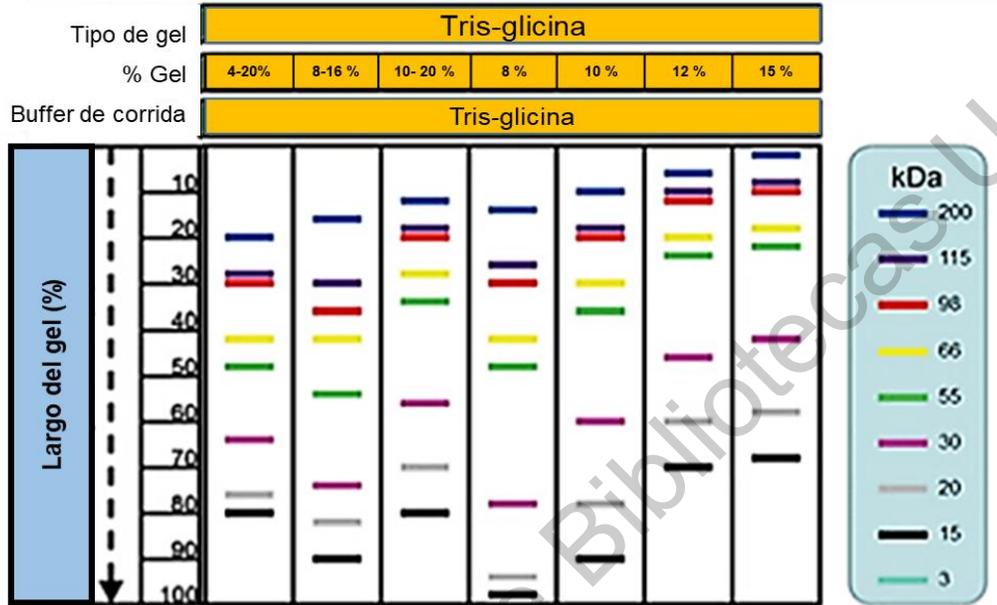


Figura 5. Patrones de migración esperados a diferentes porcentajes de acrilamida (% T) del gel de poliacrilamida (Kurien, 2015).

Poliacrilamida: la acrilamida y bisacrilamida son moléculas orgánicas sintéticas que polimerizan generando una matriz donde la poliacrilamida lineal (% T) y sus formas entrecruzadas (% C) forman una red inerte y compatible con numerosos amortiguadores, sales y detergentes. El tamaño de poro es inversamente proporcional al % T. En general, mejores resoluciones se logran cuando el tamaño de poro se encuentra cercano al tamaño molecular de la proteína. La disminución o ausencia de oxígeno, permite una polimerización correcta (Creighton et al., 1997).

Para comprobar la longitud del polímero y el nivel de entrecruzamiento, se calculan los porcentajes de T y C con las siguientes ecuaciones:

$$\% T = [(Acrilamida (g) + Bis-acrilamida (g)/ mL) \times 100]$$

Es el porcentaje del monómero total y determina la longitud de polímero.

$$\% C = [\text{Bis-acrilamida (g)} / (\text{Acrilamida (g)} + \text{Bis-acrilamida (g)})]$$

Determina el porcentaje de entrecruzamiento.

Para catalizar la polimerización se añade el persulfato de amonio y TEMED o N,N,N',N'-tetrametiledimicina, el radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida. Estas reacciones permiten la formación del gel, cuando las cadenas de acrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad uniforme (Lomonte, 2007).

Para el caso del amortiguador de corrida, se trata de una solución Tris-Cl – glicina, el Tris o también conocido como THAM funciona como un amortiguador de pH y la glicina como un conductor de electricidad. Las características de ambos permiten que se alineen las proteínas en el gel concentrador de acuerdo al límite de Kohlraush por la conductividad de los iones (Creighton et al., 1997).

El ion cloruro es el líder, que migra primero al iniciar la electroforesis, después migran las proteínas compactándose parcialmente seguidas del ion de glicina que es el retardado. Conforme avanza la electroforesis, se llega al límite del gel concentrador donde se encuentran completamente compactadas las proteínas, por lo cual iniciarán la separación al mismo nivel. En la interface entre el gel concentrador y separador, se ioniza la glicina por el cambio de pH, por lo cual migra por delante de las proteínas y ya no podrá contenerlas, es entonces donde se podrán separar de acuerdo al tamaño (Creighton et al, 1997).

Cuando la electroforesis concluye, es necesario realizar la tinción de los geles, con el fin de poder visualizar las bandas y analizar los resultados obtenidos. Existen diferentes formas de teñir un gel de poliacrilamida, sin embargo la técnica más común actualmente la tinción con azul de Coomassie. El principio es la unión a través de un medio ácido, se genera un enlace con los grupos amino mediante fuerzas van der Waals generando un complejo irreversible, su sensibilidad es de 50 ng de proteína por banda (Lomonte, 2007; García, 2000).

#### 1.5.4. Inmunodetección (Western blot).

Es una técnica para identificar antígenos específicos, reconocidos por anticuerpos monoclonales o policlonales. La técnica utiliza tres etapas para lograr esto: la separación por tamaño, la transferencia a un soporte sólido y finalmente, visualización mediante la marcación de proteínas con el uso de anticuerpos, como muestra la Figura 6 (Yang y Mahmood, 2012).

Después de una electroforesis en gel, las proteínas separadas son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) por medio de corriente eléctrica en un amortiguador de transferencia, para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella (Towbin et al., 1979).

Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia, entre otros métodos. El anticuerpo que no se une, es lavado, entonces el anticuerpo que se unió a la proteína de interés, son detectados revelando la película. Es decir, solo las bandas visibles tienen la proteína de interés y el área de esas bandas, corresponde a la cantidad de proteína presente (Burnette, 1981).

La detección mediante peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase o HRP), es un marcaje popular y confiable. Se basa en un método colorimétrico, dado que la enzima tiene una alta estabilidad y facilidad de conjugación con inmunoglobulinas, al poner en contacto la enzima con su sustrato específico (diaminobenzidina o DAB), se obtiene una coloración a café avellanado (Lorenzo-Abalde et al., 2011).

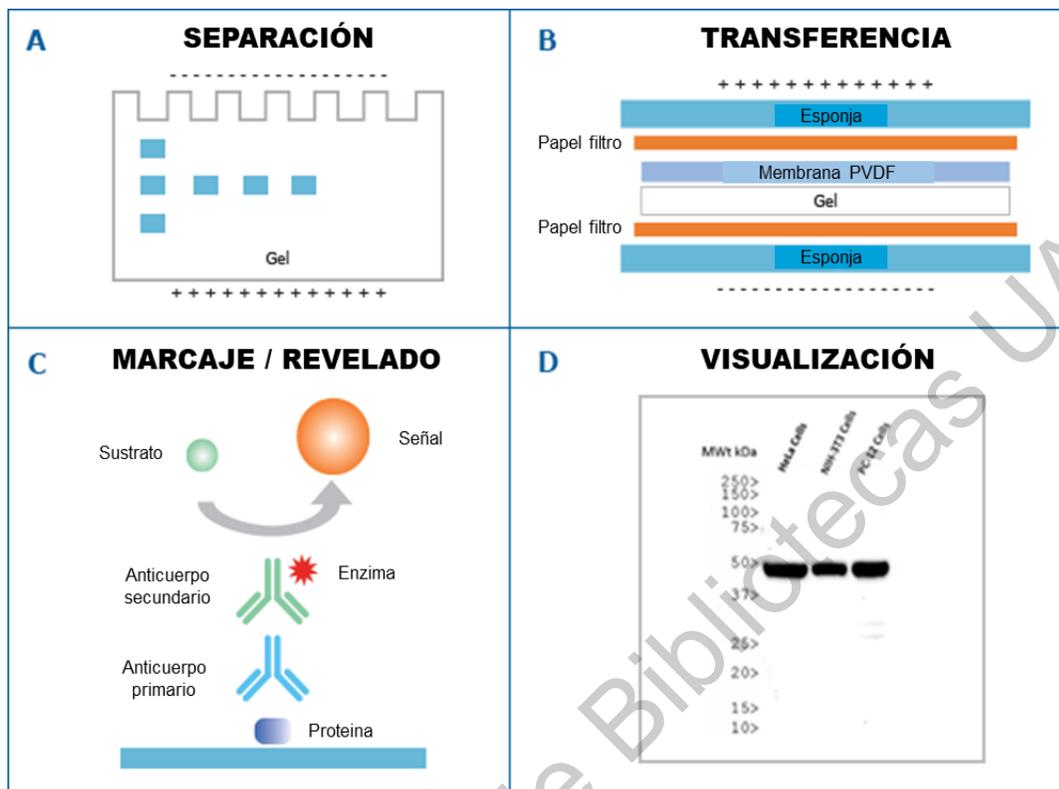


Figura 6. Etapas del inmunoblot (imagen adaptada, Novus Biologicals, 2019)

De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a las otras proteínas. Es muy importante recordar que los datos obtenidos por un Western blot, son típicamente considerados como semi cuantitativos, porque proveen una comparación relativa de niveles de proteína, pero no una medida absoluta de la cantidad (Ma, 2006).

1.5.5. Genotipificación por PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa - longitud de los fragmentos de restricción de los polimorfismos), utilizando la endonucleasa *HaeIII*.

La genotipificación por PCR-RFLP, es la identificación de diferencias en secuencias de DNA homólogos, que pudieran contener polimorfismos, mutaciones o deleciones en la secuencia codificante de los genes de interés, sin importar la edad, sexo o la cantidad de leche producida por el ganado. Se basa en la detección de

diferentes longitudes de fragmentos de DNA, productos de una digestión con endonucleasas de restricción específicas (NCBI, 2017).

El proceso comienza conociendo la secuencia del gen de interés y comparándolo con la secuencia de sus polimorfismos. A continuación, se realiza la selección de la endonucleasa en base a los posibles puntos de corte que pudieran darse en un polimorfismo y en otros no (NLM, 2014).

Una vez identificada la enzima y las condiciones necesarias, se procede a realizar la amplificación del gen por medio de una PCR punto final. El producto de esta reacción se purifica y se somete a digestión con la endonucleasa específica, finalmente se realiza una separación de los fragmentos de restricción en geles de agarosa para su comparación (NLM, 2014; NCBI, 2017).

La enzima de restricción *HaeIII* se ha utilizado previamente para identificación de polimorfismos, esta enzima proviene de *Haemophilus aegyptius* y es una endonucleasa que al identificar secuencias palindrómicas en doble cadena GG/CC como se observa en la Figura 7, realiza un corte, generando fragmentos de restricción de diferentes longitudes (Reinisch et al., 1995).



Figura 7. Digestión mediante enzima de restricción *HaeIII* (Imagen adaptada, PDB ID: 1DCT, Reinisch et al., 1995; Rose et al., 1995).

En el caso de la  $\beta$ -Lg, se ha seleccionado *HaeIII* en previas investigaciones para realizar la genotipificación de sus variantes en el ganado, esto se logra debido a que por ejemplo, los polimorfismos de la variante B contienen dos puntos de corte GG/CC diferentes, a los de la variante A, generando fragmentos de restricción de distintas longitudes para las homocigotas AA, homocigotas BB y heterocigotas AB, que se muestran en la Tabla 7 (Rachagani et al., 2006; Maletić et al., 2016; Da-Xi et al., 2011).

Tabla 7. Fragmentos de restricción de los polimorfismos de  $\beta$ -Lg con *HaeIII* (Rachagani et al., 2006).

<b>Genotipo</b>	<b>Fragmentos</b>
Producto de PCR	252 pb
AA	144 pb / 108 pb
AB	144 pb / 108 pb / 74 pb / 70 pb
BB	108 pb / 74 pb / 70 pb

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL.

Purificación e identificación de la beta-lactoglobulina, así como la inmunodetección y evaluación de la expresión de su variante B en leche de vaca Jersey seleccionada genéticamente.

### 2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

Establecer una estrategia de purificación y determinar el contenido de proteínas de suero en leche.

Realizar la separación de las variantes de  $\beta$ -Lg por métodos electroforéticos.

Llevar a cabo la inmunodetección de la variante B de  $\beta$ -Lg.

Establecer la metodología para la genotipificación del ganado mediante la evaluación de la longitud de los fragmentos de restricción de los polimorfismos (RFLP).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Estrategia de purificación de $\beta$ -Lg en suero de leche de ganado Jersey.

Se estableció la estrategia de purificación en muestras de leche cruda mediante un método adaptado para obtener las proteínas del suero.

##### 3.1.1. Muestreo.

Se tomaron aleatoriamente muestras de leche fluida independientes de vacas Jersey genotipos  $\beta$ -Lg AA,  $\beta$ -Lg BB y  $\beta$ -Lg AB.

##### 3.1.2. Descremado.

Se centrifugaron 20 mL de leche cruda durante 10 minutos (Centrifuga 5810R, Eppendorf) y se retiró el sobrenadante filtrando con 4 capas de manta de cielo en un embudo de acuerdo a la metodología señalada por Medrano y colaboradores (2014).

##### 3.1.3. Purificación de las proteínas de suero de leche.

Al sobrenadante obtenido del descremado se le retiró la fracción de caseínas, separándola por precipitación isoeléctrica, adaptando el método de acuerdo las metodologías señaladas por Lønnerdal y Forsum (1985), Hollar y colaboradores (1991), Medrano y colaboradores (2014) y Duarte y colaboradores (2017).

Se realizó la ultrafiltración de 3.5 mL del sobrenadante obtenido en la precipitación isoeléctrica, para concentrar la muestra, centrifugando durante 20 minutos en un dispositivo Amicon® Ultra-4 con punto de corte 10 k (Merck-Millipore 2015). Se recuperó el retenido del filtro con agua grado HPLC ajustada a pH 7.

#### 3.2. Cuantificación de proteína de suero de leche mediante el sistema Qubit.

Para determinar la concentración proteica de las muestras de suero de leche, se utilizó el sistema fluorométrico Qubit 2.0 (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific). El fluorómetro portátil Qubit cuenta con características mostradas en la Tabla 8.

Tabla 8. Características técnicas del fluorómetro Qubit (Invitrogen, 2010).

Parámetro	Condiciones de operación
Temperatura	15-40 °C
Máximos niveles de humedad	20-80 % HR no condensada
Fuentes de luz	LED azul (Máx. ~470 nm), LED rojo (Máx. ~635 nm)
Filtros de excitación	Azul 430-495 nm, Rojo 600-645 nm
Filtros de emisión	Verde 510-580 nm, Rojo 665-720 nm
Detector	Fotodiodos, capacidad de medición de 300 a 1000 nm

Para preparar la solución de trabajo se diluyó el reactivo Qubit 200x a una proporción 1:200 en amortiguador Qubit, considerando 200  $\mu$ L para cada estándar (3 tubos) y para cada muestra con sus réplicas. Se utilizó como guía la Figura 8.

Cada ensayo se preparó en tubos para PCR, de acuerdo a la Tabla 9, agitando en vortex 3 segundos e incubando 15 minutos a temperatura ambiente.

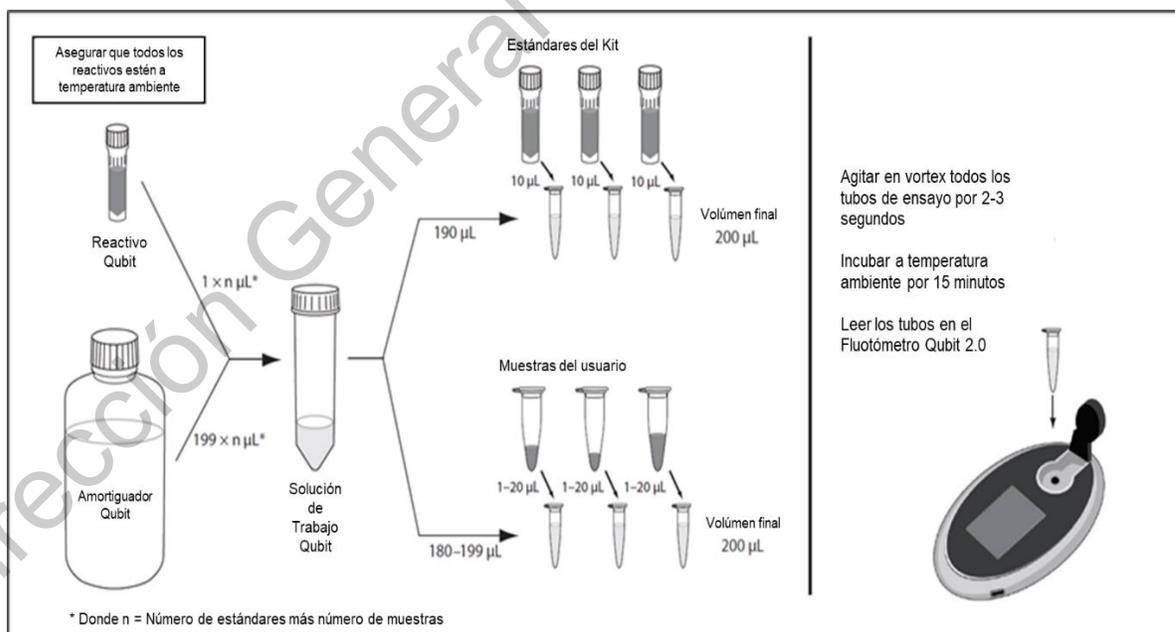


Figura 8. Guía de preparación de muestras para Qubit 2.0 (Invitrogen, 2010).

Tabla 9. Volúmenes de preparación para ensayo Qubit (Invitrogen, 2010).

Solución	Tubos de estándar	Tubos de muestra
Solución de trabajo	190 $\mu$ L	180-199 $\mu$ L
Estándar (Protein assay Kit)	10 $\mu$ L	---
Muestra	---	1-20 $\mu$ L
Volumen total para el ensayo	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L

Se seleccionó el análisis de proteínas en el equipo y se leyeron los 3 estándares (0, 200 y 400 ng/mL), obteniendo el gráfico de calibración.

Se realizaron lecturas de las muestras por triplicado de manera aleatorizada obteniendo la concentración de proteína total en suero de cada una. En la Figura 9 se puede observar la interfaz del fluorómetro Qubit.



Figura 9. Manejo de la interfaz Qubit 2.0. A) Selección de análisis. B) Lectura del estándar. C) Lectura de las muestras (Invitrogen, 2010).

### 3.3. Métodos electroforéticos en gel de poliacrilamida.

#### 3.3.1. SDS-PAGE.

Para realizar el ensayo, se siguió el protocolo señalado por Ausubel y colaboradores (2002). Se utilizó el kit de electroforesis vertical Mini-PROTEAN tetra

cell marca BioRad, una fuente de poder Power pack basic de BioRad (300 V/ 400 mA/ 75 W) y el agitador automatizado Ultra Rocker BioRad.

Todas las soluciones y muestras se prepararon con agua destilada y desionizada, como marcador de bajo peso molecular se utilizó el Kit GE Healthcare LMW-SDS Marker Kit 17044601.

La preparación de distintas concentraciones para los geles de poliacrilamida, se siguió de acuerdo a la Tabla 10.

Tabla 10. Preparación de diferentes concentraciones de gel separador y concentrador SDS-PAGE (Ausubel et al., 2002).

**GEL SEPARADOR**

<b>T %</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>15 %</b>
H <sub>2</sub> O	6.25 mL	5.25 mL	3.75 mL
Acrilamida/bis-acrilamida (30 %/0.8 % p/v)	5 mL	6 mL	7.5 mL
Amortiguador Tris HCl – SDS (pH=8.8)	3.75 mL	3.75 mL	3.75 mL
10 % (p/v) persulfato de amonio (AP)	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL

**GEL CONCENTRADOR**

<b>T %</b>	<b>3.9 %</b>	<b>5 %</b>
H <sub>2</sub> O	3.05 mL	5.14 mL
Acrilamida/bis-acrilamida (30 %/0.8 % p/v)	0.65 mL	1.62 mL
Amortiguador Tris HCl – SDS (pH=6.8)	1.25 mL	3.12 mL
10 % (p/v) persulfato de amonio (AP)	25 µL	50 µL
TEMED	5 µL	10 µL

Dependiendo de la concentración de proteína de suero obtenida después de la ultrafiltración, se inyectaron de 10 a 20 µL de cada muestra y 7 µL del marcador de peso molecular.

Las condiciones de corrida para el gel concentrador fueron de 110 V constantes hasta alcanzar gel separador. Para las diferentes corridas, el gel separador se corrió a voltaje constante en un rango de 100 a 140 V. Posteriormente se procedió a la tinción con azul de Coomassie brillante G-250 y el análisis densitométrico del gel.

### 3.3.2. SDS-PAGE con gel de gradiente %T

Se realizaron pruebas con geles de gradiente de 4 a 20 %T y 8 – 16 %T (BioRad) siguiendo la metodología señalada por Wei y colaboradores (2018) con modificaciones, utilizando un amortiguador de corrida 1x Tris HCl/glicina/SDS señalado previamente para el método de SDS-PAGE tradicional.

Se utilizó la cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN tetra cell marca BioRad, una fuente de poder Power pack basic de BioRad (300 V/400 mA/75 W) y el agitador automatizado Ultra Rocker BioRad.

Las corridas se realizaron en un rango de 80 a 120 V constantes hasta alcanzar el límite del gel, posteriormente se procedió a la tinción con azul de Coomassie brillante G-250 y el análisis densitométrico del gel.

### 3.3.3. Urea-PAGE.

Para realizar el ensayo, se siguió el protocolo mencionado por Andrews (1983), con modificaciones mencionadas por Veloso (2002) y Duarte y colaboradores (2018).

Se utilizó el kit de electroforesis vertical Amersham Mini vertical unit SE250 marca Amersham Biosciences, una fuente de poder Power supply EPS301 de Amersham Biosciences (300 V/400 mA/75 W) y el agitador automatizado Ultra Rocker.

Todas las soluciones y muestras se prepararon con agua destilada y desionizada. Se utilizó el mismo marcador de peso molecular que para la metodología SDS-PAGE y adicionalmente se inyectó un estándar de caseínas provisto por la empresa NUCITEC como referencia de peso molecular.

Se utilizó un gel discontinuo 3.9 % T concentrador y 15 % T separador, siguiendo las proporciones señaladas en la Tabla 10, pero utilizando el amortiguador Tris HCl – urea (pH=7.6) en vez del amortiguador Tris HCl-SDS (pH=6.8) para el gel concentrador y el amortiguador Tris HCl-urea (pH=8.9) en vez del amortiguador Tris HCl-SDS (pH=8.8) para el gel separador.

Dependiendo de la concentración de proteína de suero de leche obtenida luego de la ultrafiltración, se inyectaron de 10 a 20  $\mu$ L de cada muestra, 5  $\mu$ L del marcador de peso molecular y 10  $\mu$ L del estándar de caseínas.

La corrida se realizó en un amortiguador 1x Tris HCl/glicina con las siguientes condiciones: para el gel concentrador 100 V constantes hasta el inicio de gel separador. Posteriormente se ajustaron las condiciones, los geles separadores se corrieron en un rango de 100 a 140 V constantes. Al finalizar se procedió a la tinción con azul de Coomassie brillante G-250 y el análisis densitométrico del gel.

#### 3.3.4. Tinción con azul de Coomassie brillante G-250.

Una vez concluida la electroforesis en gel de poliacrilamida, se retiraron los geles de su soporte y procedió a la tinción. Los geles se colocaron en un recipiente de plástico cubriendo con 3 a 5 volúmenes de solución de fijado (50 % metanol, 10 % ácido acético y 40 % agua), agitando suavemente por 2 horas a temperatura ambiente en un agitador automatizado.

Al término de las 2 horas, se reemplazó la solución de fijado, por solución de teñido (10 % v/v ácido acético, 30 % v/v isopropanol, 60 % v/v agua y 5 % p/v azul de Coomassie brillante G-250) y se mantuvo agitando suavemente durante 4 horas.

Al término de las 4 horas, se retiró la solución de teñido y se enjuagó el gel con 50 mL de solución fijadora. Finalmente se vació la solución fijadora y se cubrió el gel con solución de desteñido (5 % ácido acético, 16.5 % metanol y 78.5 % agua), agitando suavemente por 2 horas con trozos de papel absorbente. Se cambió la solución de desteñido y los absorbentes aproximadamente cada 30 minutos y hasta que se observaron bandas azules de las proteínas y un fondo claro.

Para conservar el gel, se vació la solución de desteñido, se enjuagó el gel en agua durante 30 minutos y se almacenó el gel con una solución de almacenamiento (glicerol al 3 % y metanol al 5 % en agua). El análisis densitométrico se realizó con el fotodocumentador Alpha Imager, mediante el software Alpha View 3.4.0.0.

#### 3.4. Identificación de las variantes de beta-lactoglobulina mediante inmunodetección (Western blot).

Para realizar el ensayo, se siguió el protocolo señalado en Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 2002) con modificaciones señaladas en el kit de transferencia para el equipo Trans-Blot Turbo (BioRad).

Una vez concluida la separación electroforética, el gel se cortó por la mitad, una parte se tiñó con azul de Coomassie Serva blue G-250 para observar la separación y la otra se almacenó en solución fijadora hasta realizar la transferencia a una membrana PVDF (polivinilidenodifloruro). Para evitar dañar la membrana y generar falsos positivos, se utilizaron utilizar agua desionizada, guantes y pinzas limpias.



Figura 10. Sistema de transferencia Trans-blot Turbo (BioRad).

Se incubaron por separado el gel y el paquete de filtros del sándwich, 3 min en amortiguador de transferencia 1x para equilibrar el pH. Se colocó una membrana PVDF en metanol hasta tornarse translúcida y después en amortiguador de transferencia de 2 a 3 minutos.

Transferido el tiempo de incubación, se colocó la parte inferior del sándwich en el centro de la cámara, después se colocó el gel, seguido de la membrana de PVDF y la parte superior del sándwich. Se eliminaron las posibles burbujas haciendo pasar un vial o rodillo por la parte superior como muestra la Figura 11.

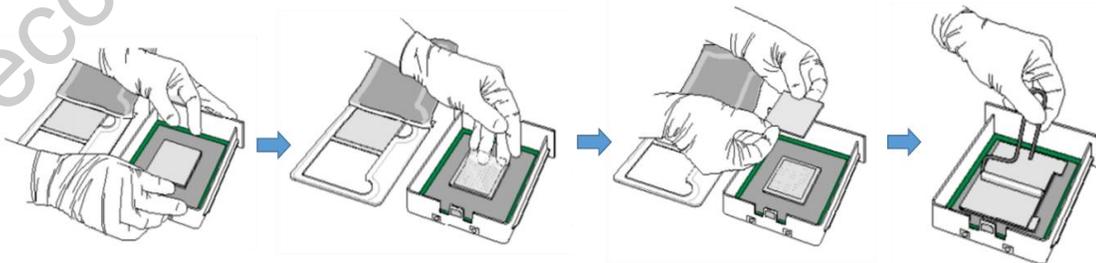


Figura 11. Ensamblado del sándwich para transferencia (BioRad).

Se aseguró el cierre de la cámara y se colocó en el equipo de transferencia. Se establecieron las condiciones predeterminadas a: 25 V y 1 A durante 30 minutos y se inició la transferencia. Al término, se retiró la cámara del equipo y se levantó cuidadosamente la parte superior del sándwich para obtener la membrana con las proteínas transferidas. Se lavó la membrana con agua y se incubó en solución bloqueadora 5 % (p/v) durante 4 horas.

La detección de  $\beta$ -Lg se realizó incubando 12 horas la membrana, con un anticuerpo primario anti beta-lactoglobulina producido en conejo (Dilución 1:1000 - 1:10,000) y la detección de la variante B con un anticuerpo primario una IgG anti B-Lg variante B en oveja (dilución 1:100-1:3000).

A continuación se realizaron 6 ciclos de lavados de 5 minutos con solución salina amortiguada con Tris -Tween 1 % v/v (TTBS). Posteriormente se incubó la membrana durante 5 horas protegida de la luz, para  $\beta$ -Lg con un anticuerpo secundario IgG HRP anti-conejo en cabra (dilución 1:1000-1:5000). Para identificar la variante B se utilizó un anticuerpo IgG HRP anti oveja en conejo (dilución 1:100-1:3000).

Transcurrido el tiempo de incubación del segundo anticuerpo, se lavó la membrana en 6 ciclos de 5 minutos con TTBS a 30 rpm. Finalmente se realizó un último lavado con solución salina amortiguada con Tris (TBS), para eliminar el exceso de Tween 20, se descartó la solución y se almacenó la membrana en TBS protegida de la luz hasta el revelado.

Se probó la reacción enzimática del anticuerpo utilizando el kit de detección para anticuerpos acoplados a HRP (BioRad). Se incubó la membrana en solución de revelado a temperatura ambiente con agitación suave a hasta la producción de color. Se detuvo la reacción con 2 ciclos de lavado con agua desionizada en intervalos de 10 min con agitación suave. Se secó la membrana con aire a temperatura ambiente y el inmunoblot se analizó con el fotodocumentador AlphaInnotec (Alpha-Innotec).

### 3.5. Genotipificación por PCR-RFLP

Se siguió la metodología señalada por Maletić y colaboradores (2016) y Rachagani y colaboradores (2014) con algunas modificaciones.

Se realizó la extracción de DNA genómico por extracción sal-etanol en columnas de sílice por medio del Pure link Genomic DNA Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trataron 200  $\mu$ L de muestra con soluciones de Proteinasa K y DNAsa A. Se incubaron en amortiguador de lisis y etanol y se centrifugaron en las columnas a 10,000 g. Posteriormente se realizaron 2 lavados seguidos de centrifugación a 10,000 g y finalmente se eluyó en 150  $\mu$ L de agua desionizada estéril.

Se cuantificó y comprobó la calidad e integridad del DNA utilizando el equipo Nanodrop 2000 UV-Vis (ThermoFisher-Scientific) y en geles de agarosa 1 % p/v con bromuro de etidio 0.005% v/v, tomando como criterio el patrón de corrida en el gel, una densidad óptica  $A_{260}/A_{280}$  de 1.7 – 1.9 y una concentración aproximada de 100 ng/ $\mu$ L.

Una vez seleccionadas las muestras, se procedió a establecer las condiciones apropiadas para la amplificación por medio de PCR punto final, para ello se probaron diferentes gradientes de temperatura y de cloruro de magnesio, utilizando el termociclador MJ Mini (BioRad). Los cebadores utilizados, corresponden a la secuencia del exón IV del gen de la  $\beta$ -Ig bovina, FW: GTCCTTGTGCTGGACACCG ACTACA-3' y RV: 5'-CAGGACACCGGCTCCCGGTATATGA-3', los cuales fueron reportados previamente en diversas investigaciones (Rachagani et al., 2006; Maletić et al., 2016).

Se verificó la amplificación en geles de agarosa 1.5 % p/v con bromuro de etidio 0.005% v/v, de los cuales se fraccionó con un escalpelo la sección que contenía la banda con el amplicón. Se realizó un proceso de purificación por medio del

QIAquick Gel Extraction kit y adicionalmente se realizó una purificación directa mediante el QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante y recuperando en agua desionizada.

La muestra obtenida se sometió a digestión con la enzima de restricción *HaeIII* durante 3 horas a 37 °C. Al término de la incubación, se visualizaron los fragmentos de restricción obtenidos en geles de agarosa 4 % p/v con bromuro de etidio 0.005% v/v, comparando con un marcador de DNA 1 Kb (Invitrogen). Se clasificaron las muestras como homocigotas AA, homocigotas BB y heterocigotas AB de acuerdo al patrón mostrado de la longitud de los fragmentos de restricción.

Dirección General de Bibliotecas UFRQ

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Efectividad de la estrategia de purificación de $\beta$ -Lg en suero de leche de ganado Jersey.

Mediante la estrategia de purificación se obtuvieron muestras de 1.5 mL de suero de leche ultrafiltrado a partir de pool de leche de ganado Jersey recolectado del ato lechero perteneciente a la empresa Ecológico Tierra Viva S.P.L de R.L. Se realizó una separación SDS-PAGE con muestras tomadas en los diferentes pasos de purificación, mostrado en la Figura 12.

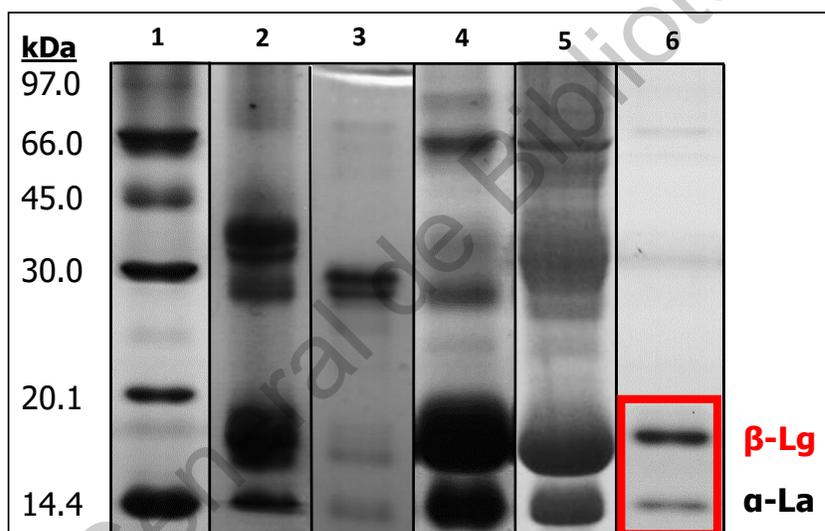


Figura 12. SDS-PAGE 12 %T carril 1: marcador LMW 17044601 (GE Healthcare), carril 2: leche descremada, carril 3: fracción de caseínas precipitadas, carril 4: muestra del suero, carril 5: muestras del permeado de la ultrafiltración del suero, carril 6: muestras del retenido de la ultrafiltración del suero.

La Figura 12 nos permite observar la diferencia entre los perfiles en las etapas de purificación. Entre el carril 2 y 4 se observa que fue posible remover la mayor parte de las caseínas por medio de la precipitación isoeléctrica, lo cual coincide con lo reportado por Medrano y colaboradores (2014) y Duarte y colaboradores (2017), sin embargo en la región cercana a los 30 kDa, se observa un remanente y esta

separación aún mantiene una variedad de proteínas de distintos pesos moleculares en las muestras de suero de leche.

La implementación del ajuste a pH 2.5 y la ultrafiltración por membranas 10 k, hizo posible eliminar las interacciones y retener en su mayoría las proteínas con pesos moleculares mayores a 20 kDa. Adicionalmente permitió concentrar la muestra al pasar de un volumen de 25 mL a 1.5 mL, lo cual resulta en el patrón observado en el carril 6, que contiene 2 bandas principales correspondientes a las proteínas de suero de leche  $\beta$ -Lg y  $\alpha$ -La.

Este resultado coincide con lo reportado por Naqvi y colaboradores (2010) siguiendo un método de purificación similar, pero utilizando como paso final cromatografía de filtración en gel en vez de ultrafiltración. Sin embargo en algunas de sus pruebas, aún conservaron proteínas de mayor peso molecular y remanentes en un rango cercano al peso molecular de las caseínas. En sus investigaciones fue posible obtener beta lactoglobulina con una pureza cercana al 100 %, pero es de consideración que a pesar de su eficacia resulta poco práctica para el análisis de un gran número de muestras.

Se realizó el análisis densitométrico a los geles obtenidos y la cuantificación de proteínas en las diferentes etapas, los resultados son mostrados en la Tabla 11, esta información reveló los cambios en la concentración de proteínas y la abundancia de la  $\beta$ -Lg ya que en la etapa de ultrafiltración, el número de proteínas pasó de 7 a 2 y el porcentaje de abundancia de la  $\beta$ -Lg se incrementó de  $15.4 \pm 0.03$  % a  $83.2 \pm 0.07$  %. Esto nos permitió obtener muestras con un alto porcentaje de pureza y con menor número de proteínas que pudieran hacer interferencia para la prueba de inmunodetección. Lo anterior nos permite considerar como exitosa la estrategia de purificación planteada.

Tabla 11. Tabla de purificación de  $\beta$ -Lg.

<b>Etapas de purificación</b>	<b>Proteína (g/100 mL)</b>	<b><math>\beta</math>-Lg (g/100 mL)</b>	<b>Factor de purificación</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
Descremado	4.2 $\pm$ 0.3	0.6	1	15.4	100
Precipitación isoelectrica	1.4 $\pm$ 0.6	0.6	1	41.9	100
Ultrafiltración del suero de leche	4.4 $\pm$ 0.1	3.7	6.2	83.2	25

Al comprobar la efectividad de la estrategia de purificación, se aplicó el proceso a diversas muestras individuales de leche, se cuantificó la proteína y se calculó el tamaño de muestra para la separación electroforética de las variantes de  $\beta$ -Lg. El tratamiento de las muestras se realizó por dos métodos, reportados por Medrano y colaboradores (2014) y Duarte y colaboradores (2017), para observar si se lograba una mejor extracción y conservar de mejor manera la integridad de las proteínas en las muestras.

Tabla 12. Descripción de las muestras de leche

<b>Muestra</b>	<b>Descripción</b>
<b>J1R</b>	Retenido de la ultrafiltración de la muestra 1 de leche de vaca Jersey. 14 JUN 18 Metodología Duarte y col. 2017
<b>J2R</b>	Retenido de la ultrafiltración de la muestra 2 de leche de vaca Jersey. 14 JUN 18 Metodología Duarte y col. 2017
<b>J1C</b>	Concentrado de las muestras 3, 4 y 5 del retenido de la ultrafiltración de leche de vaca Jersey.
<b>J6R</b>	Retenido de la ultrafiltración de la muestra 6 de leche de vaca Jersey. 30 OCT 18 Metodología Medrano y col. 2014
<b>J7R</b>	Retenido de la ultrafiltración de la muestra 7 de leche de vaca Jersey, 22 NOV 18 Metodología Medrano y col. 2014

Se realizó la lectura de las muestras por triplicado y se obtuvieron los promedios de la concentración de proteínas de suero en microgramos por mililitro. De acuerdo a los resultados obtenidos, se calculó la concentración considerando el factor de dilución (Tabla 13).

Tabla 13. Cálculo de la concentración de proteínas en cada muestra ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )

<b>MUESTRA</b>	<b>Promedio <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>Factor de Dilución 1</b>	<b>Factor de Dilución 2</b>	<b>Concentración <math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math></b>
<b>J1R</b>	2.65 $\pm$ 0.01			0.05
<b>J2R</b>	2.62 $\pm$ 0.10	-		0.05
<b>J1C</b>	6.01 $\pm$ 0.00		1/20	0.12
<b>J6R</b>	25 $\pm$ 0.00	1/10		5.00
<b>J7R</b>	10.5 $\pm$ 0.01	1/100		21.00
<b>J8R</b>	8.97 $\pm$ 0.02			17.94

Para las muestras J1R, J2R y J1C el gel se corrió antes de contar con el equipo Qubit, por lo que se calculó la cantidad de proteína contenida en cada volumen de inyección posterior a la corrida (Tabla 14).

Tabla 14. Cuantificación de proteínas para las muestras J1R, J2R y J1C

<b>Muestra</b>	<b>Concentración <math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math></b>	<b>Volumen total de inyección en amortiguador 6x (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen de la muestra (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Contenido de proteína por carril (<math>\mu\text{g}</math>)</b>
<b>J1R</b>	0.0530	15		0.6625
<b>J2R</b>	0.0524	15	12.5	0.6550
<b>J1C</b>	0.1202	15		1.5025

Para el resto de las muestras se establecieron los volúmenes para la separación electroforética (Tabla 15).

Tabla 15. Volúmenes establecidos para la separación electroforética

Muestra	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Factor de Dilución	Volumen de la muestra ( $\mu\text{L}$ )	Volumen total de inyección en amortiguador 2x ( $\mu\text{L}$ )	Contenido de proteína por carril ( $\mu\text{g}$ )
J6R	5.00	1/2	7.5	15	1.25
			2.5	5	2.63
			4.5	9	4.73
J7R	21.00	1/20	5.5	11	5.78
			6.5	13	6.83
			7.5	15	7.88
J8R	17.94	1/20	5.5	11	4.93
			6.5	13	5.83
			7.5	15	6.72

Se pudo observar que las muestras purificadas siguiendo la metodología de Medrano y colaboradores (2014) resultaron en una mayor cantidad de proteínas en las muestras finales, por ello se estableció para las siguientes muestras, el descremado a 4 °C y la precipitación isoeléctrica de caseínas mediante amortiguador de acetatos.

#### 4.2 Separación electroforética de las variantes de beta-lactoglobulina por SDS-PAGE.

Para la separación electroforética se probaron tres métodos, comenzando con el método SDS-PAGE. Se corrió a diferentes porcentajes de entrecruzamiento de la poliacrilamida (%T), únicamente se muestra el gel a 15 %T, del cual se corrieron 2 geles, uno para las muestras del permeado y uno para las muestras del retenido.

Tabla 16. Muestras de permeado de ultrafiltración de leche jersey, para el gel SDS-PAGE 15 %T. Cada muestra corresponde a una fracción de una mezcla de leches.

<b>Codificación</b>	<b>Descripción/Tratamiento</b>
<b>MPM</b>	Marcador de peso molecular GE Healthcare LMW 17044601
<b>J1P</b>	Jersey 1 permeado de la ultrafiltración
<b>J2P</b>	Jersey 2 permeado de la ultrafiltración
<b>J3P</b>	Jersey 3 permeado de la ultrafiltración
<b>J4P</b>	Jersey 4 permeado de la ultrafiltración
<b>J5P</b>	Jersey 5 permeado de la ultrafiltración
<b>J6P</b>	Jersey 6 permeado de la ultrafiltración
<b>J7P</b>	Jersey 7 permeado de la ultrafiltración

Tabla 17. Orden de inyección de muestras de permeado para SDS-PAGE 15 %T, S1806141.

<b>S180614</b>										
Tipo de electroforesis: SDS-PAGE										
Cámara: Mini Protean Tetra Cell BioRad						Amortiguador: Tris-CI/Glicina/SDS				
Orden de inyección										
Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Muestra	Blanco 2x	MP M	Blanco 2x	J1P 2x	J2P 2x	J3P 2x	J4P 2x	J5P 2x	J6P 2x	J7P 2x
Volumen ( $\mu$ L)	15	5	15							
<b>Gel concentrador</b>	3.9	% T	4	° C	110	V	15	min		
<b>Gel separador</b>	15	% T	4	° C	140	V	60	min		

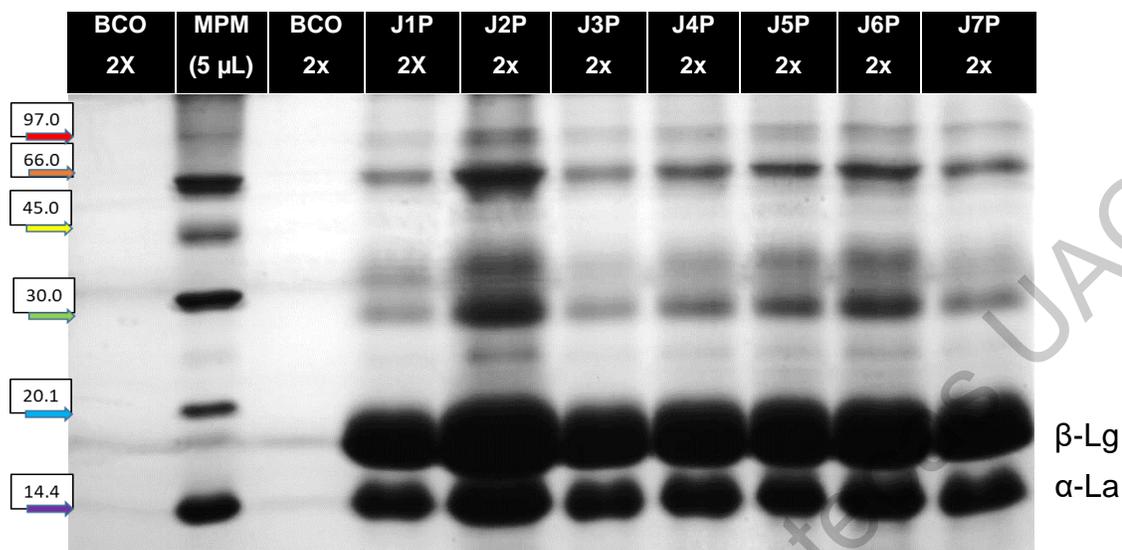


Figura 13. SDS-PAGE 15 %T para muestras de permeado de ultrafiltración de leche de ganado Jersey S1806141.

Se puede observar claramente la fracción de proteína que pasó por la membrana de 10 K en las muestras. Se aprecia que persiste una gran concentración de las dos últimas bandas, correspondiente a las proteínas del suero, beta lactoglobulina y alfa lactoalbúmina. Se realizó el análisis densitométrico a uno de los carriles, obteniendo los siguientes resultados.

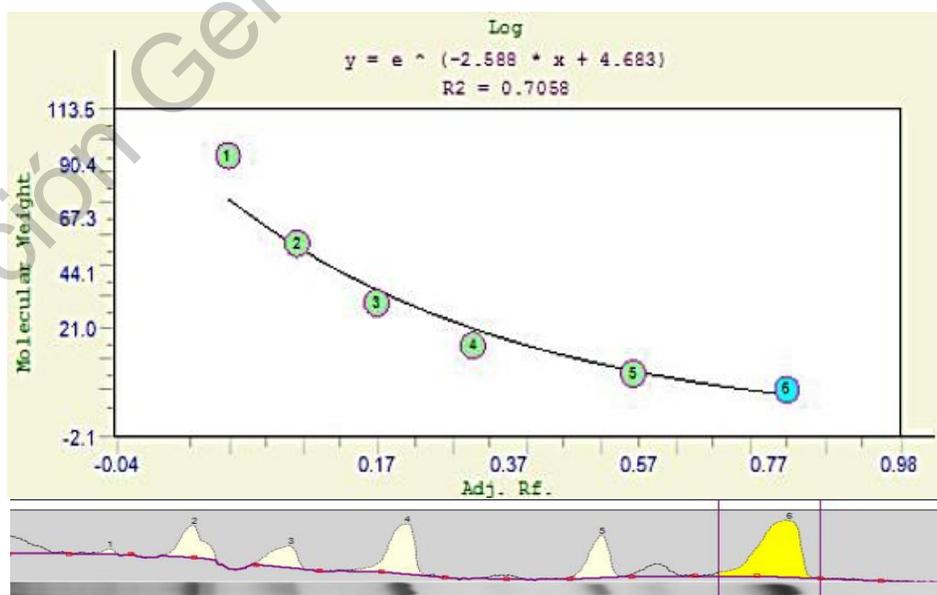


Figura 14. Análisis del marcador de peso molecular S1806141.

Tabla 18. Estimación del peso molecular, carril 5 muestra de permeado de ultrafiltración de suero de leche Jersey S1806141.

Carril	Banda	Distancia	Ancho	Alto	Área	%	Rf	Peso molecular estimado
5	1	66	29	4335	78041	3.83	0.11	81.0
5	2	116	51	9828	293936	14.29	0.19	65.1
5	3	217	44	6176	212042	10.32	0.36	41.9
5	4	239	24	5201	136946	6.68	0.40	38.1
5	5	267	64	9554	376962	18.31	0.45	33.7
5	6	380	51	5906	200484	9.76	0.64	20.6
5	7	396	23	5270	127809	6.24	0.66	19.2
5	8	403	62	5248	308446	14.99	0.6	18.6
5	9	440	23	3678	67576	3.32	0.74	15.8
5	10	503	42	10077	262381	12.26	0.84	12.0

Se puede observar mediante el análisis densitométrico, la fila sombreada, correspondiente al peso molecular aproximado de la beta-lactoglobulina, estimando 18.6 kDa en la octava banda del carril 5, con un porcentaje de 14.99 % de abundancia relativa. Lo cual nos revela, que en el permeado del proceso de ultrafiltración, permanece una parte importante de la  $\beta$ -Lg, pero se logra separar en su mayoría e resto de las proteínas que no son de nuestro interés.

Se inyectaron en un gel con las mismas características, muestras del permeado de la ultrafiltración del suero de leche Jersey.

Tabla 19. Muestras de retenido de ultrafiltración de leche jersey, para el gel SDS-PAGE 15 %T.

<b>Codificación</b>	<b>Descripción/Tratamiento</b>
<b>MPM</b>	Marcador de peso molecular GE Healthcare LMW 17044601
<b>J1R</b>	Jersey 1 retenido de la ultrafiltración
<b>J2R</b>	Jersey 2 retenido de la ultrafiltración
<b>J3R</b>	Jersey 3 retenido de la ultrafiltración
<b>J4R</b>	Jersey 4 retenido o de la ultrafiltración
<b>J5R</b>	Jersey 5 retenido de la ultrafiltración
<b>J6R</b>	Jersey 6 retenido de la ultrafiltración
<b>J7R</b>	Jersey 7 retenido de la ultrafiltración
<b>J8R</b>	Jersey 8 retenido de la ultrafiltración

Tabla 20. Orden de inyección de muestras de retenido para SDS-PAGE 15 %T S1806142.

<b>S1806142</b>										
Tipo de electroforesis: SDS-PAGE										
Cámara: Mini Protean Tetra Cell BioRad					Amortiguador: Tris-CI/Glicina/SDS					
Orden de inyección										
Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Muestra	Blanco 2x	MP M	J1R 2x	J2R 2x	J8R 2x	J3R 2x	J4R 2x	J5R 2x	J6R 2x	J7R 2x
Volumen (µL)	15	5	15							
<b>Gel concentrador</b>	3.9	% T	4	° C	110	V	15	min		
<b>Gel separador</b>	15	% T	4	° C	140	V	60	min		

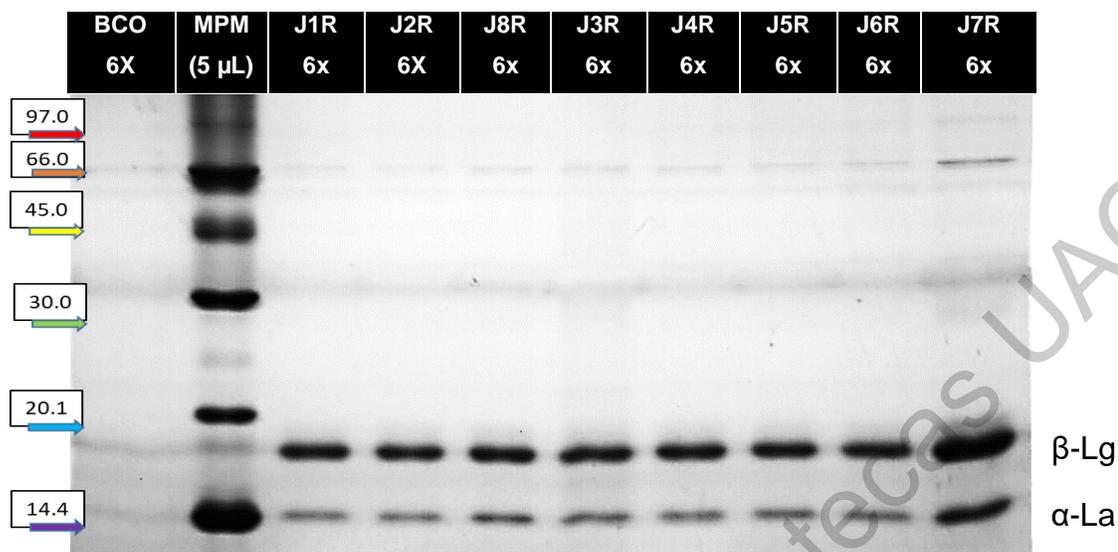


Figura 15. SDS-PAGE 15 % T para muestras de retenido de ultrafiltración de leche de ganado Jersey S1806142.

Se pudieron observar en todas las muestras que gracias al ajuste de pH y proceso de ultrafiltración, se logró purificar las proteínas del suero de leche y eliminar casi en su totalidad el resto. Se realizó el análisis densitométrico para ver si era posible detectar las variantes de β-Lg en el gel, obteniendo los siguientes resultados.

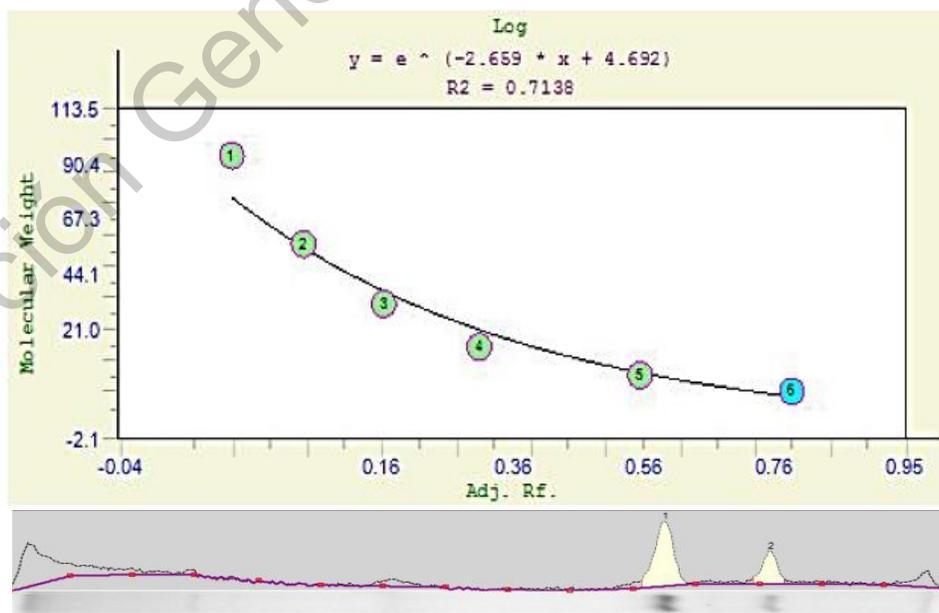


Figura 16. Análisis del marcador de peso molecular S1806142.

Tabla 21. Estimación del peso molecular, carril 3 muestra de retenido de ultrafiltración de suero de leche Jersey S1806142.

Carril	Banda	Distancia	Ancho	Alto	Área	%	Factor de retención (Rf)	Peso molecular estimado
3	1	434	30	20035	296650	76.92	0.687	17.6
3	2	505	23	7898	89269	23.08	0.799	13.0

Se realizó el análisis únicamente al carril 3, del cual podemos observar que la banda 1 corresponde a la proteína beta-lactoglobulina, en un peso molecular estimado de 17.6 y un porcentaje de 76.92 % de abundancia relativa. Sin embargo no fue posible identificar mediante el sistema, las 2 variantes genéticas de  $\beta$ -Lg, un resultado similar fue reportado por Aich y colaboradores (2015) en leche de bovino Holstein, El-Zahar y colaboradores (2004) y Neyestani y colaboradores (2003), en leche de distintos ovinos. Ellos utilizaron esquemas de purificación similares, pero incluyendo como paso final tanto cromatografía de filtración en gel, como intercambio iónico en vez de ultrafiltración. Sin embargo tampoco fue posible la separación de las variantes por medio de SDS-PAGE. Dado esto se procedió a utilizar otro agente desnaturizante, mediante el método de Urea-PAGE.

#### 4.3 Separación electroforética de las variantes de beta-lactoglobulina por Urea-PAGE.

Se utilizó la técnica Urea-PAGE, basándonos en investigaciones previas del equipo de trabajo, con la separación de las variantes genéticas de  $\beta$ -caseína (Duarte et al., 2018), se probaron diferentes porcentajes de entrecruzamiento de la poliacrilamida y diversos voltajes de corrida, sin embargo solo se muestra el resultado más significativo.

Tabla 22. Muestras de permeado y retenido de ultrafiltración de leche Jersey, en gel Urea-PAGE 20 % T.

Codificación	Descripción/Tratamiento
<b>MPM</b>	Marcador de peso molecular GE Healthcare LMW 17044601
<b>ECN 1:4</b>	Estándar de caseína dilución 1:4
<b>J5R</b>	Jersey 5 retenido de la ultrafiltración
<b>J6R</b>	Jersey 6 retenido de la ultrafiltración
<b>J8R</b>	Jersey 8 retenido de la ultrafiltración

Tabla 23. Orden de inyección de muestras para Urea-PAGE 18 %T, U1807061.

<b>U1807061</b>										
Tipo de electroforesis: Urea-PAGE										
Cámara: Amersham Mini vertical unit SE250						Amortiguador: Tris-Cl/Glicina				
Orden de inyección										
Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Muestra	Bco 6x	MPM	ECN 1:4	ECN 1:4	Bco 6x	J5R 6x	J6R 6x	J8R 6X	ECN 1:4	Bco 6X
Volumen (µL)	15	3	8	9	30			9	30	
<b>Gel concentrador</b>		3.9	% T	4	° C	100	V	5	min	
<b>Gel separador</b>		18	% T	4	° C	110	V	120	min	

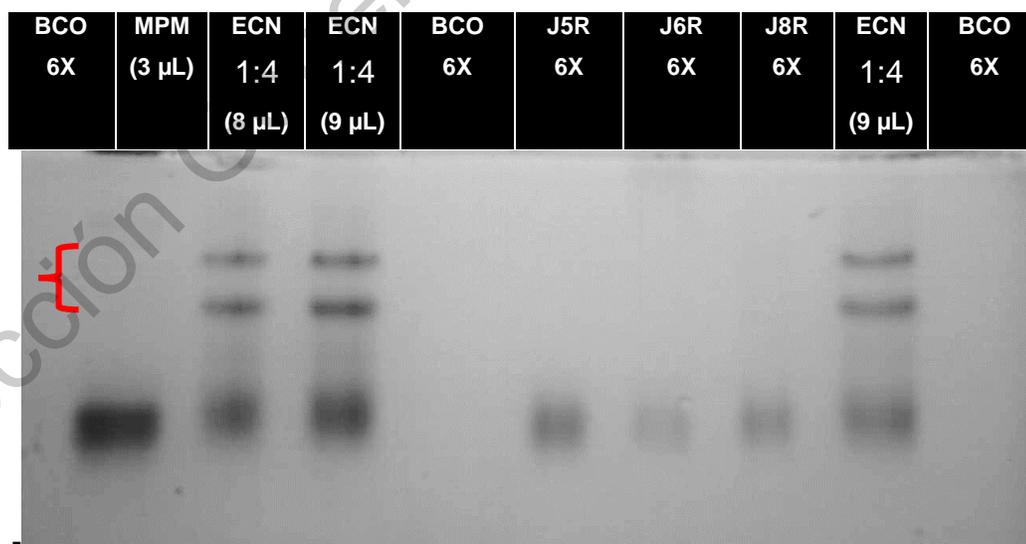


Figura 17. Urea-PAGE 18 %T para muestras de retenido de ultrafiltración de leche de ganado U1807061.

Al contrario de lo esperado, no fue posible observar la separación correcta de las bandas bajo ningunas condiciones de esta técnica, lo cual nos muestra que el patrón de separación de la  $\beta$ -Lg mediante Urea-PAGE, es muy distinto al de las variantes de la  $\beta$ -Caseína, reportado por Duarte y colaboradores (2018). Esto pudiera explicarse con los resultados de Boye y colaboradores (2004) donde es mencionado que a pesar de que la urea ejerce el efecto desnaturalizante en la estructura de los cambios en la  $\beta$ -Lg, esta resulta muy lenta y no tan efectiva como el efecto del SDS y otros agentes. Debido a lo anterior se optó por realizar las pruebas nuevamente mediante geles SDS-PAGE, pero implementando geles de gradiente.

#### 4.4 Separación electroforética de las variantes de beta-lactoglobulina por SDS-PAGE con gradiente de entrecruzamiento.

Se utilizaron geles de gradiente prefabricados 4 – 20 %T y 8 a 16 %T de la marca BioRad bajo diferentes condiciones, basándonos en lo reportado por Wei y colaboradores (2018) que si bien menciona que sus resultados se obtuvieron con geles de gradiente de entrecruzamiento, no especifica el rango, marca o condiciones de corrida. Se muestran únicamente los resultados más relevantes.

Tabla 24. Muestras de retenido de ultrafiltración de leche Jersey, en gel SDS-PAGE 4 – 20 % T.

<b>Codificación</b>	<b>Descripción/Tratamiento</b>
<b>BCO</b>	Blanco: Agua en amortiguador de corrida 2x
<b>MPM</b>	Marcador de peso molecular GE Healthcare LMW 17044601
<b>J1R</b>	Jersey 1 retenido de la ultrafiltración
<b>J2R</b>	Jersey 2 retenido de la ultrafiltración

Tabla 25. Orden de inyección de muestras para SDS-PAGE 4 – 20 %T, S1808101.

<b>S1808101</b>										
Tipo de electroforesis: SDS-PAGE con gradiente %T										
Cámara: Mini Protean Tetra Cell BioRad					Amortiguador: Tris-Cl/Glicina/SDS					
Orden de inyección										
Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Muestra	Blanco 2x				MPM	BCO 2x	J1R 6x	J2R 6x	Blanco 2x	
Volumen (µL)	15				5	15				
<b>Gel separador</b>										
	4 - 20	% T	4	° C	200	V	90	min		

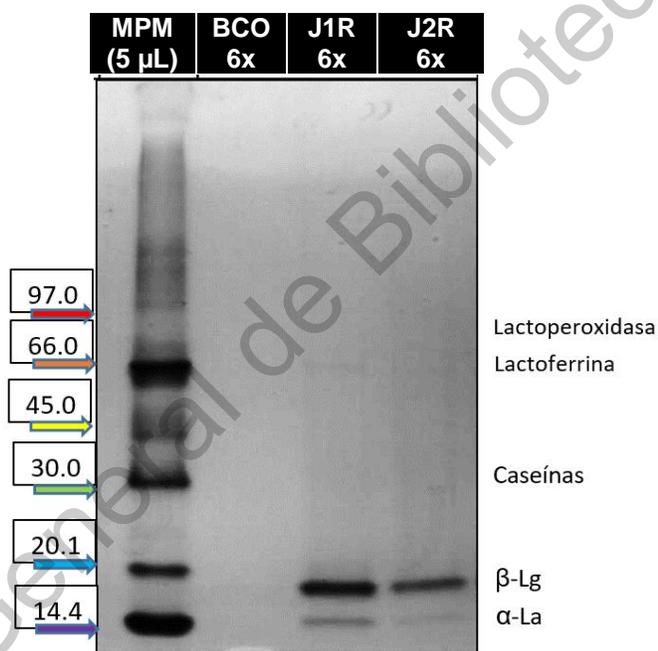


Figura 18. SDS-PAGE 4 – 20 %T para muestras de retenido de ultrafiltración de leche de ganado Jersey S1808101.

Se logró apreciar una ligera separación en la región del peso molecular de las variantes de  $\beta$ -Lg (18.4 kDa), similar a lo reportado por Wei y colaboradores (2018) donde se pudo observar una separación en dos bandas cercanas al peso molecular esperado, por lo cual se realizó un análisis densitométrico, obteniendo lo siguiente.

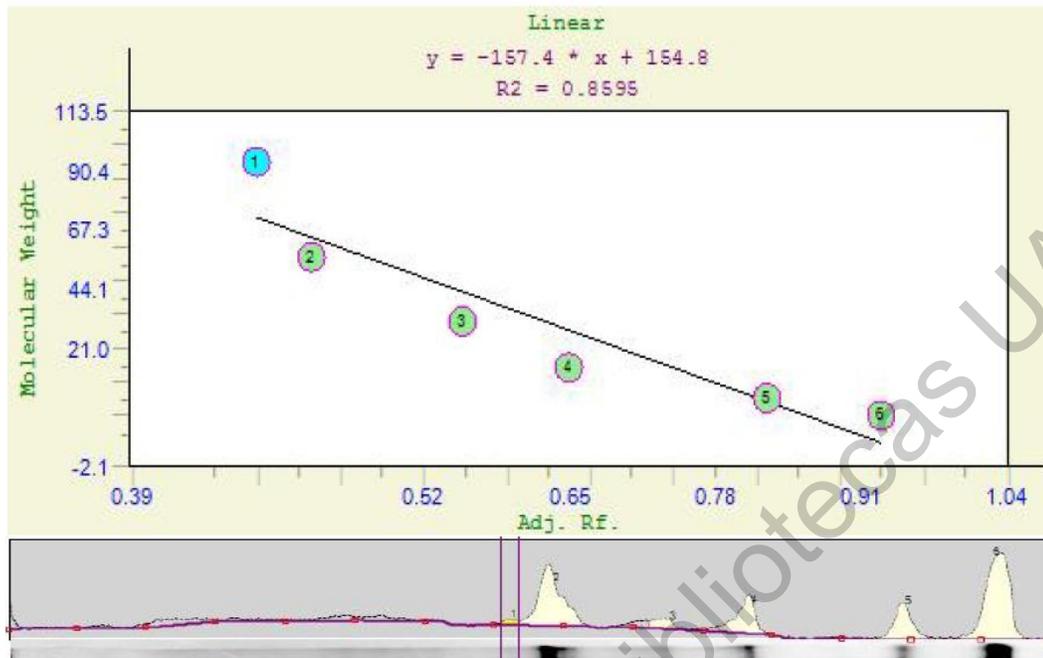


Figura 19. Análisis del marcador de peso molecular, gel de gradiente 4 – 20 %T.

Tabla 26. Estimación de peso molecular para beta lactoglobulina en gel de gradiente 4 – 20 %T, carriles 7 y 8, S1808101.

Carril	Banda	Distancia %	Rf	Peso molecular estimado
7	1	582 85.45	0.8832	18.2
	2	626 14.55	0.9484	13.9
8	1	572 88.76	0.868	18.6
	2	609 11.24	0.946	14.5

No fue posible detectar mediante el análisis densitométrico si las bandas de la región de la  $\beta$ -Lg correspondían a las variantes, no obstante, se decidió continuar utilizando geles de gradiente 8 – 16 %T. Las muestras y condiciones se especifican en las Tablas 27 y 28.

Tabla 27. Muestras de retenido de ultrafiltración de leche Jersey, en gel SDS-PAGE 8 – 16 % T.

Codificación	Descripción/Tratamiento
<b>BCO</b>	Blanco: Agua en amortiguador de corrida 2x
<b>MPM</b>	Marcador de peso molecular GE Healthcare LMW 17044601
<b>J9R</b>	Jersey 9 retenido de la ultrafiltración

Tabla 28. Orden de inyección de muestras para SDS-PAGE 8 – 16 % T, S1811301.

<b>Fecha: S1811301</b>										
Tipo de electroforesis: SDS-PAGE con gradiente %T										
Cámara: Mini Protean Tetra Cell BioRad					Amortiguador: Tris-Cl/Glicina/SDS					
Orden de inyección										
Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Muestra	Blanco 2x		MPM	J9R 2x				Blanco 2x		
Volumen ( $\mu$ L)	15		7	11	11	13	13	15	15	
<b>Gel separador</b>										
	8 - 16	% T	4	$^{\circ}$ C	80	V	155	min		

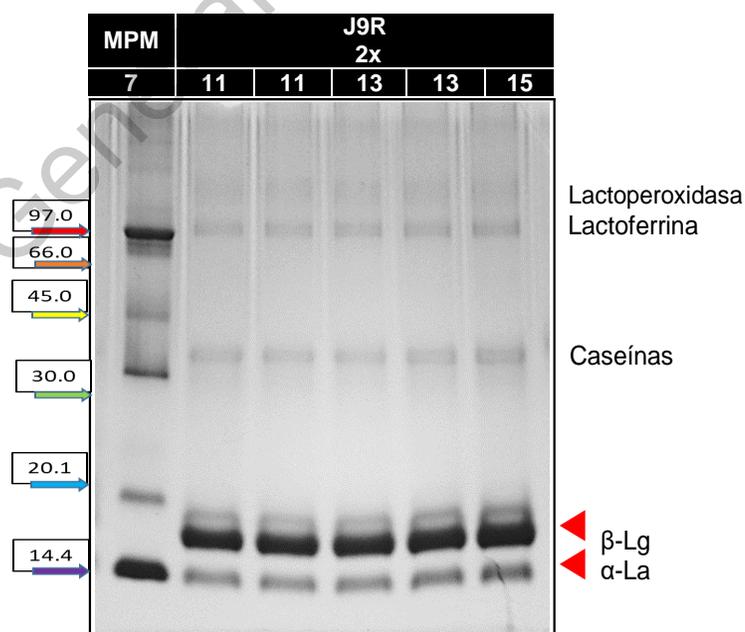


Figura 20. SDS-PAGE 8 – 16 %T para muestras de retenido de ultrafiltración de leche de ganado Jersey S1811301

En el resultado mostrado en la Figura 20 fue posible observar claramente dos bandas en la región de peso molecular de la  $\beta$ -Lg, esta imagen coincide con lo obtenido por Wei y colaboradores (2018) en leche de vaca Holstein. En el cual son visibles dos bandas con poca diferencia de peso molecular en la región de la  $\beta$ -Lg, por ello se decidió realizar el análisis densitométrico para determinar si era posible que las bandas correspondieran a las variantes A y B (Figura 21 y Tabla 29).

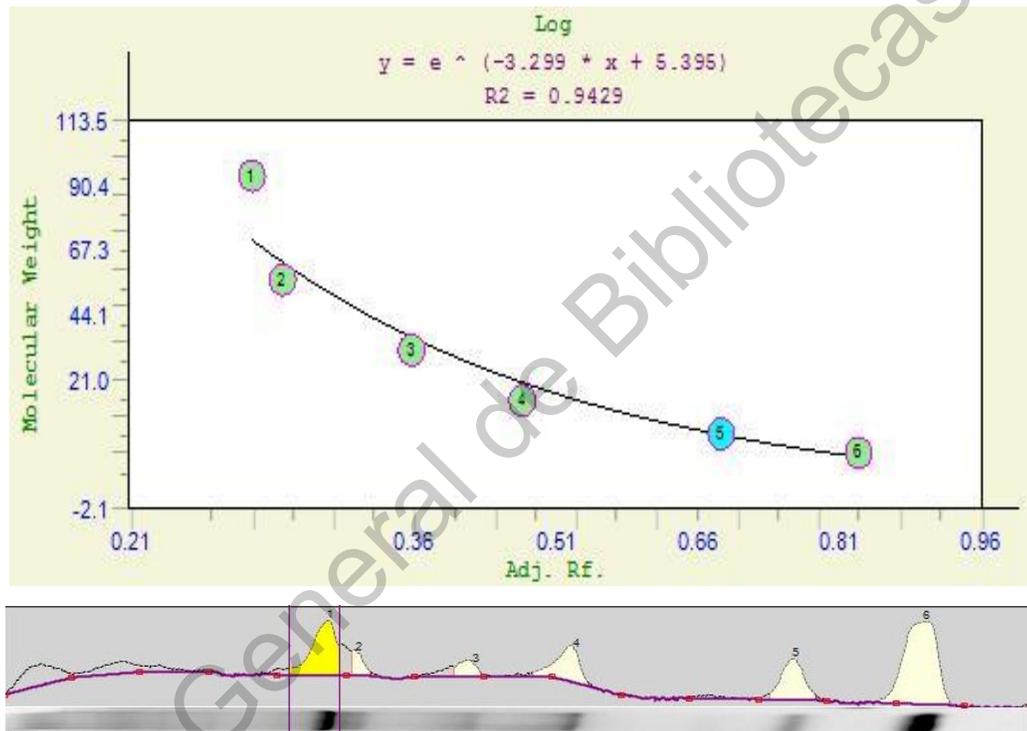


Figura 21. Análisis del marcador de peso molecular en gel de gradiente 8 – 16 % T.

Se pudo determinar que de acuerdo a los pesos moleculares de las bandas, era posible que se tratara de las variantes de  $\beta$ -Lg. Bajo estas condiciones de corrida, la media de la prevalencia entre las proteínas que se sospecha pertenecen a la variante A y la B es 3.9 a 1. Para poder comprobar si se trataba de dichas variantes, se procedió a realizar la inmunodetección en membranas de PVDF.

Tabla 29. Análisis de muestras de retenido, gel de gradiente 8 – 16 %T S1811301.

Carril	Banda	Distancia	%	Rf	Peso molecular estimado	Contenido de proteína muestra (µg)	Contenido de proteína banda (µg)
4	7	643	10.9	0.7978	18.6	5.75	0.696
	8	680	48.57	0.8437	16.1		2.950
	9	728	16.94	0.9032	13.4		--
5	8	649	12.53	0.8052	18.6	6.81	0.244
	9	686	57.44	0.8511	16.1		3.571
	10	737	17.78	0.9144	13.3		--
6	8	651	12.46	0.8077	18.5	6.81	0.970
	9	687	55.20	0.8524	16.2		3.707
	10	738	17.33	0.9156	13.3		--
7	8	651	12.46	0.8077	18.5	6.81	0.981
	9	687	55.20	0.8524	16.2		3.348
	10	738	17.33	0.9156	13.3		--
8	8	635	15.67	0.7878	19.1	7.85	1.130
	9	676	47.45	0.8387	16.3		3.735
	10	721	22.25	0.8945	13.7		--

#### 4.5 Inmunodetección de las variantes de $\beta$ -Lg.

Se realizaron corridas con muestras de leche de vaca Jersey con genotipo conocido, homocigotas AA, homocigotas BB y heterocigotas AB, se transfirieron vía semi-seca siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante, se muestran únicamente los resultados favorables. Las muestras y condiciones de corrida se detallan en las Tablas 30 y 31.

Tabla 30. Muestras de retenido de ultrafiltración de leche jersey AA, AB y BB.

<b>Codificación</b>	<b>Descripción/Tratamiento</b>
<b>MPM</b>	Marcador de peso molecular GE Healthcare LMW 17044601
<b>EBI<sub>g</sub></b>	Estándar de Beta-lactoglobulina bovina (Sigma)
<b>AA J1085</b>	Retenido de la ultrafiltración de leche de vaca Jersey muestra 1085, genotipo AA para $\beta$ -Lg
<b>AB J1125</b>	Retenido de la ultrafiltración de leche de vaca Jersey muestra 1125, genotipo AA para $\beta$ -Lg
<b>BB J1091</b>	Retenido de la ultrafiltración de leche de vaca Jersey muestra 1091, genotipo BB para $\beta$ -Lg

En la primera corrida, realizó la detección de  $\beta$ -Lg general, con un anticuerpo primario anti  $\beta$ -Lg bovina y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP), el resultado se muestra en la Figura 22.

Tabla 31. Orden de inyección gel de gradiente 8 – 16 % T para inmunoblot (1)

<b>S1812211</b>										
Tipo de electroforesis: SDS-PAGE con gradiente %T										
Cámara: Mini Protean Tetra Cell BioRad					Amortiguador: Tris-Cl/Glicina/SDS					
Orden de inyección										
Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Muestra	EBI <sub>g</sub> 2x	AA J108 5 2x	AB J1125 2x	BB J109 1 2x	MPM	MP M	BB J109 1 2x	AB J112 5 2x	AA J108 5 2x	EBI <sub>g</sub> 2x
Volumen ( $\mu$ L)	15				7		15			
Gel separador										
	8-16	% T	4	° C	80	V	155	min		

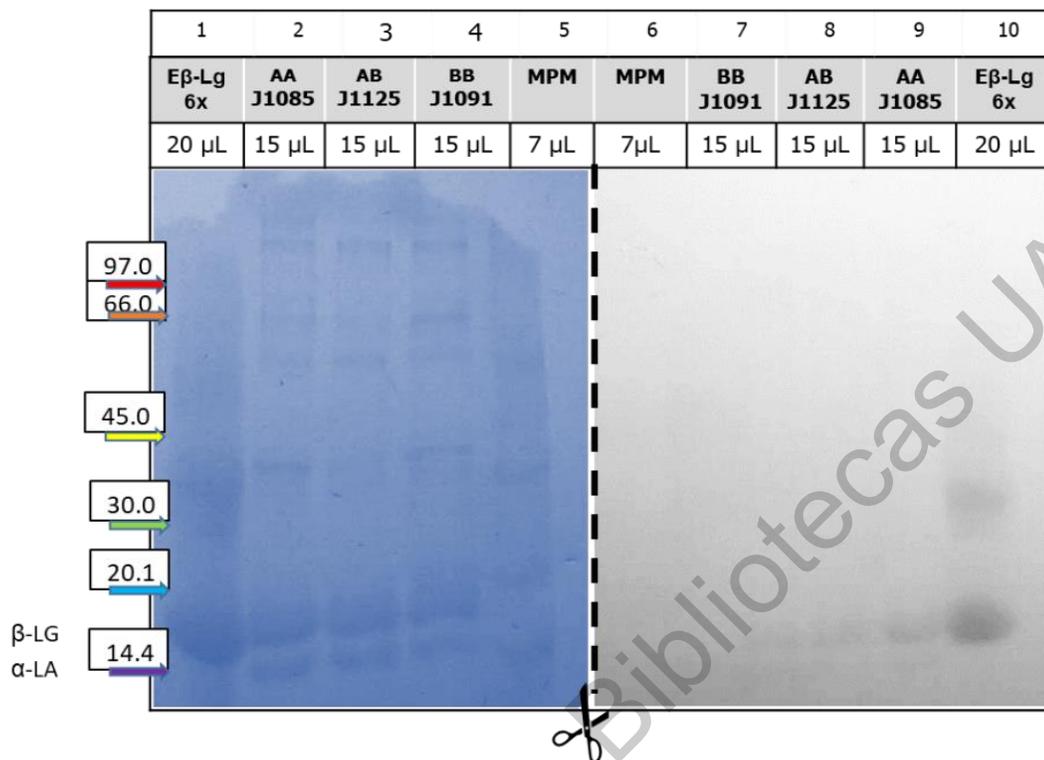


Figura 22. Resultado del Inmunoblot para beta-lactoglobulina (1).

Fue posible observar bandas en las regiones del peso molecular de la beta lactoglobulina, tanto en las muestras como en el estándar de  $\beta$ -Lg, adicionalmente se pudo observar una segunda banda en una región de mayor peso molecular, al respecto se sospecha que se tienen dímeros o asociaciones de la beta lactoglobulina en el estándar, los cuales también mantienen expuesto el epítipo que reconoce el primer anticuerpo. Este resultado correspondería con los hallazgos de Kirsi y colaboradores (2001), en el cual menciona 5 epítipes en la  $\beta$ -Lg que pudieran ser reconocidas por una IgG, lo cual haría posible la detección de un oligómero por el anticuerpo primario.

Se continuaron modificando las condiciones (disminución de la cantidad de proteína en el gel, disminución del tiempo de transferencia, dilución del anticuerpo primario y agente bloqueador) para mejorar la detección, detalles en la Tabla 32. Se muestra únicamente el mejor resultado (Figura 23).

Tabla 32. Orden de inyección gel de gradiente 8 – 16 % T para inmunoblot (2)

<b>S1902261</b>										
Tipo de electroforesis: SDS-PAGE con gradiente %T										
Cámara: Mini Protean Tetra Cell BioRad					Amortiguador: Tris-Cl/Glicina/SDS					
Orden de inyección										
Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Muestra	EBlg 2x	AA J1085 2x	AB J1125 2x	BB J1091 2x	MPM	MPM	BB J1091 2x	AB J1125 2x	AA J1085 2x	EBlg 2x
Volumen (µL)	15				7		15			
<b>Gel separador</b>										
	8 - 16	% T	4	° C	80	V	155	min		

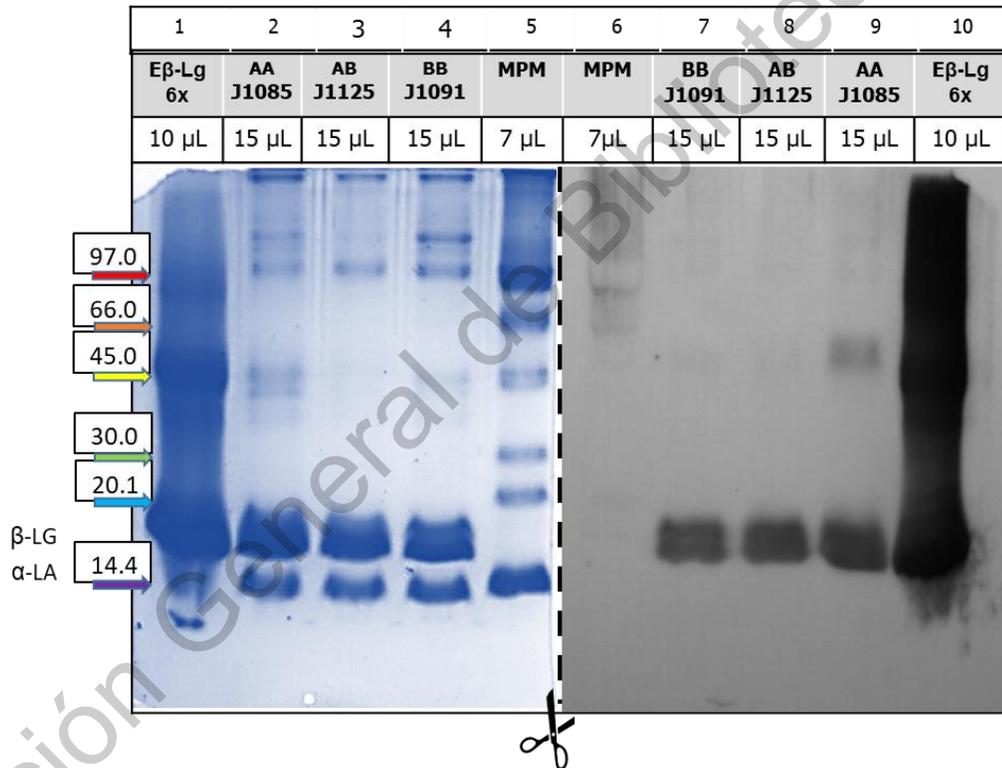


Figura 23. Resultado de Inmunoblot para beta-lactoglobulina (2)

Se logró un mejor resultado con el cambio del agente de bloqueo a gelatina EIA, similar a la metodología utilizada por Ameratunga y Woon (2010) en muestras de suplementos lácteos para adultos. Se pudo observar la detección de bandas tanto en las muestras como el estándar, comprobando así que en ambas bandas se trata de la proteína  $\beta$ -Lg. Estos resultados también coinciden con lo obtenido por Picariello

y colaboradores (2016) en muestras de distintos bovinos y ovinos en comparación con la leche humana. Por tanto se procedió a realizar las corridas con un anticuerpo primario policlonal anti beta-lactoglobulina variante B y un anticuerpo secundario HRP para poder diferenciar entre ambas variantes en distintas muestras de leche. El orden de inyección se observa en la Tabla 33 y los resultados en la Figura 24.

Tabla 33. Orden de inyección gel de gradiente 8 – 16 % T (3)

S1903221										
Tipo de electroforesis: SDS-PAGE con gradiente %T										
Cámara: Mini Protean Tetra Cell BioRad					Amortiguador: Tris-Cl/Glicina/SDS					
Orden de inyección										
Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Muestra	EBIg 2x	AA J1085 2x	AB J1125 2x	BB J1091 2x	MPM	MPM	BB J1091 2x	AB J1125 2x	AA J1085 2x	EBIg 2x
Volumen (µL)	10				7		10			
Gel separador										
	8 - 16	% T	4	° C	80	V	155	min		

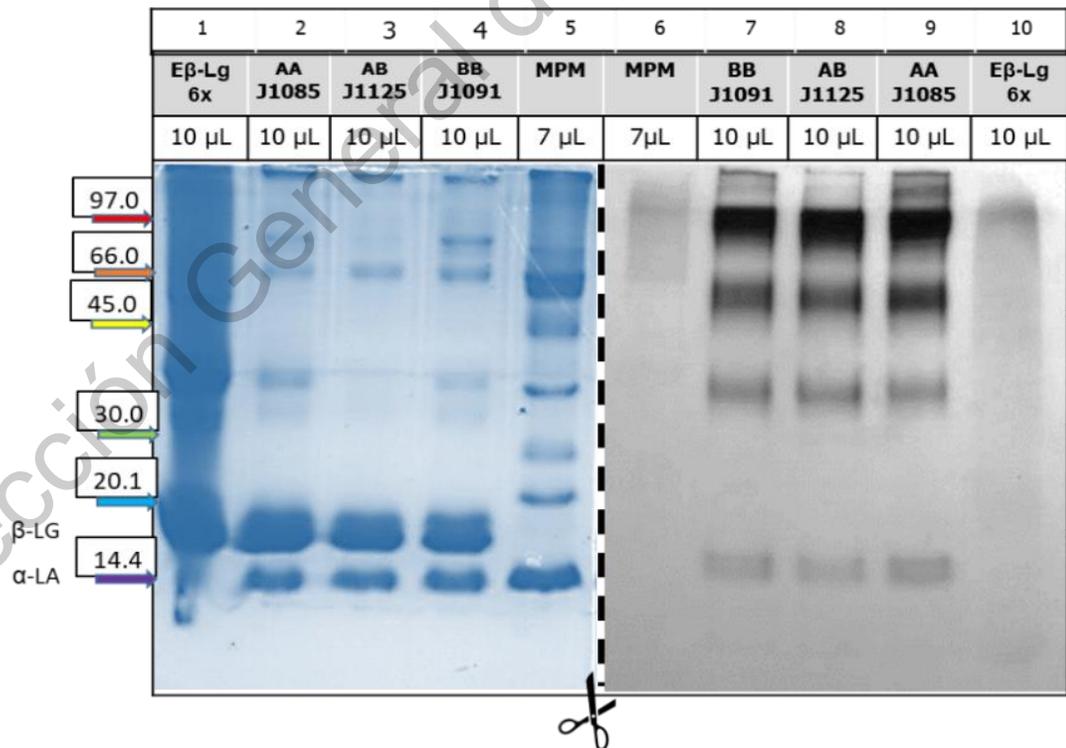


Figura 24. Resultado del Inmunoblot para beta-lactoglobulina B

Como se puede observar, el anticuerpo utilizado reconoce proteínas en la membrana de diferentes pesos moleculares y no es claro si reconoce la  $\beta$ -Lg, ya que se puede apreciar al comparar con el gel teñido, que probablemente se trate de alfa-lactoalbúmina. La especificación del fabricante menciona que es posible una reactividad cruzada con la variante A, sin embargo el resultado que se muestra no es específico ya que se muestra reactividad adicional con otras proteínas. Se realizaron diferentes corridas para corroborar el resultado, incluyendo un protocolo rápido, de los cuales no se muestran las imágenes, se obtuvieron los mismos resultados, por lo tanto no fue posible la inmunodetección de la variante B en ninguno de los casos.

Debido a que no existen alternativas comerciales de anticuerpos específicos anti  $\beta$ -Lg B, se planteó la secuenciación de las bandas obtenidas en los geles y la generación de un anticuerpo por medio de la inmunización de conejos con las bandas purificadas, pero no fue posible realizar estos ensayos.

Existen también diversos trabajos, mediante los cuales fue posible la separación e identificación de las variantes de  $\beta$ -Lg en leche de diferentes razas de bovinos y ovinos, entre ellos métodos como electroforesis capilar de zona (Patterson et al., 1995; Olguín-Arredondo y Vallejo Córdoba, 1999), espectroscopia de infrarrojo medio (Bonfatti et al., 2011), procesamiento de los péptidos de digestión con tripsina por HPCL (Presnell et al., 1990), entre otras.

Por lo anterior, sería interesante continuar con el análisis de las muestras de leche de ganado Jersey basándonos en estas metodologías y considerando la practicidad que pudieran tener en los análisis de rutina para el ato lechero.

#### 4.6 Genotipificación de beta-lactoglobulina por PCR-RFLP

Se obtuvieron diferentes muestras de 150  $\mu$ L de DNA de bovino Jersey, se comprobó la calidad e integridad del material genético, obteniendo muestras adecuadas para la genotipificación. En la Figura 25 se puede observar la verificación de integridad de algunas muestras en gel de agarosa 1%, en la Tabla 34 se muestran los resultados de la cuantificación y calidad del DNA.

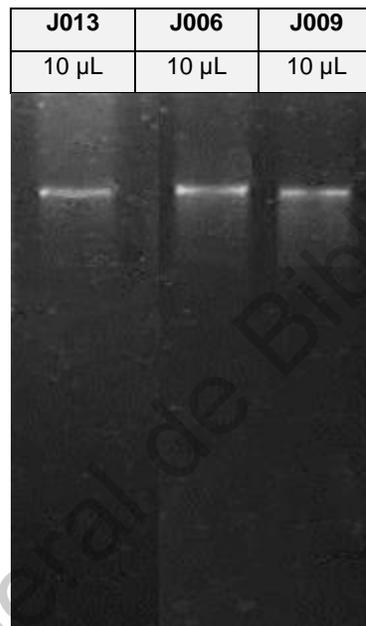


Figura 25. Verificación de la integridad del material genético.

Tabla 34. Cuantificación de material genético y medición de calidad del DNA por la relación  $A_{260}/A_{280}$  Jersey.

Muestra	Concentración de ácidos nucleicos ng/ $\mu$ L	A260	A280	260/280
J009	40.5 $\pm$ 1.3	0.8	0.4	1.9
J006	53.8 $\pm$ 2.4	1.1	0.6	1.9
J013	122.9 $\pm$ 2.8	2.5	1.3	1.9
J012	10.7 $\pm$ 4.1	0.2	0.1	2.0
J017	39.9 $\pm$ 3.7	0.8	0.4	1.9

Se seleccionó la muestra J013 para realizar la amplificación de prueba, se corrieron diferentes gradientes de temperatura y gradientes de cloruro de magnesio. La amplificación se logró con las condiciones mostradas en la Figura 26, se comprobó mediante gel de agarosa 1.5 % p/v con bromuro de etidio 0.005 % v/v (Figura 27), en el que se observó el amplicón de 252 pb esperado para el gen de  $\beta$ -Lg.

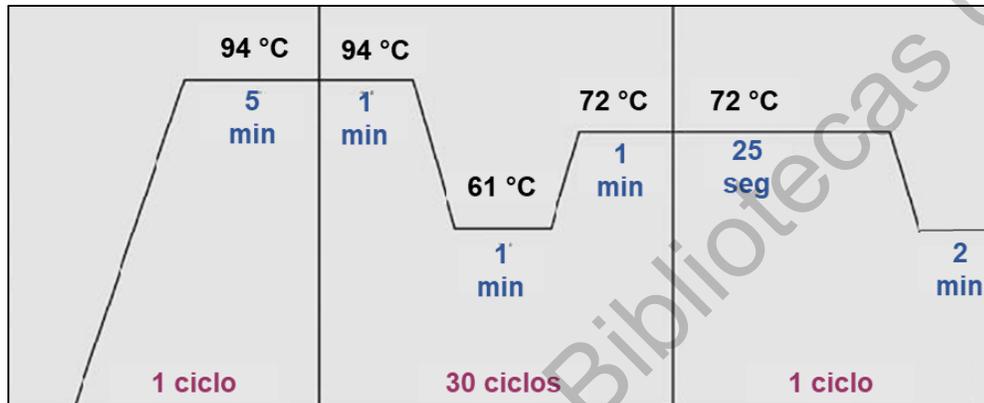


Figura 26. Condiciones de amplificación del gen  $\beta$ -Lg.

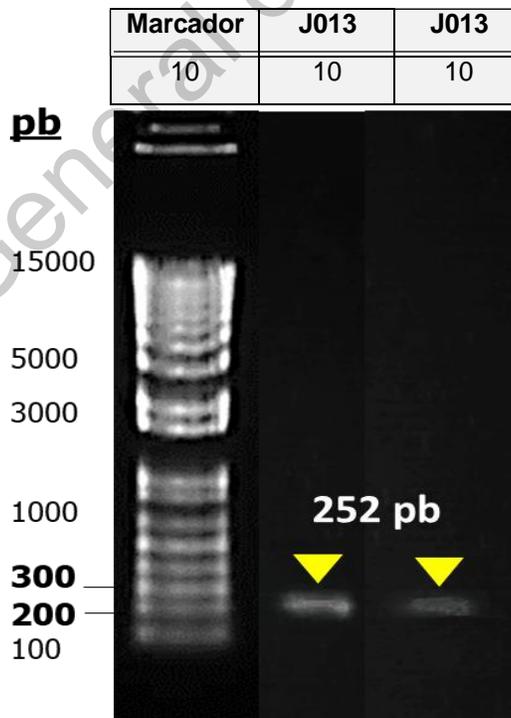


Figura 27. Resultado de la amplificación del gen  $\beta$ -Lg

Se purificó el producto de la amplificación contenido en el gel y se sometió a digestión con la enzima *HaeIII* bajo las condiciones señaladas por el fabricante y por previas investigaciones realizadas por Rachagani y colaboradores (2006): 37 °C/3 horas. El producto de digestión se corrió en un gel de agarosa 2% p/v con bromuro de etidio 0.005% v/v (Figura 28), al observarse 2 bandas, se consideró que la muestra podía corresponder a un individuo homocigoto para la variante A ( $\beta$ -Lg AA), sin embargo era necesario observarla junto a otros genotipos.

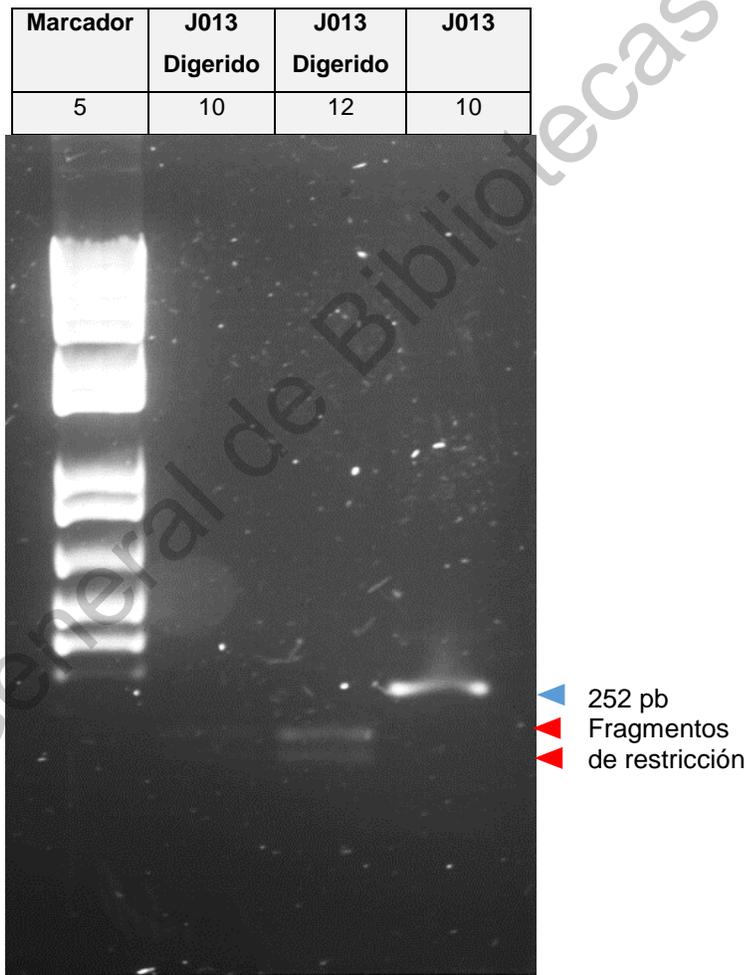


Figura 28. Genotipificación del gen  $\beta$ -Lg mediante la restricción de *HaeIII*. Carril 1 Marcador 1 kb, carril 2 Fragmentos de restricción J013 volumen 5  $\mu$ L, carril 3 Fragmentos de restricción J013 volumen 10  $\mu$ L, carril 4 Producto de PCR Exón IV  $\beta$ -Lg sin digestión.

Al obtener ese resultado, se procedió a procesar un mayor número de muestras, incluyendo individuos de raza Holstein para obtener su genotipo. Se comprobó la calidad e integridad de las muestras, considerando únicamente las muestras con una concentración por encima de los 40 ng/μL y una D.O. igual o mayor a 1.8, en la Tabla 35 se muestran los resultados de las muestras seleccionadas.

Tabla 35. Cuantificación de material genético y medición de calidad del DNA por D.O. 260/280 Holstein.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración de ácidos nucleicos ng/μL</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>
H1290	69.4±3.1	1.5	0.8	1.9
H1279	45.4±3.4	0.8	0.4	2.0
H0860	42.0±1.4	0.8	0.4	1.9
H0437	60.4±5.3	1.0	0.5	1.9
H1448	62.2±4.6	1.0	0.5	1.9
H1442	56.5±2.8	1.1	0.6	1.9
H1441	56.8±3.9	1.2	0.6	1.8
H1362	65.7±4.9	1.4	0.8	1.9
H1116	72.9±0.4	1.5	0.8	1.9
H1513	46.1±2.8	1.0	0.5	1.9
H1129	46.6±2.9	0.9	0.5	1.9
H1516	45.2±1.2	0.9	0.5	1.9
H1144	49.4±0.9	1.0	0.6	1.8
H1024	47.2±1.4	1.0	0.5	1.9
H1452	78.5±1.6	1.6	0.9	1.8
H1213	56.0±0.7	1.1	0.6	1.8

Se realizó la amplificación del gen β-Lg y se sometió a digestión con la enzima *HaeIII*. Lo anterior se muestra en la Figura 29 utilizando un gel de agarosa 4 % p/v.

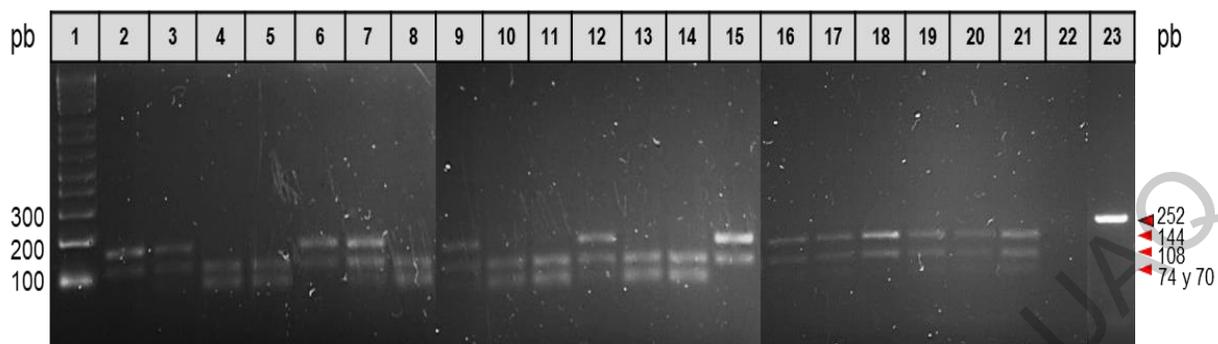


Figura 29. Genotipificación de  $\beta$ -Lg mediante la digestión con *HaeIII* de muestras de ganado Jersey y Holstein. 25  $\mu$ L por carril, carril 1: marcador de 1Kb, carriles 2 a 17: fragmentos de restricción de ganado Holstein, carriles 18 a 21: fragmentos de restricción de ganado Jersey, carril 22: Banco, carril 23: producto de amplificación, Exón IV del gen  $\beta$ -Lg de 252 pb.

Fue posible observar en la Figura 29 las diferencias entre los fragmentos de restricción de las muestras, en el carril 18 se puede observar la muestra J013 que se seleccionó previamente y en este análisis frente a otros genotipos, se comprueba que se trata de una muestra homocigota AA. Cabe destacar que al ser muy pequeña la diferencia entre las últimas 2 bandas de 74 y 70 pb, no se aprecian del todo como dos bandas, sin embargo es clara la diferencia entre las muestras homocigotas BB y las heterocigotas AB. En la Tabla 36 se señalan los genotipos asignados a las muestras.

Tabla 36. Genotipos en las muestras digeridas con *HaeIII*.

Genotipo $\beta$ -Lg	Muestras
AA	J013, H1290, H1448, H1024
AB	J006, J009, J017, H1279, H1442, H1362, H1129, H1452, H1213
BB	H0860, H0437, H1441, H1116, H1513, H1516, H1144

Se calculó la frecuencia del genotipo en el grupo de muestras, mostrándose en la Tabla 37.

Tabla 37. Frecuencia de Genotipos.

<b>Genotipo <math>\beta</math>-Lg</b>	<b>Número de Muestras</b>	<b>Frecuencia del genotipo</b>
TOTAL	20	100 %
AA	4	20 %
AB	9	45 %
BB	7	35 %

Los resultados de la digestión con *HaeIII* son congruentes con lo obtenido por en diferentes investigaciones en ganado *Bos taurus* y *Bos indicus*, sin embargo en la frecuencia de genotipos, se obtuvieron resultados diversos. No se coincide con Da-Xi y colaboradores (2011), quienes reportan mayores frecuencias para el genotipo BB con frecuencias en ganado Holstein de 59.2 % y Jersey de 56.1 % en diferentes regiones de China. En cambio se coincide con los estudios realizados por Maletić y colaboradores (2016), quienes reportan una mayor frecuencia en heterocigotos AB en ganado Busha con un 55.56 % y Holstein con 63.16 % en regiones de Serbia. Adicionalmente se compararon resultados con los obtenidos por Ranchagani y colaboradores (2006), obtenidos en ganado *Bos indicus* mediante técnicas similares, quienes reportan una frecuencia mayor para el genotipo BB para la raza Sahiwal con 69.3 %, a diferencia de la raza Tharparkar cuyo genotipo más frecuente es el homocigoto AB con un 73.3 %.

A pesar de que los resultados son similares a los obtenidos por distintos autores, se considera necesario aumentar el número de muestras de la raza Jersey para poder hacer una conclusión válida al respecto.

## 5. CONCLUSIONES

Mediante la estrategia de purificación planteada, se logró obtener muestras concentradas de suero de leche con un contenido mayor al 80 % de  $\beta$ -Lg, gracias a la implementación del ajuste de pH a 2.5 para evitar la formación de oligómeros, y la ultrafiltración con punto de corte 10 k para retirar proteínas de mayor peso molecular.

Se llevó a cabo exitosamente la separación de dos bandas en la región del peso molecular de la  $\beta$ -Lg (18.4 kDa) mediante el uso de la técnica electroforesis en gel de poliacrilamida con agente desnaturizante SDS en geles de gradiente de entrecruzamiento 8 – 16%. Fue posible confirmar mediante la inmunodetección con un anticuerpo primario anti  $\beta$ -Lg en conejo, que las bandas separadas por SDS-PAGE con gradiente se trataban de variantes de  $\beta$ -Lg.

Sin embargo, no se logró distinguir entre estas variantes debido a que el anticuerpo anti  $\beta$ -Lg-B no resultó suficientemente específico para la detección del polimorfismo de la variante B. Por ello, al no existir una opción comercial disponible de anticuerpos para la detección de las variantes, se podría optar por la secuenciación de las bandas purificadas y la generación un anticuerpo específico, mediante la inmunización de conejos, además de considerar técnicas de análisis instrumental previamente reportadas.

Se logró extraer DNA genómico con suficiente calidad e integridad y establecer las condiciones apropiadas para la amplificación del Exón IV de  $\beta$ -Lg, obteniendo un producto de 252 pb que se logró procesar exitosamente mediante la digestión con la enzima de restricción *HaeIII*, para la genotipificación de diferentes muestras de DNA de ganado Jersey y Holstein.

Mediante el análisis de las frecuencias de los genotipos obtenidos, se identificó que la mayor prevalencia resultó para el genotipo homocigoto AB con un porcentaje de 45 % de las muestras.

Los resultados arrojados por este trabajo, permitieron sentar las bases para el desarrollo de un método de identificación de las variantes genéticas de  $\beta$ -Lg presentes en el ganado, generando la oportunidad de continuar las investigaciones para lograr su estandarización y aplicación como un método de rutina a nivel industrial.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahnert, N., Dallwig, J., Goodman, T., Thomas, G. A. & Beaudet, M. (2007). A Fast, Easy, Accurate Method for Protein Quantitation. *Journal of Biomolecular Techniques*, 18(1), 51.
- Aich R., Batabyal S. & Joardar S.N. (2015). Isolation and purification of beta-lactoglobulin from cow milk. *Veterinary World*, 8(5):621-624.  
Doi: 10.14202/vetworld.2015.621-624
- Alberts B. (2007). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed). Garland Science, 163.
- Alexander, L.J., Beattie, C.W., Hayes, G., Pearse, M.J., Stewart A.F. & Mackinlay, A.G. (1989). Isolation and characterization of the bovine beta-lactoglobulin gene. Genbank identification number XI4710. *Nucleic Acids Research*, 17(16): 6739. Doi: 10.1093/nar/17.16.6739.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*. 25, 3389-3402.
- Ameratunga R. & Woon S. (2010). Anaphylaxis to hyperallergenic functional foods. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 6:33. Doi:10.1186/1710-1492-6-33
- Andrews, A. T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*, 50 (01), 45.  
<https://doi.org/10.1017/S0022029900032519>
- Anfinsen, C. B., & Redfield, R. R. (1956). Protein Structure in Relation to Function and Biosynthesis. *Advances in Protein Chemistry*, 11, 1–100.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60420-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60420-9)
- Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidmann J., Smith J., & Struhl K. (2002). *Short Protocols in Molecular Biology* (5th ed). Wiley-Green Publishing, 1-18, 38, 47-52.
- Baldasso, C., Barros, T. C., & Tessaro, I. C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278(1–3), 381–386.  
<https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.055>

- Berg J., Tymoczko J., Stryer L. (2002). *Biochemistry, (5th Ed)*. W.H. Freeman, 67-73.
- Bhattacharjee, S., Bhattacharjee, C., & Datta, S. (2006). Studies on the fractionation of  $\beta$ -lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chromatography. *Journal of Membrane Science*, 275(1–2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.09.013>
- Bio-Rad. *Mini Protean - Electrophoresis System Manual*. Bulletin 5535. 1-12.
- Bio-Rad. *Transblot turbo - Transfer System*. Bulletin 1704150. 1-22.
- Bonfatti, V., Di Martino, G., & Carnier, P. (2011). Effectiveness of mid-infrared spectroscopy for the prediction of detailed protein composition and contents of protein genetic variants of individual milk of Simmental cows. *Journal of Dairy Science*, 94:5776–5785. Doi: 10.3168/jds.2011-4401
- Bonomi, F., Fiocchi, A., Frøkiær, H., Gaiaschi, A., Iametti, S., Poiesi, C. & Rovere, P. (2003). Reduction of immunoreactivity of bovine  $\beta$ -lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. *Journal of Dairy Research*, 70(1). <https://doi.org/10.1017/S0022029902005678>
- Boye, J., Ma, C.Y., & Ismail, A. (2004). Thermal stability of b-lactoglobulins A and B: effect of SDS, urea, cysteine and N-ethylmaleimide. *Journal of Dairy Research* 71, 207–215. DOI: 10.1017/S0022029904000184
- Braunschweig, M.H. (2006). Bos taurus beta-lactoglobulin variant B precursor (BLG) gene, BLG-B\* allele, complete cds. GenBank Identification number: DQ489319.1. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/DQ489319.1>
- Bu, G., Luo, Y., Zheng, Z., & Zheng, H. (2009). Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in whey protein isolate. *Food and Agricultural Immunology*, 20(3), 195–206. <https://doi.org/10.1080/09540100903026116>
- Burnette, W. (1981). "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A.

- Analytical Biochemistry*, 112, 195-203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Bustin, S. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169–193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- Bustin, S. (2004) *A-Z of quantitative PCR*. IUL Biotechnology. 5,57-58
- Creighton T. (1997). *Protein Structure: A Practical Approach*. Oxford University Press.
- Crittenden, R. G., & Bennett, L. E. (2005). Cow's Milk Allergy: A Complex Disorder. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(sup6), 582S-591S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2005.10719507>
- Da-Xi, R., Shu-Ying, M., You-Liang, C., Cai-Xia, Z., Xian-Wei, L. & Jian-Xin, L. (2011). Genotyping of the k-casein and  $\beta$ -lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and water buffalo by PCR-RFLP. *Journal of Genetics*, 90, e1–e5. Disponible en <https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jgen/090/online/e0001-e0005>
- Derveaux, S., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50(4), 227–230. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>
- Duarte-Vázquez, M. A., García-Ugalde, C. R., Álvarez, B. E., Villegas, L. M., García-Almendárez, B. E., Rosado, J. L., & Regalado, C. (2018). Use of urea-polyacrylamide electrophoresis for discrimination of A1 and A2 beta casein variants in raw cow's milk. *Journal of Food Science and Technology*, 55(5), 1942–1947. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3088-z>
- Duarte-Vázquez, M., García-Ugalde, C., Villegas-Gutiérrez, L., García-Almendárez, B., & Rosado, J. (2017). Production of Cow's Milk Free from Beta-Casein A1 and Its Application in the Manufacturing of Specialized Foods for Early Infant Nutrition. *Foods*, 6(7), 50. <https://doi.org/10.3390/foods6070050>
- El-Zahar, K., Sitohy, M., Dalgarrondo, M., Choiset, Y., Métro, F., Haertlé, T., & Chobert, J.-M. (2004). Purification and physicochemical characterization of ovine  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. *Nahrung/Food*, 48(3), 177–183. doi:10.1002/food.200300447

- FAO & WHO. (1981). *CODEX STAN 72-1981: Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants*. FAO/WHO, 2-4.
- FAO & WHO. (1991). *CODEX STAN 206-1999: General standard for the use of dairy terms*. FAO/WHO, 1.
- FAO & WHO. (2007). *CODEX STAN 72-1981: Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants*. FAO/WHO, 2.
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, & L. K., Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk-Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy chemistry and biochemistry* (2nd Ed). Cham: Springer, 1-3.
- Ganai, N. A., Bovenhuis, H., van Arendonk, J. A. M., & Visker, M. H. P. W. (2009). Novel polymorphisms in the bovine  $\beta$ -lactoglobulin gene and their effects on  $\beta$ -lactoglobulin protein concentration in milk. *Animal Genetics*, 40(2), 127–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01806.x>
- García H. (2000). *Electroforesis en geles de poliacrilamida: Fundamentos, actualidad e importancia* (1st Ed). Universo Diagnóstico.
- Gaso-Sokac, D., Spomenka, Kovac, & Djuro, Josic. (2011). Use of Proteomic Methodology in Optimization of Processing and Quality Control of Food of Animal Origin. *Food Technology and Biotechnology*. 49(4) 397–412.
- González de Cosío, T., Escobar-Zaragoza, L., González-Castell, L.D. & Rivera-Dommarco, J.A. (2013) Prácticas de alimentación infantil y deterioro de la lactancia materna en México. *Salud Publica de México*, 55 supl 2:S170-S179.
- Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>.
- Hyttinen, J.M., Korhonen, V.P., Myohanen, S. & Janne, J. (1995). *Bovine beta-lactoglobulin: cloning and expression in transgenic mice*. Genbank identificaction number: Z48305.1, disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/Z48305.1>.

- Hollar, C.M., Law, A.J., Dalgleish, D.G., Medrano, J.F., Brown, R.J. (1991). Separation of beta-casein A1, A2, and B using cation-exchange fast protein liquid chromatography. *Journal of Dairy Science*, 74, 3308–3313.
- INSP. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, ENSANUT 2012. 55,1 2:S332-S340.
- Invitrogen. (2010). *Qubit 2.0*. Invitrogen by Life Technologies, 1-41.
- Invitrogen. (2010). *Qubit quick reference card MP39808 | MAN0002474*. Invitrogen by Life Technologies, 1-2.
- Invitrogen Argentina. (2007). *Plataforma de cuantificación QUBIT*. Invitrogen by Life Technologies, 20-21.
- Jensen, H. B., Poulsen, N. A., Andersen, K. K., Hammershøj, M., Poulsen, H. D., & Larsen, L. B. (2012). Distinct composition of bovine milk from Jersey and Holstein-Friesian cows with good, poor, or noncoagulation properties as reflected in protein genetic variants and isoforms. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6905–6917. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5675>.
- Kirsi-Marjut, J., Pantipa, C., Ludmilla, B., Kirsten, B., Hugh A. S. (2001). IgE and IgG Binding Epitopes on  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin in Cow's Milk Allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 126(2):111–11 <https://doi.org/10.1159/000049501>.
- Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23(10):1289-91
- Kurien B. T., Scofield R. H. (2015). Western Blotting: An Introduction. *Methods in Molecular Biology*, 1312 17-30. Doi: 10.1007/978-1-4939-2694-7\_5.
- Låås T. (1999). Electrophoresis in gels. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications. *Journal of American Chemistry Society*, 121 (7). Doi: 10.1021/ja985637I
- Labrou, N. E. (2014). *Protein downstream processing: design, development and application of high and low-resolution methods*. Humana Press, 4-6.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lamberti, C., Baro, C., Giribaldi, M., Napolitano, L., Cavallarin, L., & Giuffrida, M. G. (2018). Effects of two different domestic boiling practices on the allergenicity of cow's milk proteins: Domestic boiling and allergenicity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(6), 2370–2377. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8728>
- Lee, M. K., Martin, M. A., & Cho, M. W. (2000). Higher Western Blot Immunoreactivity of Glycoprotein 120 from R5 HIV Type 1 Isolates Compared with X4 and X4R5 Isolates. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 16(8), 765–775. <https://doi.org/10.1089/088922200308765>
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000). *Molecular Cell Biology* (4th Ed). W.H. Freeman, 86-92.
- Lomonte, B. (2007). *Manual de Métodos Inmunológicos*. UCR 78-95.
- Lønnerdal, B. & Forsum, E. (1985) Casein content of human milk. *American Journal of Clinical Nutrition*, 41, 113–120.
- Lorenzo-Abalde, S., Pérez, D., Calvo, J., Spyarakos, E., & González-Fernández, A. (2011). Capítulo 18. Técnicas de inmunodetección aplicadas al campo marino. En *Métodos y técnicas en investigación marina*. Tecnos, 217.
- Lucena, M.E., Álvarez, S., Menéndez, C., Riera F.A. & Álvarez, R. (2006). Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates. Production of milk derivatives as a base for infant formulas. *Separation and Purification Technology*, 52 (2006) 310–316.
- Ma, H. (2006). Western Blotting Method. *The Journal of American Science*, 2(2).
- Maletić, M., Aleksić, N., Vejnović, B., Nikšić, D., Kulić, M., Đukić, B., Ćirković, D. (2016). Polymorphism of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin genes in Busha and Holstein Friesian dairy cows in Serbia. *Mljekarstvo* 66 (3), 198-205. doi: 10.15567/mljekarstvo.2016.0304
- Maubois, J. L. (1984). Separation, extraction and fractionation of milk protein components. *Le Lait*, 64, 485–495.
- Medrano, J.F., Sharrow, L. (1989). Milk Protein Typing of Bovine Mammary Gland Tissue Used to Generate a Complementary Deoxyribonucleic Acid Library. *Journal of Dairy Science*, 72(12) 3190-3196.

- Medrano, J.F. (1995). *Bos taurus beta lactoglobulin A gene, partial cds*. Genbank identification number: U31361.1, disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/u31361>.
- Mercadante, D., Melton, L. D., Norris, G. E., Loo, T. S., Williams, M. A. K., Dobson, R. C. J., & Jameson, G. B. (2012). Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin Is Dimeric Under Imitative Physiological Conditions: Dissociation Equilibrium and Rate Constants over the pH Range of 2.5–7.5. *Biophysical Journal*, 103(2), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.05.041>
- Millipore-Merk. (2013). *PR04305 Microcon centrifugal filter devices - User guide*. 1-5.
- Millipore-Merk. (2015), *PB2778 Protein purification and preparation, High purity and recovery for better discovery*. 27-36.
- Muehlhoff, E., Bennett, A., MacMahon, D., & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). *Milk and dairy products in human nutrition*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 23-25.
- Naqvi, Z., Khan, R. H., & Saleemuddin, M. (2010). A procedure for the purification of Beta-Lactoglobulin from bovine milk using gel filtration chromatography at low pH. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 40(4), 326–336. doi:10.1080/10826068.2010.525405
- NCBI, National Center for Biotechnology Information (2017), *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information, Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>
- Neyestani, T.R., Djalali, M. & Pezeshki, M. (2003) Isolation of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, and bovine serum albumin from cow's milk using gel filtration and anion-exchange chromatography including evaluation of their antigenicity. *Protein Expression and Purification*, 29(2):202-8.
- NLM, National Library of medicine (2014), *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health, Disponible en <https://www.nlm.nih.gov/exhibition/visibleproofs/education/dna/rflp.pdf>

- Novus Biologicals. (2019), *Western Blotting Resources*. Disponible en <https://www.novusbio.com/application/western-blotting>
- O’Riordan, N., Kane, M., Joshi, L., & Hickey, R. M. (2014). Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology*, 24(3), 220–236. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt162>
- Olguín-Arredondo, H. & Vallejo-Córdoba, B. (1999) Separation and determination of beta-lactoglobulin variants A and B in cow's milk by capillary free zone. Electrophoresis. *Journal of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology*, 6(5-6):145-9.
- Olivier, C., Lima, R., Pinto, D., Santos, R., Silva, G., Lorena, S. & Zollner, R. (2012). In search of a tolerance-induction strategy for cow’s milk allergies: significant reduction of beta-lactoglobulin allergenicity via transglutaminase/cysteine polymerization: Allergoid generation by polymerization. *Clinics*, 67(10), 1171–1179. [https://doi.org/10.6061/clinics/2012\(10\)09](https://doi.org/10.6061/clinics/2012(10)09).
- OMS. (2009). *Indicadores para evaluar las prácticas de alimentación del lactante y del niño pequeño*. OMS. 1.
- Paterson, G. R., Hill, J. P., & Otter, D. E. (1995). Separation of  $\beta$ -lactoglobulin A, B and C variants of bovine whey using capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography, A*, 700(1-2), 105–110. doi:10.1016/0021-9673(95)00054-q
- Picariello, G., Addeo, F., Ferranti, P., Nocerino, R., Paparo, L., Passariello, A., Dallas, D.C., Robinson, R.C., Barile, D., & Canani, R.B. (2016). Antibody-independent identification of bovine milk-derived peptides in breast-milk. *Food and function*, 7(8): 3402–3409. doi:10.1039/c6fo00731g.
- Pérez, M. D., Villegas C, Sánchez L, Aranda P, Ena J, & Calvo M. (1989). Interaction of fatty acids with beta-lactoglobulin and albumin from ruminant milk. *Journal of Biochemistry*, 106(6):1094-7.
- Poitras, E., & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2(2), 2–11.
- Presnell, B., Conti, A., Erhardt, G., Krause, I. & Godovac-Zimmermann, J. (1990). A rapid microbore HPLC method for determination of primary structure of beta-

- lactoglobulin genetic variants. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 20(4):325-33. DOI: 10.1016/0165-022x(90)90094-s
- Rachagani, S., Gupta, I.D., Gupta, N. & Gupta, S.C. (2006). Genotyping of  $\beta$ -Lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. *BMC Genetics*, 7:31. doi:10.1186/1471-2156-7-31
- Reinisch, K.M., Chen, L., Verdine, G.L. & Lipscomb, W.N. (1995). The crystal structure of *Hae*III methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing. *Cell*, 82: 143-153.
- Rose, A.S., Bradley, A.R., Valasatava, Y., Duarte, J.M., Prlić, A. & Rose, P.W. (2018). NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*, 34(21): 3755-3758. doi:10.1093/bioinformatics/bty419)
- San Gabriel, M. C. S., Tohya, Y., Sugimura, T., Shimizu, T., Ishiguro, S., & Mochizuki, M. (1997). Identification of Canine Calicivirus Capsid Protein and Its Immunoreactivity in Western Blotting. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59(2), 97–101. <https://doi.org/10.1292/jvms.59.97>
- Tai, C. S., Chen, Y. Y., & Chen, W. L. (2016).  $\beta$  -Lactoglobulin Influences Human Immunity and Promotes Cell Proliferation. *BioMed Research International*, 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/7123587>
- The R Project for Statistical Computing. (2018). *R versión 3.5.0 (Joy in Playing)*. The R Foundation.
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *Comparison of Qubit protein assay*. Thermo Fisher Scientific, 1-4.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115

- Van Reis, R., & Zydney, A. (2007). Bioprocess membrane technology. *Journal of Membrane Science*, 297(1–2), 16–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.02.045>
- Veloso, A. C. A., Teixeira, N. & Ferreira, I. (2002). Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea–polyacrylamide gel electrophoresis Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 967(2002), 209–218.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00787-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00787-2)
- Verhoeckx, K. C. M., Vissers, Y. M., Baumert, J. L., Faludi, R., Feys, M., Flanagan, S., Kimber, I. (2015). Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 223–240. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.005>
- Vincent, J., & Hall, J. (2012). *Encyclopedia of Intensive Care Medicine* (1st ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wei, J., Wagner, S., Maclean, P., Brophy, B., Cole, S., Smolenski, G., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Wells, D.N., Laible, G. (2018). Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen betalactoglobulin. *Scientific reports* (2018) 8:7661.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-25654-8>
- Yang, P.-C., & Mahmood, T. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429.  
<https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Zydney, A. (2001). Membrane separations in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 208–211.