

Desenvolvimento de teste de genotipagem em bovinos para o SNP A1/A2 do gene da beta caseína, usando a técnica de tetra-primer ARMS-PCR¹

Victor Hugo Halfeld Kelmer Maluf^{2,3}, Tamires Rodrigues de Lima⁴, Rosiana Angélica Campos⁵, Isabela Karoline de Aguiar Soares⁶, Hyago Passe Pereira⁷, Robert Domingues⁸, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁸, Marta Fonseca Martins^{9, 10}, João Cláudio do Carmo Panetto^{9, 10}, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva⁹, Marco Antonio Machado^{9,10,11}

1 O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto “Utilização de ferramentas genômicas e quantitativas para maximização dos ganhos genéticos nos programas de seleção em bovinos leiteiros”, liderado por Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva

² Bolsista Embrapa

³ Graduando em Biologia - Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – UniAcademia CES/JF

⁴ Graduando em Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁵ Graduando em Farmácia – Suprema/JF

⁶ Graduando em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁷ Doutorando em Biologia - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁸ Analista da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

⁹ Pesquisador da Embrapa Gado de Leite.

¹⁰ Bolsista de Produtividade do CNPq

¹¹ Orientador – marco.machado@embrapa.br

Resumo: O leite é um alimento rico em nutriente e proteínas, sendo um alimento muito importante na saúde humana. A beta caseína é uma das proteínas mais abundantes no leite bovino, e 12 variantes já foram descritas na literatura. As mais encontradas são as variantes A1 e A2, que diferem entre si por uma troca de nucleotídeo (SNP), que acarreta uma troca de aminoácido. A digestão da beta caseína A1 no trato gastrointestinal humano tem como um de seus produtos finais um peptídeo bioativo denominado beta casomorfina 7, que foi relacionado a várias doenças em humanos. Amostras de DNA de touros da raça Girolando, previamente genotipados para este SNP, foram usados para o desenvolvimento de uma metodologia de genotipagem por *tetra-primer* ARMS-PCR. Após várias padronizações, a metodologia foi desenvolvida com sucesso, possibilitando a diferenciação dos alelos A1 e A2 por meio de uma técnica simples e econômica, envolvendo apenas um único PCR seguido de eletroforese. A genotipagem para as variantes do gene da beta caseína tem tido uma grande procura por parte dos criadores e programas de melhoramento, que visam produzir animais com genótipos A2A2.

Palavras-chave: Beta-caseína, A1A2, Genotipagem, ARMS-PCR

Development of a bovine genotyping test for the A1/A2 SNP of the beta-casein gene, using the tetra-primer ARMS-PCR technique

Abstract: Milk is a rich food in nutrients and proteins and it is very important for the human health. Beta-casein is one of the most abundant proteins in bovine milk and a total of 12 variants have been described in the literature. The most common are the A1 and A2 variants that differ from each other by a nucleotide change (SNP) which promotes an amino acid change. The digestion of beta-casein A1 in the human gastrointestinal tract generates a bioactive peptide called beta Casomorphine 7 which has been linked to several diseases in humans. Beta-casein previously genotyped DNA samples from Girolando bulls were used to develop a tetra-primer ARMS-PCR genotyping protocol which was successfully achieved, enabling the differentiation of the A1 and A2 alleles through a simple and low-cost technique, involving only a single PCR followed by electrophoresis. The genotyping for this SNP is in great demand by dairy producers and breeding programs aiming to produce animals with A2A2 genotype.

Keywords: Beta-casein, A1A2, SNP genotyping, ARMS-PCR

Introdução

O leite é uma ótima fonte de nutrientes e tem papel importante na alimentação humana. Em mamíferos, a caseína representa cerca de 80% das proteínas presentes no leite, e os outros 20% são chamadas de proteínas do soro (alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina) (Eigel, *et al* 1984). O leite bovino contém quatro caseínas (alfa S1-CN, alfa S2-CN, beta-CN e kappa-CN) (Sulimova *et al.*, 2007; Jaiswal *et al.*, 2014) sendo que a beta-caseína corresponde a 25-35% do total.

A beta-caseína é codificada pelo gene CSN2, que é altamente polimórfico, possuindo 209 aminoácidos (Haq *et al.*, 2013). Existem 12 variantes desta proteína (A1; A2; A3; B; C; D; E; F; H1; H2; I; G) em raças bovinas (Kaminiski, *et al.* 2007; Haq *et al.*, 2013). As variantes mais comuns no leite de bovinos são as β -caseínas A1 e A2, que se diferenciam pela mudança de um nucleotídeo (SNP), troca de citosina por adenosina, gerando uma substituição do aminoácido na posição 67 da cadeia proteica, na qual a prolina no A2 é substituída por uma histidina no A1 (Reis Filho *et al.*, 2012). A digestão da beta-caseína A1, no trato gastrointestinal humano, tem como um de seus produtos finais um peptídeo bioativo denominado beta-casomorfina 7 (BCM-7), que foi relacionado a várias doenças em humanos, como diabetes, doenças cardiovasculares, autismo, esquizofrenia e doenças autoimunes (Woodford, 2008).

Portanto, empresas nacionais e internacionais buscam técnicas que possam identificar bovinos voltados à comercialização de leite A2, tendo em vista que há uma menor produção do BCM-7, visando o bem-estar humano. No Brasil, produtores tem realizado a genotipagem desse gene em bovinos, principalmente das raças Gir, Girolando e Holandês, a fim de manter seus rebanhos completamente homozigotos para o alelo A2 da CSN2 (Neiva, 2018).

Os marcadores moleculares do tipo SNP são considerados um dos mais importantes, porém, nos países em desenvolvimento, é difícil e caro genotipar um grande número de animais por métodos de PCR e pós-PCR (Ahlawat *et al.*, 2014). Uma metodologia simples e econômica de genotipagem de SNPs que envolve apenas um único PCR seguido de eletroforese em gel é chamado de *tetra-primer ARMS-PCR* (Chiapparino *et al.*, 2004). Essa técnica usa dois conjuntos de *primers*, os externos e internos, sendo que os externos amplificam um grande fragmento do gene alvo, sem diferenciar os genótipos, e cada primer interno se combina com um dos *primers* externos para gerar fragmentos menores e específicos, de acordo com o alelo presente. Esses fragmentos podem ser observados facilmente em gel de eletroforese, diferenciando homozigotos e heterozigotos (Li *et al.*, 2014).

O objetivo do estudo foi desenvolver uma metodologia de genotipagem simples e de baixo custo, para o SNP A1A2 localizado no gene da beta-caseína, utilizando a técnica *tetra-primer ARMS-PCR*.

Material e Métodos

Foram analisadas amostras de DNA genômico de touros da raça Girolando pertencentes ao Banco de DNA de Bovinos de Leite do Laboratório de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez. Essas amostras foram previamente genotipadas para o gene da beta-caseína pelos métodos PCR-RFLP e PCR alelo específico e os resultados foram utilizados como controle para validar os resultados da técnica *tetra-primer ARMS-PCR*.

Com a utilização do programa Primer 1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) foram desenhados quatro *primers*, dois internos (*inner primers*), que se ligam na região específica da mutação, e dois externos (*outer primers*), que funcionam com controle positivo da reação de PCR.

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para a diferenciação dos alelos da beta-caseína A1 e A2.

Nome	Sequência 5'-3'
A1 Forward inner:	TAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCATTCA
A2 Reverse inner:	GAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTGTCAG
Forward outer:	CAGGATGAACTCCAGGATAAAATCCACCCC
Reverse outer:	GCTTAGGAGCCATAGCCTCCTTCACTTTGG

Para obter a melhor condição de reação do PCR, foram testadas diferentes concentrações de *primers*, dNTP, Taq, MgCl₂, e temperaturas de termociclagem. Após a amplificação do DNA, os fragmentos foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida nativo 8% corado com nitrato de prata 12%. A corrida foi realizada a 400 volts por 2 horas.

Os padrões dos fragmentos digeridos observados no gel variaram de acordo com os alelos presentes em suas respectivas bandas. Alelos homozigotos A1A1 representado pelas bandas com 193 e 145 pares de base (pb) respectivamente, alelos heterozigotos A1A2 193,145 e 103 pares de base (pb) e alelos homozigotos para A2A2 nas bandas 193 e 103 pares de base (pb).

Resultados e Discussão

As reações de PCR foram padronizadas num volume total de 25µL, contendo 90ng de DNA, 0,6 µM de cada *primer* interno e 0,1 µM de cada *primer* externo, 200 µM de dNTP, 3,5 mM de MgCl₂, 1X de tampão de PCR (Promega, Madison, EUA) e 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, EUA). As amostras foram submetidas a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 30 s de desnaturação (94°C), 30 s de ligação (63°C) e 30 s de extensão (72°C), e um passo final de 5 min a 72°C para extensão final. A Figura 1 mostra o perfil das bandas no gel, diferenciando claramente os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2.

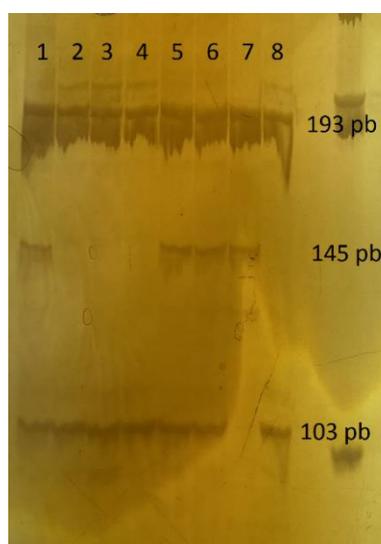


Figura 1. Foto do gel de poliacrilamida nativo de 8% mostrando o resultado do PCR pela técnica *tetra-primer ARMS-PCR* para o gene da beta-caseína. Amostras 1, 5 e 6 possuem o genótipo A1A2, a amostra 7 possui o genótipo A1A1 e as

amostras 2, 3, 4 e 8 possuem o genótipo A2A2, ao final, marcador de peso molecular de 100 pb.

A técnica de tetra-primer ARMS PCR foi eficiente para a perfeita diferenciação entre os alelos, visto que o tamanho das bandas amplificadas foi diferentemente suficiente para serem distinguidas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. A melhor condição de PCR foi obtida com diferença de concentração de 6:1 entre os *primers* internos e externos. Os genótipos obtidos estavam em conformidade com os obtidos pelas outras técnicas já validadas.

Rincón & Medrano (2003) desenvolveram protocolos de genotipagem por *tetra-primer* ARMS-PCR de proteínas do leite bovino com sucesso, e Ali et al (2019) também desenvolveram com sucesso um protocolo para diferenciação dos alelos A1 e A2 para beta-caseína por *tetra-primer* ARMS-PCR, porém com outro conjunto de *primers* e eletroforese em gel de agarose. Todos confirmaram a eficiência do método, sendo este preciso, rápido, de fácil reprodução e de baixo custo.

Conclusões

Os genótipos dos animais, obtidos anteriormente com outras técnicas (PCR-RFLP e AS-PCR) foram confirmados com o desenvolvimento de um protocolo utilizando a técnica *tetra-primer ARMS-PCR*. Portanto, esse protocolo se mostrou eficiente, caracterizando-se como uma alternativa rápida e barata para a identificação dos alelos da beta-caseína A1 e A2, tão importantes atualmente para o melhoramento das raças leiteiras no Brasil e no mundo.

Agradecimentos

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Equipe do Laboratório de Genética Molecular, Orientador Marco Antonio Machado e Faculdade de Ciências Biológicas – UniAcademia.

Referências

- AHLAWAT, S.; SAXENA, P.; ALAM, P.; WAJID, S.; ABDIN, M. Z. Modulation of artemisinin biosynthesis by elicitors, inhibitor, and precursor in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, p. 811-824, 2014.
- ALI, W. R.; AMIN, I.; ASIF, M.; MANSOOR, S. Genotyping test development and genotyping survey of Pakistani population of Holstein Friesian imported from different origins for A1/A2 SNP in Beta-casein gene. *BioRxiv*, p.1-16, 2019. [doi: https://doi.org/10.1101/720045](https://doi.org/10.1101/720045)
- CHIAPPARINO, E.; LEE, D.; DONINI, P. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. **Genome**, [S. l.], v. 47, p. 414-20, 2004.
- EIGEL, W. N.; BUTLER, J. E.; ERNSTROM, C. A.; FARRELL, H. M.; HALWARKAR, V. R.; JENNESS, R. E.; WHITNEY, R. M. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.1599–1631, 1984.
- HAQ, M. R. U.; KAPILA, R.; SHARMA, R.; SALIGANTL, V.; KAPILA, S. Comparative evaluation of cow β -casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. **European Journal of Nutrition**, v.10, p.1-11, 2013.
- JAISWAL, K.; DE, S.; SARSAVAN, A. Detection of single nucleotide polymorphism by T-ARMS PCR of cross bred cattle Karan Fries for A1, A2 beta-casein types. **International Journal of Scientific Research in Biological Science**, v.1, p.18-20, 2014.

- KAMINSKI, S.; CIESLINSKA, A.; KOSTYRA, E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, v.48, p.189–198, 2007.
- LI, M.; SUN, X.; JIANG, J.; SUN, Y.; LAN, X.; LEI, C.; ZHANG, C.; CHEN, H. Tetra-primer ARMS-PCR is an efficient SNP genotyping method: An example from SIRT2. **Analytical Methods**, v.6 p. 1835-1840, 2014.
- NEIVA, R. Brazil develops first genomic assessment system for dairy cattle: Biotechnology and biosafety. **Embrapa Dairy Cattle**, 8 maio 2018.
- REIS FILHO, J.C.; TORAL, F. L. B.; VERNEQUE, R. S.; VERCESI FILHO, A. E.; TORRES, R. A.; EUCLYDES, R. F. Incorporation of lactations with non-conventional drying-off causes in genetic evaluation of Gyr dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.2018-2024, 2012. [doi: 10.1590/S1516-35982012000900008](https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000900008)
- RINCÓN, G.; MEDRANO, J. F. Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 120, p. 331-337, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2003.00405.x>
- SULIMOVA, G. E.; AZARI, M. A. RHOSTAMZADEH, J.; ABADI, M. R. M.; LAZEBNY, O. E. κ -casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. **Russian Journal of Genetics**, v.43, p.73-79, 2007.
- WOODFORD, K. A1 Beta-casein, Type 1 diabetes and links to other modern illnesses. In: **International Diabetes Federation Western Pacific Congress**, 2008. Wellington: IDF, 2008. <https://onlybuyvegan.com/wp-content/uploads/2017/03/diabetesandmilk.pdf>