



Máster en Tecnología y Sostenibilidad en la Industria Alimentaria

Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación

*Puesta a punto de una técnica de identificación
de variantes de β -caseína en leche.*

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Autor: Lucía Jiménez Montenegro

Directora: Olaia Urrutia Vera

Codirectora: Nerea Iturmendi Vizcay

Octubre de 2021

**PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DE β -
CASEÍNA EN LECHE.**

Memoria presentada por Lucía Jiménez Montenegro para la obtención del título de
Máster en Tecnología y Sostenibilidad en la Industria Alimentaria por la
Universidad Pública de Navarra.

Fdo: Lucía Jiménez Montenegro

VºBº Directora del TFM

Dra. Olaia Urrutia Vera

Profesora Ayudante Doctor

Universidad Pública de Navarra

Pamplona, 18 de octubre de 2021

AGRADECIMIENTOS

Bueno, por fin estoy escribiendo estas palabras...sí... por fin...y, ¿algo bueno significará eso no? Pues sí, que al fin he conseguido terminar este trabajo, que comenzó hace algo más de un año, y que ya a día de hoy ve su fin.

No ha sido fácil, demasiadas idas y venidas, demasiadas interrupciones y caos de por medio. Este trabajo me ha podido ver en todas mis facetas: desde el entusiasmo y la alegría, hasta la condena máxima, o el no poder parar en la silla más de media hora mientras lo hacía, por estar lisiada. Y bueno, después de todo, creo que ha quedado un trabajazo.

Gracias en primer lugar a mi tutora Olaia Urrutia, por su esfuerzo y dedicación, por explicarme las cosas con calma, por aguantar cada vez que llegaba tarde por las mañanas o las veces que presenciaba mi desorden de información en el ordenador. Sé que te he sacado de quicio y alguna bronca que otra me ha caído, pero en el fondo sé que algo de cariño me has cogido.

En cuanto a lo personal, voy a dar las gracias en primer lugar, a mis navarricos de “cuadrilla en formación”, ya que sin vosotros no hubiera conseguido reflotar tan fácilmente de las cenizas. Gracias sobre todo a Marinoak, por ser mi apoyo fundamental, cuidarme y hacerme sentir como en casa, y, sin duda, por esas megavisitas guiadas a Orkoien. Gracias a Aitor, por ser el mejor compi de piso que se puede tener y por sacarme siempre una sonrisa, incluso cuando estoy megacondenada y recién levantada. Tendrás que soportar más autoinvitaciones a Lesakako. Gracias también a Pitxon, porque tu alegría y vitalidad son especiales. Gracias por ese apoyo mutuo que nos dimos, tras aparecer en los periódicos, que nos permitió salir de ese gran bache que nos tocó vivir. Gracias a Jose Miguel, porque tú sí que me has aguantado desde el minuto 1 por aquí, y esa energía, desorden y locura que tienes, te hace especial.

Ya saliendo de tierras navarricas, gracias a mi querida gente de Madrid. Gracias a Marina por estar ahí, viéndome y apoyándome durante todas las aventuras de mi vida. Gracias a Moi y Manu, por la locura que me transmitís, por los trambolikeos y por ser mis psicólogos en este último año. Gracias también a Elia, Carmen y Aloia, mis queridas niñas, siempre tan importantes para mí. Todos vosotros hicisteis del mes de Julio algo especial, con esas visitas a Villaverde, que no olvidaré. Gracias.

Gracias también a Estela, porque desde que hice contigo el TFG no has dejado de ayudarme y aconsejarme. Actúas conmigo muchas veces como si fueras mi segunda madre, y siento el cariño incluso aunque estemos en la otra punta del mundo. Ojalá tener tu vitalidad y tu optimismo siempre.

Y, por último, dar las gracias a mi hermano y mis padres, porque me apoyaron desde el primer momento que decidí irme a Navarra, y a día de hoy me siguen apoyando en todas las decisiones. Sé que conmigo han pasado la peor experiencia de su vida, pero bueno, juntos lo superamos, y, al fin y al cabo, alguna que otra alegría también os doy. No puedo tener más suerte.

Gracias a todos y a la vida por dejarme seguir disfrutando de ella. Me quedan ingentes cantidades de cerveza que degustar.

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Definición, producción y consumo de leche.	1
1.2. Composición de la leche de vaca	2
1.3. β -caseína en la leche de vaca	3
1.4. Posibles problemáticas asociadas al alelo A1 de la β -caseína	7
1.5. Métodos para la identificación de las variantes de la β -caseína en leche: técnicas de análisis de ADN.....	9
1.5.1. PCR en tiempo real.....	9
1.5.1.1. <i>Modificaciones de la PCR en tiempo real</i>	13
1.5.2. Otras técnicas de análisis de ADN.....	15
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Extracción de ADN a partir de células somáticas de leche.	21
3.1.1. Obtención de las muestras de leche.	21
3.1.2. Cálculo del tamaño muestral.	21
3.1.3. Pretratamiento de las muestras de leche.	21
3.1.4. Métodos de extracción del ADN a partir de células somáticas de la leche.	22
3.2. Selección de cebadores, sondas y controles para la qPCR.....	24
3.2.1. Diseño de cebadores.	24
3.2.2. Selección de sondas	25
3.2.3. Selección de las muestras de referencia: controles comerciales (<i>IDT</i>).....	26
3.3. Análisis de las muestras de ADN extraídas de las células somáticas de la leche.	26
3.3.1. Cuantificación y pureza del ADN.	26
3.3.2. Verificación de la amplificación mediante qPCR.....	27
3.3.3. Análisis estadístico	28
3.4. Optimización de las condiciones de amplificación de la qPCR.....	28

3.4.1.	Optimización de la concentración de cebadores	28
3.4.2.	Optimización de la concentración de cebadores y sondas	29
3.5.	Validación del método de qPCR para identificación de alelos A1 y A2 de la β -caseína mediante	30
3.5.1.	Eficiencia de amplificación de la qPCR	30
3.5.2.	Sensibilidad de la qPCR: rango dinámico, límite de detección y límite de cuantificación.	33
3.5.3.	Repetibilidad de la qPCR.	34
3.5.4.	Selectividad de la qPCR.	34
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1.	Selección del método óptimo de extracción de ADN a partir de células somáticas de leche. 36	
4.2.	Optimización de las condiciones de amplificación para qPCR.	37
4.2.1.	Optimización de la concentración de cebadores	37
4.2.2.	Optimización de la concentración de cebadores y sondas	38
4.3.	Validación del método de identificación de alelos A1 y A2 de la β -caseína mediante qPCR.....	39
4.3.1.	Eficiencia de amplificación de la qPCR	39
4.3.2.	Sensibilidad de la qPCR: rango dinámico, límite de detección y límite de cuantificación.	40
4.3.3.	Repetibilidad de la qPCR.	44
4.3.4.	Selectividad de la qPCR.	46
5.	CONCLUSIONES	50
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	52
	ANEXOS	A

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Destino de la leche (todas las clases de leche) en las industrias lácteas de España.	1
Tabla 2. Composición química de la leche de vaca.	3
Tabla 3. Polimorfismos del gen <i>CSN2</i> que codifican los diferentes tipos de β -caseína.	4
Tabla 4. Secuencias de los cebadores forward y reverse.	25
Tabla 5. Región amplificada del gen <i>CSN2</i> con los polimorfismos A1/A2.	25
Tabla 6. Secuencias de las sondas Affinity Plus diseñadas para detectar el polimorfismo A1/A2 del gen <i>CSN2</i>	26
Tabla 7. Condiciones de PCR en tiempo real para verificar la correcta extracción y amplificación de las muestras de ADN extraído.	27
Tabla 8. Condiciones de amplificación qPCR tiempo real con el fluoróforo <i>SYBR Green</i>	27
Tabla 9. Matriz de cebadores para la amplificación del gen <i>CSN2</i> con diferentes concentraciones de ADN.	28
Tabla 10. Condiciones PCR en tiempo real para realizar la matriz de cebadores.	29
Tabla 11. Matriz de cebadores y sondas para la amplificación del gen <i>CSN2</i>	29
Tabla 12. Condiciones qPCR para matriz de cebadores y sondas.	30
Tabla 13. Condiciones de amplificación PCR tiempo real con las sondas <i>Affinity Plus</i>	30
Tabla 14. Concentraciones decrecientes de control A1 en A2 y muestras genotipadas A1A1 en A2A2.	32
Tabla 15. Estadísticos descriptivos resultados del ANOVA de la concentración (ng/ μ L), calidad del ADN (A260/280) y Cq de los cuatro métodos de extracción ensayados.	36
Tabla 16. Valores de Cq y RFU obtenidos en la optimización de la concentración de cebadores de amplificación para qPCR.	37
Tabla 17. Valores de Cq y fluorescencia (RFU) obtenidos en la optimización de la concentración de cebadores y sondas de amplificación para qPCR.	38
Tabla 18. Condiciones PCR tiempo real optimizadas para la amplificación y detección de las variantes de la β -caseína.	38
Tabla 19. Eficiencia de amplificación de qPCR empleando muestras de referencia y la muestra genotipada heterocigota.	40

Tabla 21. Valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) absolutos del método qPCR con las muestras de referencia.	41
Tabla 22. Valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) absolutos del método qPCR con las diluciones seriadas de la muestra genotipada.....	41
Tabla 23. Valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) relativos de las mezclas de las muestras de referencia.	42
Tabla 24. Valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) relativos de las mezclas de las muestras genotipadas.....	43
Tabla 25. Repetibilidad intra e inter-ensayo de la sonda A1 empleando muestras de referencia de ADN.	45
Tabla 26. Repetibilidad intra e inter-ensayo de la sonda A2 empleando muestras de referencia de ADN.	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países del mundo consumidores de leche líquida.	2
Figura 2. Composición estructural del <i>locus CN</i> conformado por los 4 genes codificantes de las caseínas: α s1-caseína (<i>CSN1S1</i>), β -caseína (<i>CSN2</i>), α s2-caseína (<i>CSN1S2</i>) y κ -caseína (<i>CSN3</i>). A) Organización genómica del locus de la caseína bovina. B) Organización estructural del cromosoma 6.....	4
Figura 3. Representación de la secuencia de aminoácidos de la β -caseína A2 y A1, y la liberación de BCM-7 cuando la prolina es reemplazada por histidina en la posición 67.	6
Figura 4. Curva de melting o curva de disociación.....	10
Figura 5. Representación gráfica del mecanismo de actuación de las sondas Taqman.	12
Figura 6. Incremento de la temperatura de melting de los nucleótidos bloqueados frente a los nucleótidos no modificados.	12
Figura 7. Curva de amplificación.	13
Figura 8. Análisis HRMA: curvas de melting derivadas: A1A1 homocigoto (línea roja), A1A2 heterocigoto (línea negra) y A2A2 homocigoto (línea azul).	14
Figura 9. Electroforesis en gel de un producto de PCR de 854 pb empleando la técnica AS-PCR.	15
Figura 10. Electroforesis en gel de un producto de PCR de 121 pb empleando la técnica ACSR-PCR.	16
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de un producto de PCR empleando la técnica SSCP-PCR.	17
Figura 12. Representación esquemática de los pasos que conforman la Secuenciación de Sanger.	18
Figura 13. Pretratamiento de las muestras de leche para la extracción de ADN a partir de las células somáticas.....	22
Figura 15. Curva estándar de las mezclas elaboradas con las muestras de referencia.	42
Figura 16. Gráfico de discriminación alélica de las mezclas de alelo A1 en alelo A2 con las muestras de referencia.	44
Figura 17. Curva de amplificación de la muestra genotipada A1A1.	47
Figura 18. Curva de amplificación de la muestra genotipada A1A2.	47

Figura 19. Curva de amplificación de la muestra genotipada A2A2.	48
Figura 20. Gráfico de discriminación alélica de las muestras de vacas genotipadas.	48

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: grados centígrados.

mL: mililitros.

μL: microlitros.

μM: micromol

nM: nanomol

fmol: femtomol

ΔG: variación de energía libre de Gibbs.

KJ: Kilojulios.

g: gramos.

ng: nanogramos.

rpm: revoluciones por minuto.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ANOVA: Análisis de la varianza (*Analysis of Variance*).

ARN: Ácido Ribonucleico.

BCM-7: β -casomorfina-7.

C: Citosina.

Conafe: Confederación Nacional de Asociaciones de Frisona Española.

Cq: Quantification Cycle.

CV: Coeficiente de variación (*Coefficient of Variation*).

ddNTP: dideoxinucleótido.

EDTA: Ácido Etilendiamino Tetraacético.

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

FRET: Transferencia de energía por resonancia Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*).

G: Guanina.

HLA-DR: Antígeno leucocitario humano (*Human Leukocyte Antigen-DR*).

HSD de Tukey: *Tukey's Honestly-significant-difference.*

IDT: Integrated DNA Technologies.

LOD: Límite de detección (*Limit of detection*).

LOQ: Límite de cuantificación (*Limit of quantification*).

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

qPCR: PCR cuantitativa.

RNAsa H: Ribonucleasa H.

SD: Desviación estándar.

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphosim*).

Tm: Temperatura de fusión (*Melting Temperature*).

UE: Unión Europea.

Wt: *Wild type.*

RESUMEN

La leche de vaca contiene principalmente dos tipos de β -caseína, la A1 y la A2. En los últimos años, se ha reportado la posible relación del genotipo A1 de la β -caseína y la intolerancia a la leche. Surge así la leche A2, que contiene solo β -caseína A2, como una alternativa en el sector lácteo.

En este contexto, el objetivo del trabajo fue desarrollar un método PCR en tiempo real (qPCR) basado en sondas para la detección de los alelos A1 y A2 del gen *CSN2* de la β -caseína.

En primer lugar, se comparó la idoneidad de 4 métodos de extracción de ADN a partir de las células somáticas de la leche, determinando que el más óptimo fue el kit *Nucleospin Tissue*.

Para la validación del método qPCR se emplearon tanto muestras de ADN de referencia como de ADN de animales genotipados. Se determinó que el límite de detección absoluto con las muestras de referencia era de 73 y 730 copias de ADN para el alelo A1 y el A2, respectivamente. En cuanto a las muestras genotipadas, fue de 30,4 y 60,8 copias para el alelo A2 y el A1, respectivamente. Por su parte, el límite de detección relativo fue del 5% y 10% en mezclas del alelo A1 en A2 en las muestras de referencia y en las genotipadas, respectivamente.

En conclusión, el método presenta buena sensibilidad y especificidad en la detección del alelo A1 y A2, lo que permitiría realizar el control de calidad de la leche A2 y verificar la ausencia de β -caseína de tipo A1.

Palabras clave: leche, bovino, β -caseína, alelo A1, alelo A2, qPCR, validación.

ABSTRACT

Cow's milk contains mainly two types of β -casein, A1 and A2. In recent years, a possible relationship between A1 genotype of β -casein and milk intolerance has been reported. Thus, A2 milk, which contains only β -casein A2, has emerged as an alternative in the dairy sector.

In this context, the aim of the work was to develop a probe-based real-time PCR (qPCR) method for the detection of the A1 and the A2 alleles of *CSN2* gene of β -casein.

Firstly, the suitability of 4 DNA extraction methods from milk somatic cells was compared, being the *Nucleospin Tissue* commercial kit the most optimum method.

Both reference DNA samples and genotyped animal DNA samples were used to validate the method. The absolute detection limit with the reference samples was determined to be 73 and 730 DNA copies/ μ l for the A1 allele and for the A2 allele, respectively. For the genotyped samples, it was 30.4 copies/ μ l for the A2 allele and 60.8 copies/ μ l for the A1 allele. The relative detection limit was 5% in mixtures of the A1 allele in A2 allele with reference samples, and 10% of the A1 allele in allele in the genotyped samples.

In conclusion, results indicated that the method offered good sensitivity and specificity in the detection of A1 and A2 alleles, and it would allow performing quality control of A2 milk and verifying the absence of A1-type β -casein.

Keywords: qPCR, milk, β -casein, A1 allele, A2 allele, bovine, validation.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Definición, producción y consumo de leche.

La leche es uno de los alimentos más antiguos consumidos por las personas. El consumo de leche se remonta al momento en el que el ser humano dejó de ser nómada y comenzó con la domesticación de ovejas y cabras. Sin embargo, no ocurrió hasta el siglo XX cuando Louis Pasteur consiguió desarrollar métodos efectivos para permitir su conservación, haciendo así que la industria de la leche se convirtiera en una de las más importantes del mundo (García, 2015).

Según la definición aportada por el Ministerio de Salud en el decreto 2437 emitido en agosto de 1983 en el Art 2 y Cap. 1, “La leche es el producto de la secreción de la glándula mamaria de animales bovinos sanos, obtenida por uno o varios ordeños, higiénicos, completos e ininterrumpidos”. Por su parte, el Real Decreto 1679/1994 del 22 de julio define a la leche cruda como “La leche producida por la secreción de la glándula mamaria de vacas, ovejas, cabras o búfalas, que no haya sido calentada a una temperatura superior a 40°C ni sometida a un tratamiento de efecto equivalente”. De esta manera, el primer Decreto solo hace referencia a la leche de vaca, mientras que este último, incluye también leche de otras especies.

Los principales destinos de la leche producida por las industrias lácteas de España se reflejan en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Destino de la leche (todas las clases de leche) en las industrias lácteas de España.

	Tipo de producto	Producción (en 1000 t)
Producto fresco	Leche de consumo	3504,5
	Nata	171,4
	Leches acidificadas	903,3
	Bebidas a base de leche	372,9
Producto fabricado	Leche concentrada	60,3
	Productos en polvo	54,7
	Mantequilla	46,6
	Queso	471,6
	Queso fundido	53,0
	Caseína y caseinatos	-
	Suero de leche	1895,7
Exportaciones de leche comunitarias		49,7

Fuente: adaptado de MAPA, (2020a).

Como se puede ver en la *Tabla 1*, la leche producida en España se dirige a producto fresco, producto fabricado o a exportaciones comunitarias. En este caso, los datos se refieren a todos los tipos de leche entre los que se incluyen leche de vaca, oveja, cabra y búfala, entre otras. Como producto fresco, la principal producción se destina para leche de consumo (3504,5

miles de t) y para leches acidificadas (903,3 miles de t). Mientras que, la leche como producto fabricado, se destina principalmente para la producción de suero de leche (1895,7 miles de t) y queso (471,6 miles de t).

El sector vacuno de leche constituye uno de los principales sectores ganaderos de la Unión Europea (UE) con un valor económico de 52.655 millones de euros en el año 2018 y una producción de alrededor de 156 millones de toneladas de leche. En el caso de España, el sector lácteo se configura como un sector estratégico, con un valor económico de 2.224 millones de euros en 2018 y un nivel de producción de 7 millones de toneladas (4,5% de la producción total de la UE). España ocupa el octavo puesto en el ranking comunitario por detrás de Alemania, Francia, Reino Unido, Países Bajos, Italia, Polonia e Irlanda (MAPA, 2020b).

En la *Figura 1* se muestra el ranking mundial de las regiones que mayor cantidad de leche líquida consumieron en el año 2019. Como se puede observar, la UE ocupa el segundo puesto con más de 33 millones de toneladas, por detrás de la India, que es el mayor consumidor de leche con aproximadamente 79 millones de toneladas (USDA, 2021).

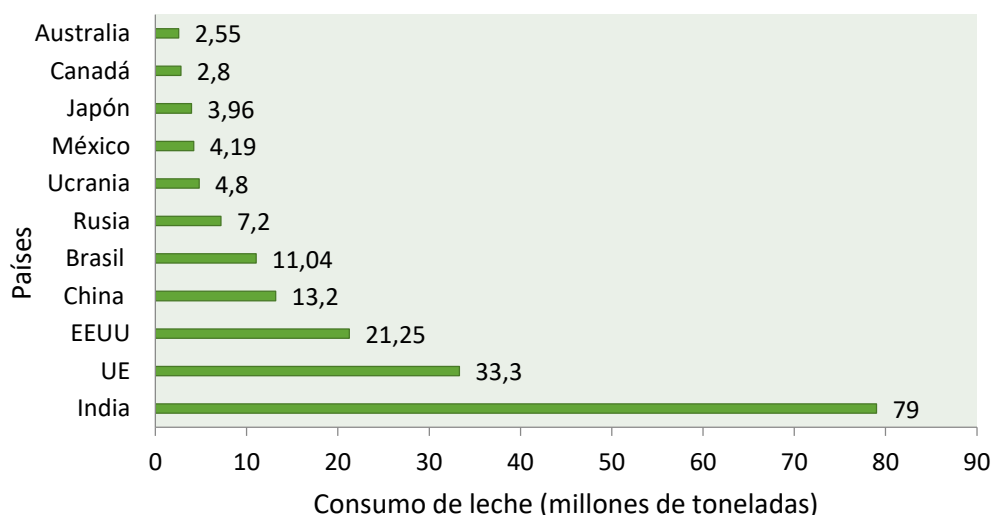


Figura 1. Principales países del mundo consumidores de leche líquida.

Fuente: adaptado de USDA (2021).

1.2. Composición de la leche de vaca

La leche de vaca proporciona nutrientes esenciales y es una importante fuente de energía. Permite obtener proteínas de alta calidad y grasas, además de micronutrientes como el calcio, el magnesio, el selenio y vitaminas como la riboflavina y la vitamina B12 (FAO, 2021). Asimismo, la leche de origen animal puede desempeñar un papel importante para las dietas de niños con baja ingesta de grasas y acceso limitado a otros alimentos de origen animal (FAO, 2021).

La composición química de la leche de vaca se puede resumir según se indica en la *Tabla 2*. Cabe destacar que las grasas constituyen alrededor del 3-4% del contenido sólido y la lactosa el 5%, aproximadamente (Agudelo and Bedoya, 2005; FAO, 2021). Por su parte, el contenido proteico de la leche es de alrededor del 3,5%. La leche de vaca aporta 18 de los 21 aminoácidos existentes para la nutrición humana y, además, proporciona aminoácidos esenciales que el ser humano no puede sintetizar y que debe ingerir a través de la alimentación (Hazard, 1997). Entre los aminoácidos esenciales se encuentran: la histidina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina, triptófano, metionina y lisina.

La leche bovina contiene principalmente dos tipos de proteínas: las caseínas (2,6%) y las proteínas del suero (0,6%). Las caseínas suponen el 80% del contenido proteico de la leche (Frister, 2007) y se dividen en 4 grupos principales: α -s1, α -s2, β y κ . Por su parte, las proteínas del suero se encuentran en una menor proporción, representando el 20% del contenido proteico de la leche y se dividen a su vez en 5 tipos: α -lactoglobulina, β -lactoglobulina, seroalbúmina, peptona e inmunoglobulina (García, 2015).

Tabla 2. Composición química de la leche de vaca.

Composición		Porcentaje
Sólidos totales (12%)	Proteínas	2,60%
	Caseínas	0,60%
	Proteínas del suero	3,40%
	Grasas	4,70%
	Lactosa	0,70%
Minerales	88%	
Agua (88%)		

Fuente: adaptado de Agudelo and Bedoya, 2005.

1.3. β -caseína en la leche de vaca

La β -caseína representa un 30% del total de la caseína bovina (Kamiński et al., 2007). Esta proteína consta de 209 aminoácidos y está codificada por el gen *CSN2*, el cual pertenece a un grupo de cuatro genes de la caseína (*CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* y *CSN3*), que se encuentra en el cromosoma 6 (Landi et al., 2011; Rijkels, 2002). Estos genes se localizan en un locus de 250 Kb, llamado *locus CN* y están organizadas en forma de cluster, como se puede observar en la *Figura 2*.

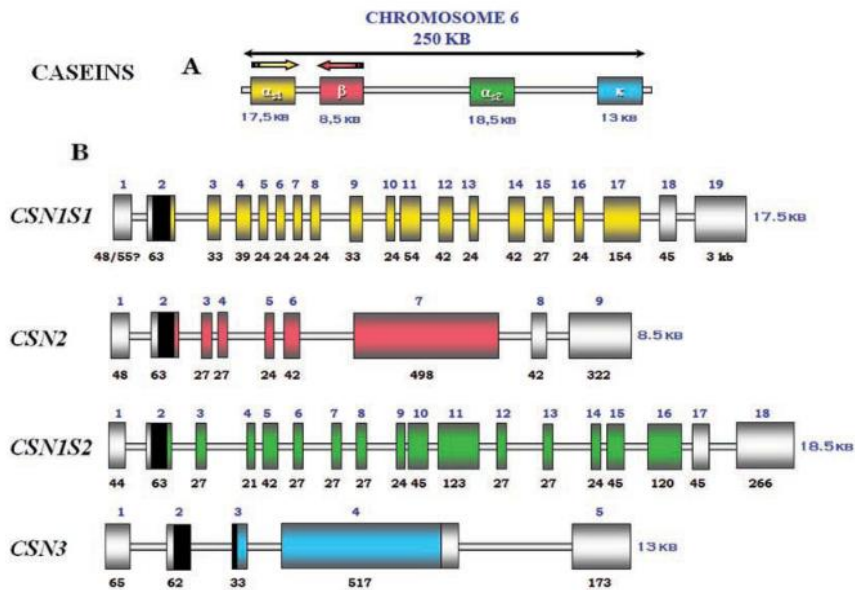


Figura 2. Composición estructural del *locus CN* conformado por los 4 genes codificantes de las caseínas: α_1 -caseína (*CSN1S1*), β -caseína (*CSN2*), α_2 -caseína (*CSN1S2*) y κ -caseína (*CSN3*). A) Organización genómica del locus de la caseína bovina. B) Organización estructural del cromosoma 6. Las barras abiertas representan los intrones; los exones se representan con recuadros grandes, grises (regiones no traducidas 5' y 3'), negros (parte del exón que codifica el péptido señal) y coloreados (exones y parte de exones que codifican proteínas maduras). El tamaño de los exones se indica, en pares de bases, debajo de cada exón.

Fuente: adaptado de Caroli et al. (2009).

Se han descrito al menos 12 variantes genéticas de la β -caseína: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I y G (Gallinat et al., 2013). La localización de las mismas dentro del gen *CSN2* y de la proteína se representan en la *Tabla 3*, tomando como referencia la secuencia del alelo A1.

Tabla 3. Polimorfismos del gen *CSN2* que codifican los diferentes tipos de β -caseína.

Gene, Protein	<i>CSN2</i> variant ²											
	A ¹	A ²	A ³	B	C	D	E	F	G	H ¹	H ²	I
4647-4648	AGC					?						
18	SerP					Lys						
6562	CGC									TGC		
25	Arg									Cys		
6684-6686	AGT				AGT							
35	SerP				Ser							
6687	GAG							AAG				
36	Glu							Lys				
6690	GAA				AAA							
37	Glu				Lys							
8101	CAT	CCT	CCT			CCT	CCT			?	CCT	CCT
67	His	Pro	Pro			Pro	Pro			?	Pro	Pro
8115	CAA										GAA	
72	Gln										Glu	
8163	CTT									ATT		
88	Leu									Ile		
8178	ATG										CTG	CTG
93	Met										Leu	Leu
8219	CAC		CAA									
106	His		Gln									
8267	AGC			AGG								
122	Ser			Arg								
8311-8314 ⁴												
137-138 ⁴	Pro											
8356	CCT											
152	Pro							CTT				
?? ⁵	??							Leu				
??	Gln										??	
											Glu	

Fuente: Caroli et al. (2009).

La presente tabla muestra los polimorfismos genéticos del gen *CSN2* que dan lugar a la diferente codificación aminoacídica y, con ello, a la aparición de cada una de las variantes

de la β -caseína. Dentro de las citadas variantes, los alelos A1 y A2 son las formas más comunes (Farrel et al., 2004). El alelo A2 se ha definido como la variante ancestral de la β -caseína, mientras que, la variante A1 de la β -caseína se originó como consecuencia de una mutación en un nucleótido (Ng-Kwai-Hang and Grousclade, 2002). Es por ello que el alelo A2 se encuentra comúnmente presente en la leche de muchos mamíferos como la humana, la ovina, la caprina y la bovina (*Bos taurus*) (Ng-Kwai-Hang and Grousclade, 2002). Es más, se ha descrito que la leche de otras especies como la de oveja, búfala y cabra o de las razas bovinas autóctonas de Asia y África (Brooke-Taylor, 2017) carecen del alelo A1 de la β -caseína o su presencia es muy extraña (De Noni et al., 2009; Pal et al., 2015; De Oliveira et al., 2021).

Entre las diferentes poblaciones del género bovino (*Bos*), el alelo A1 se encuentra presente en todas las razas de las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*, aunque la variante A2 es la predominante en la especie *Bos indicus* (Malarmathi et al., 2014). La especie *Bos grunniens* únicamente posee la variante A2 (Ng-Kwai-Hang and Grousclade, 2002).

Dentro de la especie *Bos taurus*, la raza *Holstein-Friesian* predomina en la mayoría de los sistemas especializados en la producción de leche, puesto que es una de las razas más productivas (Roca y González, 2012). En España, Alfonso et al. (2019) determinaron en una población de la raza *Holstein-Friesian* de Guipuzcoa, que la frecuencia del alelo A2 era de 0,55. Este último valor es superior al que se determinó en poblaciones *Holstein* de Canadá (Ng-Kwai-Hang et al., 1984) y Nueva Zelanda (Morris et al., 2005). Asimismo, en un estudio realizado por Sebastiani et al. (2020), se determinó que en la población *Holstein-Friesian* de Italia central, la frecuencia del alelo A2 era la mayoritaria con 0,6.

En los últimos años, la composición de la fracción proteica de la β -caseína se ha vuelto de especial relevancia, debido a la relación que puede existir entre el genotipo A1 de la β -caseína y la intolerancia a la leche. De forma tradicional, los problemas gastrointestinales asociados al consumo de leche que sufren las personas, se deben a la incapacidad del organismo para digerir la lactosa (intolerancia a la lactosa) (Rangel et al., 2016). Sin embargo, muchas personas que se consideran intolerantes a la lactosa, no presentan realmente este problema al ser analizadas mediante pruebas diagnósticas. En relación con esto, se han llevado a cabo diferentes investigaciones para determinar si estos problemas gastrointestinales se deben al tipo de β -caseína presente en la leche. En este sentido, algunos resultados obtenidos indicarían que el alelo A1 de la β -caseína podría contribuir al síndrome de intolerancia a la leche (Deth et al., 2016; He et al., 2017; Ho et al., 2014; Jianqin et al., 2016).

La diferencia entre las dos variantes más comunes de β -caseína, la A1 y A2, se debe al polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés *Single Nucleotide Polymorphosim*, SNP)

presente en el codón de la posición 67. La variante genética original A2 contiene el aminoácido prolina (CCT), mientras que en la variante A1, la prolina se sustituye por una histidina (CAT) debido a una mutación (Olènski et al., 2012; Asledottir et al., 2018). La mutación en la posición 67 conduce a un cambio conformacional en la estructura secundaria de la β -caseína, que hace que sea más fácilmente hidrolizable, debido a la débil unión entre histidina e isoleucina (Banerjee, 2018). La digestión proteolítica gastrointestinal de la variante A1 de la β -caseína conduciría a la formación del péptido bioactivo, β -casomorфина-7 (BCM-7) (Figura 3).

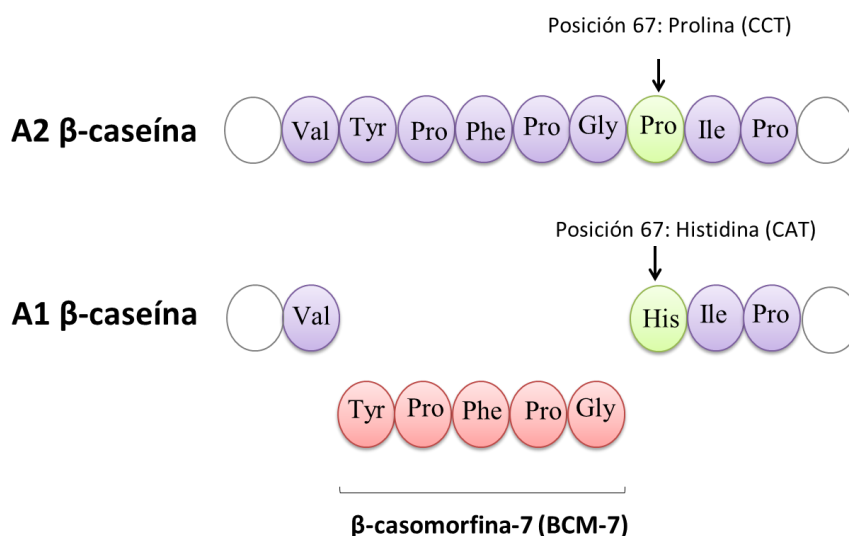


Figura 3. Representación de la secuencia de aminoácidos de la β -caseína A2 y A1, y la liberación de BCM-7 cuando la prolina es reemplazada por histidina en la posición 67.

Fuente: Asledottir et al. (2018)

La BCM-7 es un péptido de 7 aminoácidos al que se le atribuyen propiedades opioides. En una reciente revisión llevada a cabo por Daniloski et al. (2021), se han descrito tanto posibles efectos positivos como negativos sobre la salud humana con respecto a la liberación de este péptido, concluyéndose que se necesitan más estudios al respecto para poder llegar a una conclusión clara. Entre los efectos negativos, la BCM-7 se ha relacionado con trastornos digestivos y con alteraciones en funciones inmunológicas que conducen a problemas cardiovasculares, diabetes o autismo (Kaskous, 2020). Se debe tener en cuenta, que las variantes A3, D, E, H2 e I se comportan de la misma forma que la variante A2, no liberando el péptido BCM-7, y por ello se agrupan dentro de “los alelos del grupo A2”. Por otro lado, las variantes B, C, F, G, H1, al igual que la variante A1, se asocian con la liberación del péptido BCM-7 y se agrupan dentro de los “alelos del grupo A1” (Chessa et al., 2019).

Las posibles problemáticas asociadas al alelo A1 de la β -caseína se describen en el siguiente apartado de forma más detallada.

1.4. Posibles problemáticas asociadas al alelo A1 de la β -caseína

Se han publicado algunos trabajos en los que se indica que el consumo de leche tipo A1 podría estar relacionado con diferentes enfermedades en el ser humano, provocados principalmente por los efectos derivados de la liberación del péptido bioactivo BCM-7 durante la digestión proteica. Aunque no se sabe con certeza si el péptido BCM-7 tiene efectos positivos o negativos sobre la salud humana, en el presente apartado se van a describir algunos de los posibles efectos negativos que se han descrito.

La intolerancia a los productos lácteos es un trastorno gastrointestinal comúnmente notificado y se suele atribuir a la intolerancia a la lactosa (Brussow, 2013). Sin embargo, es posible que la intolerancia a los productos lácteos en algunos casos esté relacionada con el consumo de β -caseína A1 en lugar de lactosa *per se* (Pal et al., 2015).

Algunos autores han indicado que el consumo de leche que contiene β -caseína A1 podría provocar inflamación sistémica y motilidad gastrointestinal a través de la liberación de BCM-7 (Jianqin et al., 2016; He et al., 2017; Ho et al., 2014). He et al. (2017) indicaron que el consumo de leche A2 atenúa los síntomas gastrointestinales de intolerancia a la leche, mientras que el consumo de leche A1 reducía la actividad de la enzima lactasa y aumentaba los problemas gastrointestinales. Además, Ho et al. (2014) indicaron que el consumo de leche A1 se relacionaba con unos valores mayores en la consistencia de las heces (en la escala *Bristol Stool Scale*) en comparación con la leche A2. Asimismo, Jianqin et al. (2016) indicaron que el consumo de leche que contiene las variantes A1 y A2 se asociaba con síntomas de malestar digestivo significativamente mayores, concentraciones más altas del péptido BCM-7 y de biomarcadores relacionados con la inflamación, tránsitos intestinales más prolongados y niveles más bajos de ácidos grasos de cadena corta. Sin embargo, el consumo de leche que contenía solo alelo A2, no desencadenaba estos problemas digestivos.

Se han llevado a cabo también estudios en los que se ha estudiado la posible contribución de la variante A1 de la β -caseína en el desarrollo de la diabetes tipo I, sin embargo, no se ha llegado a una conclusión clara (Chia et al., 2018). La diabetes tipo I se produce por la destrucción de células β productoras de insulina en los islotes de Langerhans del páncreas, debido a procesos autoinmunes. Se ha visto así que los niños que presentan un genotipo específico de antígeno leucocitario (*Human Leukocyte Antigen-DR*, HLA-DR), junto con la incorporación de la leche de vaca en la dieta (con ambas variantes de β -caseína) a edades tempranas, pueden desencadenar un mayor riesgo de desarrollar autoinmunidad en los islotes y de desarrollar diabetes tipo I (Lamb et al., 2015). Del mismo modo, McLachlan (2001) indicó que el consumo de leche A1 se correlacionaba con una mayor incidencia de diabetes tipo I

entre los niños de 0-14 años. En general, se ha sugerido que el consumo de leche A1 durante la infancia podría aumentar el riesgo de desarrollar diabetes tipo I (Bekuma y Galmessa, 2019; Clemens, 2011; Laugesen y Elliot, 2003; McLachlan, 2001).

En otros estudios se ha visto la posible relación entre los péptidos exorfinas y el desarrollo de autismo (Cass et al., 2008; Reichelt and Knivsberg, 2003). El autismo es un grupo de trastornos del neurodesarrollo caracterizados por el déficit social y los comportamientos repetitivos (Kaskous, 2020). Las exorfinas son unos péptidos (entre los que se encuentra la BCM-7) que generan efectos opioides en el organismo. Las más estudiadas son las de la caseína y las del gluten. Estas exorfinas han sido localizadas en la orina de pacientes autistas y se ha indicado que podrían estar relacionados con los síntomas que sufren los pacientes con trastornos de autismo (Cass et al., 2008; Reichelt and Knivsberg, 2003). A pesar de estas afirmaciones, no existiría una relación clara entre la β -caseína A1 y el desarrollo de autismo y se necesitan más estudios y ensayos clínicos para llegar a una conclusión (Kaskous, 2020).

A pesar de que algunas publicaciones científicas describen los efectos adversos de la variante A1 de la β -caseína, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en 2009 (EFSA, 2009), argumentó que no existían evidencias científicas suficientes que relacionaran el consumo de leche A1, con un mayor riesgo de contraer dichas enfermedades. La realidad es que los ensayos clínicos realizados hasta la fecha son realmente escasos para afirmar que la leche A2 presenta mayor digestibilidad que la leche A1. Como indicó Kaskous (2020), es necesario realizar más investigaciones y ensayos clínicos para estudiar los beneficios de la leche que contiene solo alelo A2 con respecto a la convencional, además de determinar los posibles efectos adversos de la variante A1 de la β -caseína.

Sin embargo, la leche con β -caseína A2, la leche A2, está emergiendo como una alternativa en el sector lácteo y se empieza a considerar su comercialización, por lo que es necesario desarrollar métodos para llevar a cabo el control de calidad de la leche A2. Desde el año 2000, en los supermercados de Australia y Nueva Zelanda, se puede comprar leche A2 como un producto Premium, fabricada por la empresa neozelandesa *A2 Milk Company*. En el año 2006, la empresa ya comercializó su leche A2 en Asia y en el mercado de Estados Unidos (Kamiński et al., 2006). En España, 90 granjas gallegas se han unido y han creado la marca comercial "Deleite", la cual lleva trabajando ya varios años con el proceso de producción y comercialización de la leche A2. Asimismo, la Granja Armengol situada en la ciudad de Barcelona, se ha lanzado recientemente a la comercialización de este producto.

1.5. Métodos para la identificación de las variantes de la β -caseína en leche: técnicas de análisis de ADN.

1.5.1. PCR en tiempo real

La reacción en cadena polimerasa (PCR) es una técnica de alta especificidad y sensibilidad que permite la amplificación de un fragmento concreto de ADN millones de veces. Por su parte, la PCR cuantitativa (qPCR) o en tiempo real es una variación de la PCR convencional que permite amplificar y cuantificar de forma simultánea una molécula de ADN determinada.

La reacción enzimática se lleva a cabo en un termociclador mediante cambios de temperatura y una serie de ciclos que se repiten un determinado número de veces (según el programa de PCR diseñado de forma específica para amplificar el fragmento de interés).

Además de la cadena de ADN molde, son necesarios una serie de componentes para que la reacción enzimática tenga lugar (IDT, 2020):

La enzima ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción sintetizando las nuevas cadenas de ADN. Frecuentemente se emplea la enzima Taq polimerasa, un tipo de ADN polimerasa termoestable producida por la bacteria *Thermus aquaticus*.

Los cebadores son secuencias cortas de ADN que hibridan con el fragmento de ADN a amplificar y flanquean la región del ADN que será amplificada. Permiten que el ADN polimerasa inicie la síntesis de la nueva cadena. Para la reacción PCR se requieren dos: un cebador *forward* (que hibrida con el extremo 5' a 3' de la cadena de ADN) y un cebador *reverse* (que hibrida con el extremo 3' a 5' de la cadena de ADN).

Los dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatos) son los nucleótidos con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas. La concentración debe ser la adecuada para que la polimerasa actúe correctamente; normalmente se usan concentraciones de entre 0,2 a 1 mM (Tamay de Dios et al., 2013).

El buffer es la solución amortiguadora que se utiliza en la reacción y generalmente se compone de TrisHCl (pH=8).

El magnesio es un cofactor enzimático que en ocasiones viene incluido en el buffer y en otras es necesario agregar. Debe tener una concentración adecuada de en torno 0,5 a 2,5 mM para que no afecte al rendimiento de la Taq polimerasa (Tamay de Dios et al., 2013).

El agua es el disolvente en la reacción. Se emplea agua destilada libre de nucleasas (enzimas que degradan a los ácidos nucleicos).

A la reacción de amplificación se le incorpora una sustancia marcada con un fluorocromo. Este fluorocromo, excitado a la longitud de onda apropiada, produce una señal

que es detectado por los sensores del termociclador. La señal se detecta tras realizar cada ciclo de amplificación, es por ello, por lo que la técnica se denomina PCR en tiempo real. La sustancia con el fluorocromo incorporado se unirá de forma específica o inespecífica a las secuencias de ADN.

En las técnicas basadas en fluoróforos o fluorocromos inespecíficos, la generación exponencial de ADN de doble cadena se detecta utilizando un fluorocromo que se une inespecíficamente a la misma. Uno de los colorantes más empleados es la molécula llamada *SYBR Green*, que excitada mediante luz azul ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$) emite luz verde ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$) (Wittwer et al., 1997; Tamay de Dios et al., 2013). La principal desventaja de esta molécula es que se une a cualquier doble hebra de ADN incluyendo productos de reacción no específicos, pudiendo provocar una sobrestimación de la cantidad de ADN amplificada (Tamay de Dios et al., 2013). Es por ello que, cuando se emplean este tipo de sistemas, se debe analizar la especificidad de la reacción por medio del análisis de la curva de disociación o curva de melting que genera el termociclador (Figura 4) (Tamay de Dios et al., 2013). Este análisis se basa en la aplicación un gradiente de temperaturas creciente (desde 65 a 94°C) obteniéndose así la curva de melting, en la que se refleja la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar la temperatura de melting (T_m , temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizada) de los productos de PCR (Mercado y Vasquez, 2018). El valor del T_m es característico para cada secuencia ya que se establece en función de la composición y el tamaño de la molécula. Si la reacción qPCR es específica, solo debería aparecer un pico en la curva de melting, mientras que, si la reacción es inespecífica, habrá múltiples productos PCR, y con ello múltiples picos en la curva de melting (IDT, 2020).

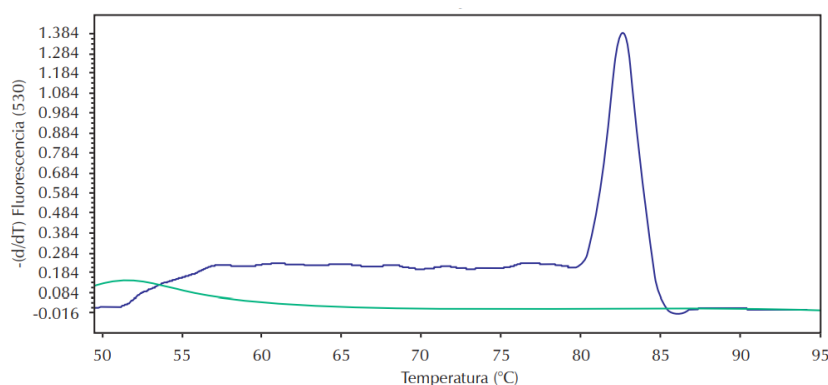


Figura 4. Curva de melting o curva de disociación.

El pico de amplificación (color azul) indica la especificidad de la reacción, es decir, que los fragmentos de ADN amplificados son del tamaño esperado. La línea de color verde corresponde al control negativo, el cual no amplifica.

Fuente: Tamay de Dios et al. (2013).

Los sistemas no específicos se emplean para detectar y cuantificar producto de PCR, sin embargo, no pueden ser utilizados para realizar una discriminación alélica, como es el caso de la discriminación entre las variantes de la β -caseína estudiado en este trabajo (Wittwer et al., 1997; Tamay de Dios et al., 2013).

Las sondas específicas son secuencias de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos que hibridan de forma específica con el fragmento a amplificar, en la zona entre el cebador directo (*forward*) y el inverso (*reverse*). La detección del ADN se realiza por fluorescencia siguiendo el principio *Förster Resonance Energy Transfer* (FRET), en el cual se transmite la energía de resonancia fluorescente desde un fluorocromo llamado donador “reporter” que emite energía, hasta otro denominado receptor “quencher” que absorbe la energía (Tamay de Dios, 2013). Algunos ejemplos de fluorocromos “reporter” son FAM, VIC y NED, mientras que entre los “quencher” se encuentran TAMRA, DABCYL y BHQ (Aguilera et al., 2014). La principal ventaja que presenta el uso de sondas es su alta especificidad y sensibilidad (Gudnason et al., 2007; Ruijter et al., 2014). Su alta especificidad admite incluso mezclar diferentes sondas en una única reacción, las denominadas qPCR multiplex, permitiendo a cada sonda detectar su secuencia diana en la cadena de ADN (Pabinger et al., 2014). Existen multitud de sondas, de las cuales se describirán las sondas Taqman y las sondas *Affinity Plus*, estas últimas empleadas en el presente trabajo.

Las **sondas Taqman** son sondas de hidrólisis que constan de un oligonucleótido específico de aproximadamente 20 pb que se une de forma específica a la secuencia de interés (Aguilera et al., 2004). Los dos fluorocromos en sus extremos 5' y 3' se encuentran espacialmente próximos antes de la unión a la secuencia de ADN, por lo que se produce el fenómeno FRET y se anula la fluorescencia. Sin embargo, cuando comienza la qPCR, la sonda se une a la secuencia de ADN y la enzima Taq polimerasa rompe la unión entre ambos fluorocromos, eliminándose el fenómeno FRET. El “quencher” se libera, emite fluorescencia y esta es captada por el detector (*Figura 5*) (Rodríguez, 2004). Cabe destacar que para la detección alélica de la β -caseína, Manga and Dvořák (2010) diseñaron una sonda Taqman para detectar el SNP rs43703011 del gen *CSN2*.

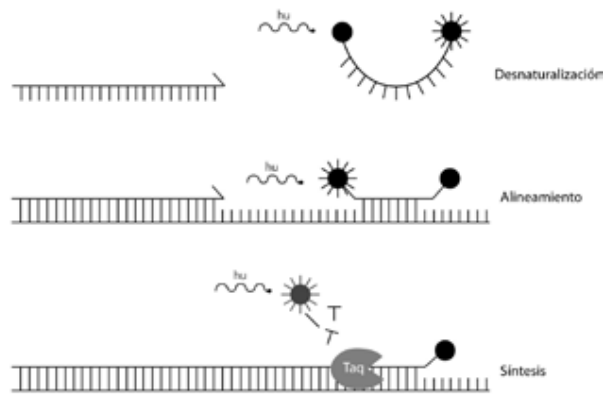


Figura 5. Representación gráfica del mecanismo de actuación de las sondas Taqman.

Fuente: Aguilera et al. (2014).

Las **Sondas Affinity plus** contienen oligonucleótidos bloqueados, que son monómeros de ARN modificados (IDT, 2021). La parte "bloqueada" proviene de un enlace de puente de metileno entre el oxígeno 2' con el carbono 4' del anillo de pentosa del ácido ribonucleico (ARN). Las sondas *Affinity Plus* incluyen hasta 6 monómeros de oligonucleótidos bloqueados, lo que les confiere una mayor estabilidad estructural, una mayor T_m (Figura 6), mayor especificidad de unión y mejor capacidad para detectar SNPs y la introducción de un nucleótido erróneo durante la copia de la hebra molde de ADN (del inglés *mismatch*) (IDT, 2021).

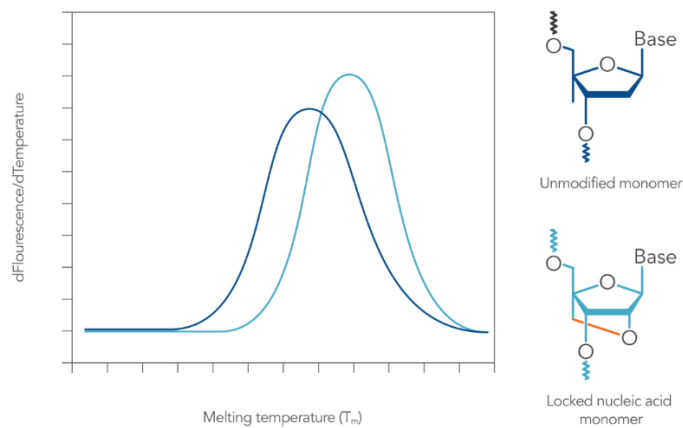


Figura 6. Incremento de la temperatura de melting de los nucleótidos bloqueados frente a los nucleótidos no modificados.

Fuente: IDT (2021).

Una vez finalizada la amplificación, el software del termociclador genera un gráfico de amplificación (Figura 7) que refleja la señal de fluorescencia frente al número de ciclos y que muestra el progreso de la reacción. En esta curva, se puede apreciar las diferentes etapas que conforman la cinética de la reacción: en la etapa inicial, no hay cambios significativos en la fluorescencia emitida y el ADN amplificado es indetectable. La siguiente etapa es la

exponencial y tiene lugar cuando se produce un incremento significativo de la fluorescencia y la cantidad de ADN supera el umbral definido. El ciclo de qPCR en el que la fluorescencia emitida supera el umbral definido, se define como *quantification Cycle* (Cq). Tras esta fase, tienen lugar la fase lineal, en la cual la eficiencia de amplificación es constante. Finalmente, se alcanza la fase estacionaria donde el producto obtenido no aumenta, aunque se aumente el número de ciclos (Aguilera et al., 2014).

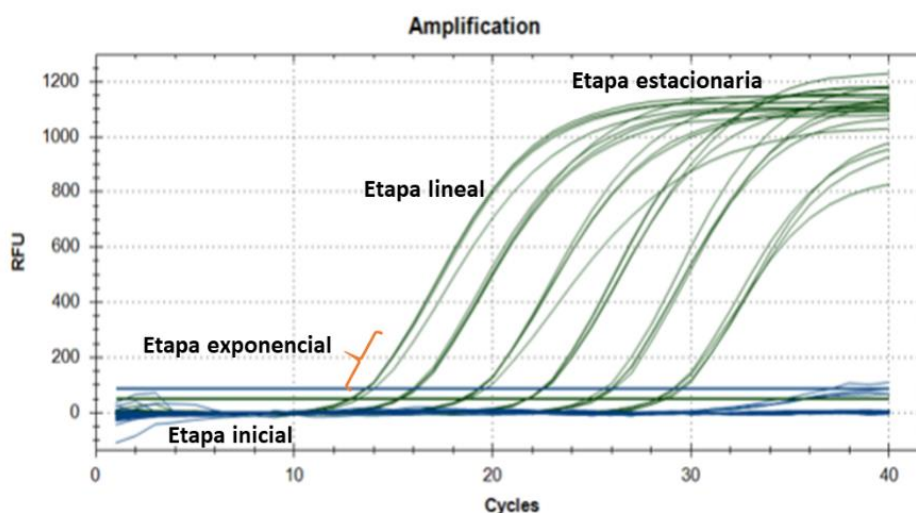


Figura 7. Curva de amplificación.

En el eje "Y" se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje "X" los ciclos de la reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN.

1.5.1.1. Modificaciones de la PCR en tiempo real

- **Análisis de curvas de melting de alta resolución (del inglés *High resolution melting analysis, HRMA*)**

El HRMA es un método que permite detectar polimorfismos mediante un análisis de las curvas de *melting* de los productos de qPCR (Figura 8). Este método presenta una resolución elevada y permite detectar SNPs en los productos de PCR, basándose en la T_m de los mismos. Se trata de un método de bajo coste que proporciona resultados de forma rápida, sin necesidad de realizar electroforesis posteriores (Carl et al., 2003). Para la monitorización de la T_m se pueden llevar dos estrategias: el uso de fluoróforos inespecíficos como *SYBR Green* o *EvaGreen* (Giglioti et al., 2020), o el uso de sondas específicas marcadas con fluorocromos complementarias a la región de interés.

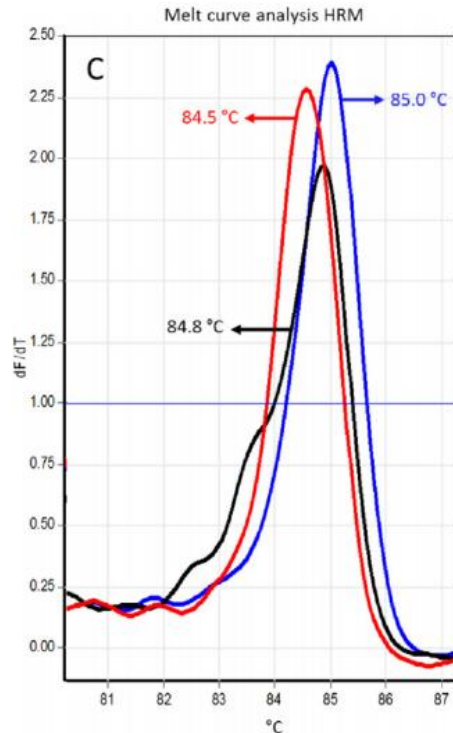


Figura 8. Análisis HRMA: curvas de melting derivadas: A1A1 homocigoto (línea roja), A1A2 heterocigoto (línea negra) y A2A2 homocigoto (línea azul).

Las diferencias entre los tres genotipos se discriminan por los cambios en los valores de T_m (°C).

Fuente: Giglioti et al. (2020).

- **PCR dependiente de RNasa H (del inglés *RNase H-dependent PCR*, rhAMP)**

El método rhAmp es una modificación de la técnica de qPCR estándar que utiliza una ribonucleasa H (RNasa H) para activar los cebadores tras haberse unido a sus secuencias diana, reduciendo así el número de dímeros de cebadores (del inglés *primer-dimer*) formados y mejorando la especificidad de la reacción (Dobosy et al., 2011). Giglioti et al. (2020) realizaron un ensayo rhAmp en el que la discriminación entre los alelos A1 y A2 se consiguió mediante la unión competitiva de dos cebadores *forward*, uno marcado con el fluorocromo FAM y el otro con el fluorocromo YY. El canal verde (FAM) permitió detectar el alelo A2, es decir, el alelo ancestral (del inglés *wild type*, *wt*), mientras que el canal amarillo (YY) detectó el alelo A1, es decir, el alelo mutante. Las señales de ambos fluorocromos permitieron detectar los heterocigotos A1A2.

1.5.2. Otras técnicas de análisis de ADN.

- **PCR específica para el alelo (del inglés *Allele Specific-PCR, AS-PCR*).**

Keating et al. (2008) describieron la AS-PCR para la detección de SNPs y mutaciones. La amplificación selectiva de los alelos se consigue mediante el diseño de un cebador, de forma que su extremo 3' coincida o no con la base del alelo. El fragmento de ADN a amplificar se extenderá solo cuando el extremo 3' del cebador sea complementario al alelo presente en el ADN. Los resultados pueden observarse mediante la presencia o ausencia de productos de PCR, como se puede observar en el ejemplo de la *Figura 9*. Para llevar a cabo esta técnica se emplea un cebador *forward* común y cebadores *reverse* con T o G en el extremo 3'.

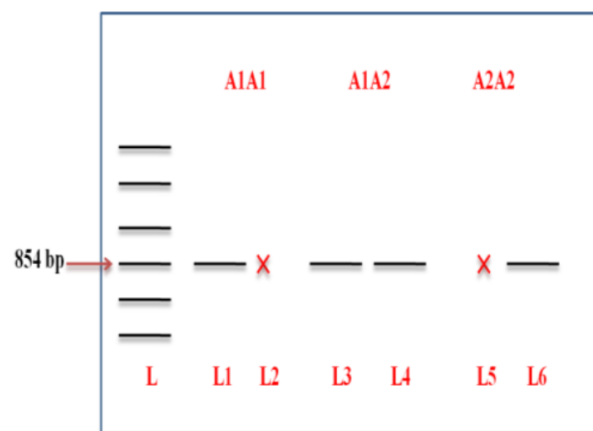


Figura 9. Electroforesis en gel de un producto de PCR de 854 pb empleando la técnica AS-PCR. La L indica el marcador de peso molecular, L1L2 hace referencia al genotipo A1A1 del animal, L3L4 indica el genotipo A1A2 y L5L6 indica el genotipo A2A2 del animal (X indica la ausencia de banda).

Fuente: Parashar and Saini (2015).

- **Sitios de restricción creados durante la amplificación (del inglés *Amplification created restriction site-PCR, ACRS-PCR*).**

El método ACRS-PCR se basa en el diseño de cebadores que crean sitios de restricción específicos en el producto de la PCR. La secuencia del cebador *forward* es idéntica a la secuencia del fragmento a amplificar, sin embargo, en el caso del cebador *reverse*, la penúltima base del extremo 3' no es capaz de formar un enlace de hidrógeno con la base complementaria en la secuencia del gen a amplificar, dando lugar a un *missmatch* (Raies et al., 2012). Parashar and Saini (2015) estudiaron el método ACRS-PCR para la identificación de las variantes de la β -caseína. Debido a la diferencia en una base entre la β -caseína A1 y A2, el *missmatch* da lugar a un sitio de restricción en la variante A2, pero no en la A1. El sitio de restricción es reconocido por una endonucleasa específica que corta el ADN del genotipo A2A2 en dos partes (*Figura 10*).

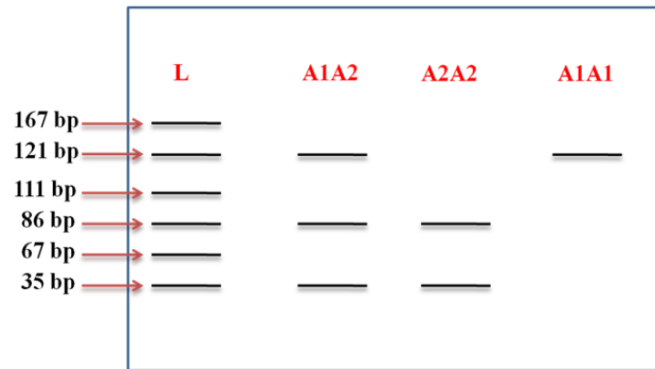


Figura 10. Electroforesis en gel de un producto de PCR de 121 pb empleando la técnica ACSR-PCR.

La L indica el marcador de peso molecular, el genotipo A2A2 aparece con 2 bandas (86 pb y 35 pb), el genotipo A1A1 con una banda (121 pb) y el genotipo A1A2 con 3 bandas (121 pb, 86 pb y 35 pb).

Fuente: Parashar and Saini (2015).

Por otro lado, Lien et al. (1992) pudieron identificar con esta técnica los alelos A1, A2, A3 y B del gen de la β -caseína. Además, Olènski et al. (2012) emplearon esta técnica para realizar la discriminación alélica del polimorfismo A1/A2 creando un sitio de restricción para la enzima Mph1103 I. El principal inconveniente de esta técnica es que se requieren enzimas de restricción y es prolongado en el tiempo.

- **Fragmentos de longitud discrepante con especificidad alélica y marcados con fluorescencia (del inglés *Fragment length discrepant allele specific fluorescence labeled multi-PCR, FLDASFLM-PCR*)**

Esta técnica se basa en el principio de especificidad alélica de la qPCR. Se diseñan una pareja de cebadores *forward* de diferente longitud para cada uno de los SNPs. Los extremos 3' de estos cebadores deben coincidir con cada uno de los dos alelos, respectivamente. En cuanto al cebador *reverse*, se emplea uno común a aproximadamente 100-300 pb del cebador *forward*, marcado con fluorescencia (Wang et al., 2008). El principal inconveniente de esta técnica es el elevado coste que implica realizar el marcaje de los cebadores (Wang et al., 2008).

- **Polimorfismo en la longitud de un fragmento de restricción (del inglés *Restriction Frangment Length Polymorphism, RFLP-PCR*)**

En el método llamado RFLP-PCR, el producto de PCR amplificado se digiere con enzimas de restricción. En función de la secuencia alélica del producto de PCR, las enzimas de restricción generarán más o menos cortes, que originarán como resultado diferentes patrones.

Por ejemplo, Miluchová et al. (2014) emplearon la enzima de restricción Ddel para digerir el producto de PCR de 121 pb del gen CSN2. El alelo A1 generó un fragmento de 121 pb, y el alelo A2 generó unos fragmentos de 86 pb y 35 pb.

- **Polimorfismo de conformación de cadenas individuales (del inglés *Single stranded conformation polymorphism PCR, SSCP-PCR*)**

En la técnica SSCP-PCR, los productos de PCR son desnaturalizados en cadenas individuales de ADN y posteriormente se someten a una electroforesis en gel de poliacrilamida (Barroso et al., 1999), donde pequeñas variaciones en la hebra de ADN (con frecuencia SNPs) son detectadas debido a que presentan estructuras secundarias y movilidad diferente a través del gel (*Figura 11*). El screening SSCP permite detectar la presencia de una mutación, pero es necesario realizar una secuenciación de ADN para conocer la naturaleza de la mutación (A1A1, A2A2 o A1A2). Barroso et al. (1999), optimizaron esta técnica para examinar las variantes más frecuentes (A1, A2, A3 y B) del gen de la β -caseína bovina. Para ello, 5 productos de PCR parcialmente superpuestos (233, 234, 265, 466 y 498 pb) del exón VII del gen de la β -caseína se desnaturalizaron por calor, se renaturalizaron en cadenas individuales de ADN y se separaron en geles de poliacrilamida al 17%.



Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de un producto de PCR empleando la técnica SSCP-PCR.

Fuente: Parashar and Saini (2015).

- **Secuenciación de Sanger**

La secuenciación de Sanger se basa en el empleo de dideoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) que carecen del grupo OH del carbono 3', de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento, se detiene la elongación de la misma. Esto ocurre porque la ADN polimerasa requiere de un grupo 3'OH libre para incorporar el siguiente nucleótido y el ddNTP incorporado carece de este grupo 3'OH libre.

Se preparan 4 reacciones, cada una con la hebra de ADN molde que se desea secuenciar, el cebador, el ADN polimerasa, los nucleótidos y, a cada uno de ellos también se añade un tipo de dideoxinucleótido: ddATP, ddGTP, ddCTP o ddTTP marcado con un tipo de fluoróforo distinto. En cada uno de las 4 reacciones se obtendrán cadenas de ADN de distintas longitudes, las cuales terminarán en el lugar donde se incorporó el ddNTP. A continuación, estos productos se someten a una electroforesis capilar (Tsiatis et al., 2010). Cada fragmento avanzará por el gel a través de un tubo capilar. Los fragmentos más cortos migrarán más

rápido, mientras que los más largos migrarán más lentamente. Cuando dicho fragmento pasa a través de la cámara detectora, el fluoróforo es excitado con un láser, emitiendo una fluorescencia de un color determinado. Los datos obtenidos por el detector son una serie de picos con una intensidad según la fluorescencia emitida (un cromatograma). La determinación del color permite asignar el nombre de la base correspondiente y el orden de las emisiones revela la secuencia del ADN (*ver Figura 12*). Se han llevado a cabo análisis de los alelos de la β -caseína mediante la secuenciación completa del gen *CSN2*. Dai et al. (2016) llevaron a cabo esta técnica en vacas *Holstein* de China, detectándose 4 polimorfismos en el exón 7 del gen y 5 variantes de β -caseína (A1, A2, A3, B e I).

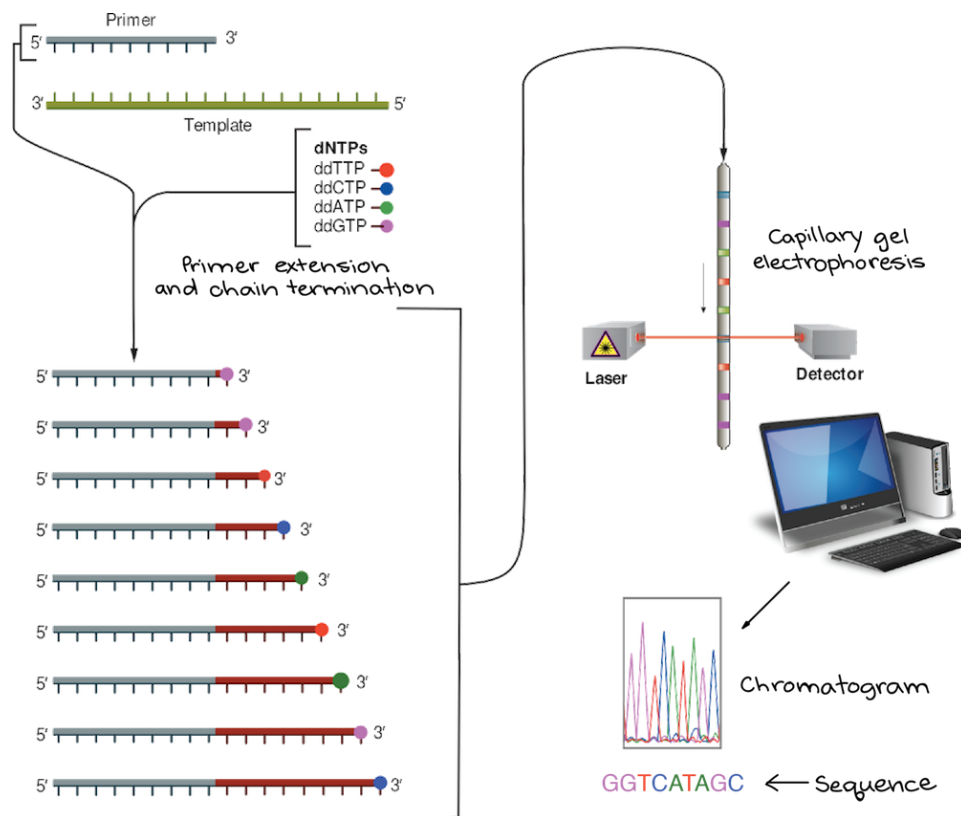


Figura 12. Representación esquemática de los pasos que conforman la Secuenciación de Sanger.

Fuente: adaptado de Rye et al. (2015).

- **Secuenciación de nueva generación (SNP-Chip Assay)**

Los chips de ADN permiten realizar el genotipado simultáneo de miles de SNPs y su análisis aporta información adicional de caracteres económicamente importantes para la producción bovina relacionados con la producción lechera, reproducción, crecimiento o calidad de la carne (Mullen et al., 2013). Además, los resultados obtenidos son altamente fiables, debido a su lectura automatizada y a la posibilidad de comparar resultados entre laboratorios (Mullen et al., 2013).

Para realizar la selección genómica de la raza *Holstein-Friesian* se pueden emplear un chip de ADN. Con este objetivo, el consorcio europeo *Eurogenomics*, del cual es socia la Confederación Nacional de Asociaciones de Frisona Española (Conafe), diseñó el chip Euro GMD para caracterizar millones de razas importantes en Europa. Este chip contiene 45.000 marcadores, los cuales están relacionados con el mérito genético de los animales y se emplean en las evaluaciones genómicas nacionales en diferentes razas en cada país. Además, incluyen marcadores para la verificación de parentesco, así como marcadores de variantes genéticas relacionadas con caracteres de interés como las proteínas lácteas o enfermedades genéticas (Sanchez et al., 2020). Este chip fue empleado para conocer el genotipo de los animales empleados como material de partida para el análisis en el presente trabajo.

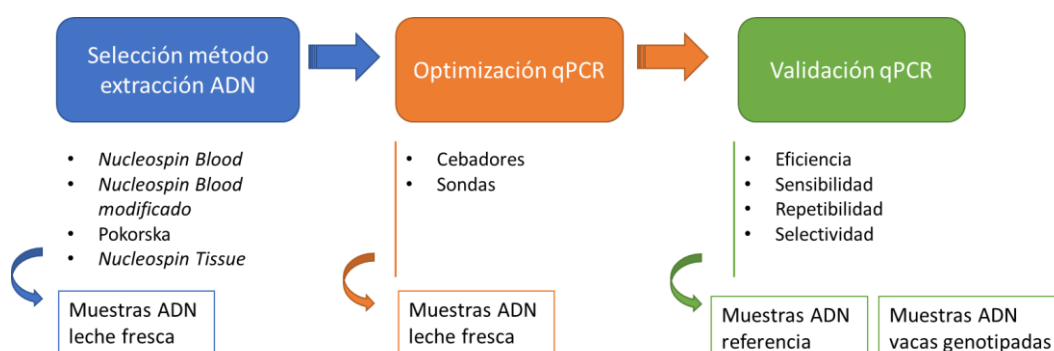
2. OBJETIVOS

El **objetivo general** del presente trabajo es la puesta a punto de un método rápido y de alta especificidad basado en la qPCR para la detección de las dos principales variantes alélicas, A1 y A2, del gen de la β -caseína. Para ello, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

- Recogida de muestras de leche de vacas de genotipo conocido (A1A1, A2A2, A1A2) en granja y de muestras de leche fresca.
- Selección del método más idóneo de extracción de ADN a partir de las células somáticas de la leche.
- Diseño de los cebadores y sondas *Affinity Plus* para la amplificación e identificación de los polimorfismos A1/A2 de la β -caseína.
- Optimización de la concentración de cebadores y sondas del método qPCR.
- Validación de la metodología qPCR en base a la eficiencia, sensibilidad, repetibilidad y selectividad.

En cuanto a los objetivos a largo plazo, teniendo en cuenta que la leche con β -caseína A2 está emergiendo como una alternativa en el sector lácteo y se empieza a considerar su comercialización como producto diferenciado, el método desarrollado podría ser empleado en el control de calidad de la leche A2 y verificar la ausencia de β -caseína de tipo A1 con una alta sensibilidad. Además, este método podría ser utilizado en la selección de animales con la variante A2 del gen de la β -caseína para producir leche tipo A2 como alternativa a otros métodos como los chips de genotipado.

El diseño experimental llevado a cabo en el trabajo se muestra en el siguiente esquema:



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Extracción de ADN a partir de células somáticas de leche.

3.1.1. Obtención de las muestras de leche.

Por un lado, se emplearon muestras de leche de vacas individuales con genotipo conocido para la β -caseína (número de crotal 8203: A1A1; 242 y 8251: A2A2 y 8189: A1A2), que fueron suministradas por la granja “S.A.T Etxeberria” perteneciente al grupo “Lacturale” y situada en la localidad Etxeberri en la región norte de Navarra. Estas vacas fueron genotipadas mediante el chip de ADN EuroG MD dentro del proyecto ABIESNEA (210190016) del Programa de Desarrollo Rural de Navarra 2014-2020.

Por otro lado, las muestras de leche de tanque fueron obtenidas a partir de leche fresca comercial.

3.1.2. Cálculo del tamaño muestral.

Para llevar a cabo la selección del método óptimo de extracción de ADN se compararon 4 métodos. Para ello, en primer lugar, fue necesario calcular el número de muestras de leche de tanque necesarias para que el análisis estadístico fuera representativo. La variable a tener en cuenta para el cálculo del tamaño muestral fue la calidad de ADN. La pureza de la muestra se determinó midiendo la relación de absorbancias $_{260/280}$ ($A_{260/280}$) mediante espectrofotometría. Para el análisis se empleó la herramienta *pwr.t.test* del paquete estadístico R y se seleccionó una distribución t-student a dos colas, donde se estableció un nivel de significación del 5%, una potencia del 70% y una diferencia a detectar en la variable $A_{260/280}$ de 0,2. Según la bibliografía analizada, la desviación estándar (SD) de los métodos de extracción a partir de células somáticas de leche se encuentra en torno a 0,1 (Pokorska et al., 2016), 0,2 (Usman et al., 2014) o 0,3 (Wassermann et al., 2020). Se seleccionó un SD de 0,2.

Con estas condiciones, se determinó que el tamaño muestral para el análisis del método más óptimo de extracción era de 14 muestras.

3.1.3. Pretratamiento de las muestras de leche.

Antes de realizar la extracción del ADN, en todos los métodos fue necesario un pretratamiento previo de las muestras de leche para favorecer la eliminación de la grasa y proteínas que pudieran afectar al aislamiento del ADN (Usman et al., 2014). El pretratamiento seleccionado fue el desarrollado por Yap et al. (2020). Como se observa en la *Figura 13*, en el pretratamiento se mezclaron los pellets de las muestras de leche dos a dos, tras realizar la

primera centrifugación, por lo que, en lugar de partir de 14 muestras de leche, se necesitaron 28 muestras de leche (2 x 10mL).

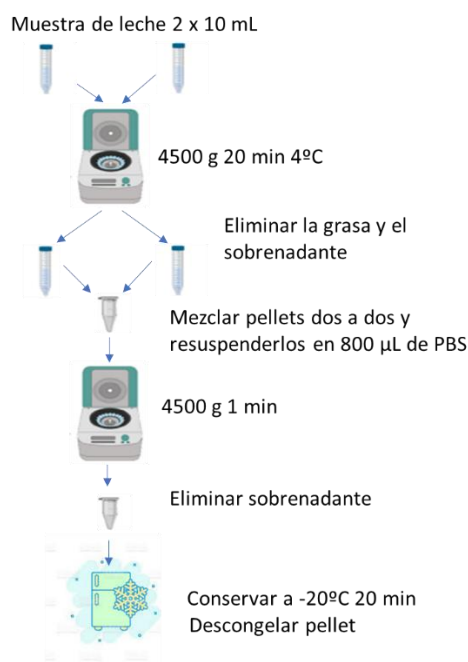


Figura 13. Pretratamiento de las muestras de leche para la extracción de ADN a partir de las células somáticas.

Fuente: modificado de Yap et al. (2020).

Las muestras de leche de 2 x 10 mL fueron centrifugadas a 6682 rpm y 4°C durante 20 minutos. Posteriormente, el exceso de nata de la parte superior fue eliminado con una espátula estéril, así como el sobrenadante, conservando únicamente el pellet de la parte inferior. A continuación, los pellets se juntaron dos a dos en nuevos tubos tipo eppendorf de 2 mL y se añadió 800 µL de tampón PBS (1X, pH 7.4). Tras ello, se realizó una centrifugación a 6682 rpm durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS. Se repitió este último centrifugado y lavado. Teniendo en cuenta lo descrito por Wassermann et al. (2020), el pellet resultante se congeló a -20°C durante 20 minutos, ya que indicaron una mejoría en los valores de C_q en la amplificación por qPCR de las muestras de ADN. Finalmente, se descongeló el pellet, quedando así disponible la muestra para comenzar con la extracción del ADN.

3.1.4. Métodos de extracción del ADN a partir de células somáticas de la leche.

Tras el pretratamiento detallado en el apartado previo, cada una de los pellets de las muestras de leche se procesaron según 4 metodologías distintas. Estos métodos han sido utilizados previamente por otros autores para la extracción de ADN a partir de las células somáticas de la leche (Usman et al., 2014; Pokorska et al., 2016; Psifidi et al., 2010).

- **Método 1: kit comercial *Nucleospin tissue*.**

La extracción de ADN de las células somáticas de la leche se realizó utilizando el kit comercial *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel) (Psifidi et al., 2010), siguiendo el protocolo del fabricante que se describe a continuación: el pellet precipitado obtenido tras el pretratamiento se resuspendió en 180 μL de buffer T1. Se añadieron 25 μL de Proteinasa K, se agitó con el vórtex y se incubó a 56 °C durante 2 horas. Tras la incubación, se agitaron las muestras en el vórtex, se añadieron 200 μL de buffer de lisis B3 y se incubaron las muestras a 70°C durante 10 minutos. Tras ello, para ajustar las condiciones de unión del ADN, se añadieron 210 μL de etanol frío (96-100%) y se agitaron vigorosamente las muestras. A continuación, se añadió la muestra a las columnas *Nucleospin Tissue* del kit, se centrifugaron 1 minuto a 11000 g y se descartó el eluido. El objetivo de este paso es que el ADN se uniera a la membrana de sílice de la columna y se eliminaran el resto de componentes que no son de interés. Para ello, se realizó un primer lavado con 500 μL de Buffer BW, se volvió a centrifugar y se descartó el eluido. Se realizó un segundo lavado de la membrana de sílice con 600 μL de Buffer B5 con etanol y se volvió a centrifugar a 11000 g durante 1 minuto. Este último lavado se realizó por duplicado. Para secar la membrana de sílice y eliminar el etanol residual de la misma, se centrifugó la columna a 11000 g durante 1 minuto. Finalmente, una vez eliminados todos los residuos, se procedió a eluir el ADN de la membrana de sílice a un tubo microcentrífuga de 1,5 mL. Para ello, se emplearon 50 μL de Buffer de elución BE (precalentado a 70°C), se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó 1 minuto a 11000 g. Cada tubo microcentrífuga de 1,5 ml debería contener aproximadamente 50 μL de ADN extraído.

- **Método 2: kit comercial *Nucleospin blood*.**

La extracción de ADN de las células somáticas de la leche se realizó utilizando el kit comercial *NucleoSpin Blood* (Macherey-Nagel) (Psifidi et al., 2010), siguiendo el protocolo del fabricante que se describe a continuación: el pellet precipitado obtenido tras el pretratamiento fue resuspendió en 25 μL de Proteinasa K y 175 μL de PBS, ya que el volumen final tenía que estar ajustado a 200 μL . La mezcla se agitó en vórtex, se añadieron 200 μL de Buffer de lisis B3 y las muestras se incubaron a 70°C durante 30 minutos. El resto del protocolo continua tal y como se describe para el protocolo del kit *Nucleospin Tissue*. La principal diferencia de este último con respecto a este protocolo, es, por tanto, que no se añade Buffer B1 y que el tiempo requerido para la realización del protocolo desciende significativamente.

- **Método 3: kit comercial *Nucleospin blood* modificado.**

La extracción de ADN de las células somáticas de la leche se realizó utilizando el kit comercial *NucleoSpin Blood* (Macherey-Nagel), pero el protocolo fue modificado con

respecto al planteado por el fabricante de acuerdo con lo descrito en Usman et al. (2014). La variación en el protocolo se realizó durante la etapa de elución del ADN de la membrana de sílice. Se añadieron de igual forma 50 μ L de Buffer de elución BE (precalentado a 70°C), pero en este caso, en lugar de incubarse durante 1 minuto, la incubación a temperatura ambiente se realizó durante 5 minutos. Este paso permitió que el ADN de la membrana se disolviera correctamente en el Buffer BE. A continuación, se centrifugó durante 2 minutos (en lugar de 1 minuto) a 11000 g y el volumen eluido se volvió a colocar sobre la membrana de sílice de la columna para asegurar que la totalidad del ADN de la membrana de sílice pasara al tubo de microcentrífuga. Finalmente, se centrifugó de nuevo y se obtuvieron 50 μ L de ADN extraído.

- **Método 4: desarrollado por Pokorska et al. (2016).**

Se trata de un método de extracción de ADN a partir de las células somáticas de la leche que ha sido desarrollado por Pokorska et al. (2016).

Cabe mencionar que no se empleó el pretratamiento de las muestras planteado por Pokorska et al. (2016), sino que se utilizó el mismo pretratamiento que en los métodos anteriores, el pretratamiento según Yap et al. (2020). Los pellets obtenidos del pretratamiento se procesaron de acuerdo al siguiente protocolo: se lavaron con 1 mL de buffer de lavado (15 mM TrisHCl, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 15 mM NaH₂PO₄, 2,5 mM EDTA, 1% sacarosa; pH 7,4-7,6). A continuación, los tubos microcentrífuga se centrifugaron a 5000 g durante 3 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante. Se repitió el lavado con este mismo buffer hasta que el sobrenadante presentó un color claro, que indicaba que el pellet ya estaba limpio de residuos. Tras ello, se añadió 1 mL de buffer de lisis (15 mM TrisHCl, 6% SDS, 3 mM MgCl₂, 0,5% DMSO, 6% acetona; pH 8,8) y se incubó la mezcla a 65°C durante 20-30 minutos. La muestra se transfirió a un tubo nuevo de 1,5 mL, se lavó con 100 μ L de etanol 70% frío (para ayudar a la precipitación del ADN) y se centrifugó a 1000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, el pellet de ADN resultante se resuspendió en 50 μ L de Buffer TE.

3.2. Selección de cebadores, sondas y controles para la qPCR.

3.2.1. Diseño de cebadores.

Los cebadores fueron diseñados en base a una región del gen *CSN2* que codifica para la β -caseína bovina (*Bos Taurus* β -casein GenBank: X14711.1) que contenía el polimorfismo A1 (GenBank: MK426695.1) y el polimorfismo A2 (GenBank: MK426696.1). Para ello, se empleó la herramienta *PrimerQuest Tool* de IDT ([PrimerQuest - design qPCR assays | IDT \(IDTADN.com\)](https://www.idtdna.com/PrimerQuest)). De todas las combinaciones posibles de cebadores IDT, se seleccionó la combinación óptima

para garantizar un alto grado de especificidad y eficiencia de los mismos en la qPCR. Los parámetros que se tuvieron en cuenta para su diseño fueron los siguientes:

- El tamaño del fragmento amplificado debe ser de 50-100 pb para ensayos en los que se empleen sondas específicas.
- La extensión óptima de los cebadores debe ser de 15-20 pb. La relación de nucleótidos guanina (G) y citosina (C) (relación G/C) debe situarse entre el 20-80%.
- La Tm debe encontrarse en un intervalo entre 68-70°C.
- Las amplificaciones inespecíficas se minimizan empleando cebadores que únicamente tengan 1 o 2 G/Cs en los últimos 5 oligonucleótidos del extremo 3' (Arya et al., 200).
- Se debe evitar la formación dímeros entre cebadores (*primer-dimer*), ya que esto afecta de forma muy negativa a la amplificación del fragmento de interés (Chuang et al., 2013).

En base a estas especificaciones, los cebadores seleccionados fueron los que se reflejan en la *Tabla 4*. Estos cebadores amplificaron una región de 74 pb que contiene los polimorfismos A1/A2 (*Tabla5*).

Tabla 4. Secuencias de los cebadores forward y reverse.

Nombre del gen	Forward (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
CSN2	CAGTCTCTAGTCTATCCCTTCC	74
	Reverse (5'-3') GTTTGAGTAAGAGGAGGGATGT	

Tabla 5. Región amplificada del gen CSN2 con los polimorfismos A1/A2.

Fragmento de 74 pb con el alelo A1 del gen CSN2 de la β-caseína <i>Bos Taurus</i> (GenBank: MK426695.1)
CAGTCTCTAGTCTATCCCTTCC CTGGGCCAT CCA TAACAGCCTCCACAAA ACATCCCTCCTTACTCAAAC
Fragmento de 74 pb con el alelo A2 del gen CSN2 de la β-caseína <i>Bos Taurus</i> (GenBank: MK426696.1)
CAGTCTCTAGTCTATCCCTTCC CTGGGCCAT CCA TAACAGCCTCCACAAA ACATCCCTCCTTACTCAAAC

3.2.2. Selección de sondas

Las sondas específicas para detectar el polimorfismo A1/A2 fueron diseñadas y sintetizadas directamente por parte del fabricante *Integrated DNA Technologies (IDT)* (*Tabla 6*). Se trata de las **sondas Affinity Plus**. La principal característica que presentan es su incremento en la Tm y en su estabilidad y especificidad, gracias a la presencia de carbonos metilados entre el oxígeno 2' y el carbono 4' de las pentosas del ARN.

Tabla 6. Secuencias de las sondas Affinity Plus diseñadas para detectar el polimorfismo A1/A2 del gen *CSN2*.

Sonda A2	/56-FAM/CC+A+TC+C+C+T+AA+CA/3IABkFQ/
Sonda A1	/5HEX/CC+A+TC+C+A+T+AA+C+AG/3IABkFQ/

La sonda A1 se encuentra marcada con el fluoróforo FAM y la sonda A2 con el fluoróforo HEX.

Para comprobar el correcto funcionamiento y diseño de los cebadores y sondas, se realizó un análisis *in silico* mediante la herramienta *IDT Oligo Analyzer*. Se comprobó el contenido en GC, la T_m y la posible formación de estructuras secundarias de no interés. Entre las estructuras secundarias se analizó la posible formación de horquillas, autohibridación (entre la propia secuencia del cebador) o de *primer-dimer* (entre los cebadores forward y reverse). Como en ninguno de los casos, la energía libre de Gibbs (ΔG) fue menor a -9KJ, todos los procesos fueron termodinámicamente desfavorables (>-9KJ), y estos cebadores no tienden a formar estructuras secundarias.

3.2.3. Selección de las muestras de referencia: controles comerciales (*IDT*).

Las muestras de referencia fueron sintetizadas por la empresa *IDT* y contenían la región de ADN de interés del gen *CSN2* con el polimorfismo A1 y A2 (control A1 y A2, respectivamente). Estas muestras de referencia se emplearon para la validación del método, previniendo así la aparición de falsos positivos en los resultados.

Las secuencias de las muestras de referencia se muestran a continuación:

Control A2: CD.GT.QWDC2715.6.1 WT

AAGTCAGCCTGCTCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCTGG
GCCCATCCCTAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGCCG

Control A1: CD.GT.QWDC2715.6.2 MUT

AAGTCAGCCTGCTCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCTGG
GCCCATCCATAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGCCG

3.3. Análisis de las muestras de ADN extraídas de las células somáticas de la leche.

3.3.1. Cuantificación y pureza del ADN.

Para la determinación de la concentración y calidad del ADN extraído con cada uno de los métodos de extracción, se empleó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*). Para realizar la medición con el Nanodrop se empleó 1 μ L de muestra de ADN con el equipo previamente calibrado con el blanco correspondiente (Buffer BE o TE).

El Nanodrop es un espectrofotómetro que permite estimar la concentración de ácidos nucleicos mediante la medición de la absorbancia de la muestra a 260 nm (Gallagher and Desjardins, 2006). También permite obtener las relaciones de $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ para determinar la pureza del ADN, que indican la presencia o no de contaminantes en las muestras biológicas provenientes del proceso de extracción del ADN. La ratio $A_{260/280}$ es relación principal para estimar la calidad del ADN. Se considera que el ADN extraído tiene una calidad adecuada cuando los valores de esta ratio se encuentran entre 1,8-2, mientras que valores inferiores indican la presencia de otros compuestos contaminantes como proteínas (Desjardins and Conklin, 2010; Sukumaran, 2011) y valores superiores indican la probabilidad de que la muestra contenga ARN (Olfao de Matos & Pinto, 2011).

3.3.2. Verificación de la amplificación mediante qPCR.

La correcta amplificación del ADN extraído de las células somáticas de la leche con cada uno de los 4 métodos de extracción descritos se analizó mediante qPCR. Se empleó el sistema de detección inespecífico *SYBR Green* para detectar la presencia o ausencia de producto de PCR del gen *CSN2* de la β -caseína y evaluar si el tipo de método de extracción tenía influencia sobre los valores de C_q obtenidos. Las condiciones de qPCR puestas a punto previamente en el laboratorio que se emplearon fueron las que se detallan en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Condiciones de PCR en tiempo real para verificar la correcta extracción y amplificación de las muestras de ADN extraído.

Reactivo	Concentración inicial	μ l/reacción	Concentración final
SYBR Green	2 X	5	1 X
Cebador FW	10 μ M	0,3	0,3 μ M
Cebador RV	10 μ M	0,3	0,3 μ M
H2O Tipo I		2,4	
ADN		2	50-100 ng/ μ L
Total		10	

La reacción de qPCR se llevó a cabo en el termociclador *CX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (BioRad) empleando placas de 96 pocillos. El volumen final para cada pocillo fueron 10 μ L. Cada muestra de ADN se realizó por triplicado. Se usó, además, un blanco que no contenía ADN como control negativo de la reacción (también por triplicado). El programa seleccionado para la amplificación del ADN atendía a los ciclos y temperaturas detallados en la *Tabla 8*.

Tabla 8. Condiciones de amplificación qPCR tiempo real con el fluoróforo *SYBR Green*.

Etapas de amplificación		Condiciones
Etapa de desnaturalización inicial		95°C, 30 seg
Etapa cíclica de amplificación (40 ciclos)	Fase de desnaturalización	95°C, 15 seg
	Fase de extensión	60°C, 1 min
Etapa de disociación (curva de <i>melting</i>)		Incrementos de Tº de 0,5°C cada 5 seg desde 65°C hasta 95°C

3.3.3. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los datos para determinar el método óptimo de extracción de ADN (*Nucleospin tissue*, *Nucleospin Blood*, *Nucleospin Blood modificado o Pokorska*) a partir de las células somáticas de la leche. Las variables dependientes analizadas fueron: concentración de ADN (ng/μL), calidad de ADN ($A_{260/280}$) y verificación de su amplificación (Cq).

Para realizar el análisis estadístico, se empleó la herramienta *IBM SPSS Statistics*. Con esta herramienta se obtuvieron los estadísticos descriptivos necesarios (media y SD) de cada uno de los grupos analizados. También se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) simple para observar si había diferencias significativas entre las medias de cada uno de los grupos analizados para cada variable dependiente. Además, se realizaron comparaciones múltiples entre los grupos con la prueba HSD de Tukey y la significación se definió como $\alpha = 0.05$.

3.4. Optimización de las condiciones de amplificación de la qPCR.

Para realizar la amplificación del ADN mediante qPCR es necesario optimizar las condiciones de la misma. Para ello, en primer lugar, se determinó la concentración de ADN y de cebadores adecuada utilizando el sistema inespecífico *SYBR Green*. Tras ello, para poder detectar la secuencia específica que contiene los polimorfismos A1/A2 se optimizó la concentración de la sonda empleando el sistema basado en sondas *Affinity Plus*.

3.4.1. Optimización de la concentración de cebadores

Para la optimización de la concentración de cebadores se diseñó una matriz de cebadores con el fin de determinar la concentración más adecuada para llevar a cabo la amplificación del fragmento de interés del gen *CSN2*. Para ello, se establecieron tres concentraciones diferentes de cebadores (0,2, 0,3 y 0,4 μM), junto con 3 cantidades distintas de ADN (30, 45 y 60 ng), de manera que la cantidad de ADN estuviera entre 50-100 ng (*Tabla 9*).

Tabla 9. Matriz de cebadores para la amplificación del gen *CSN2* con diferentes concentraciones de ADN.

Cebadores (μM)	Cantidad de ADN (ng)	Cebadores (μM)	Cantidad de ADN (ng)	Cebadores (μM)	Cantidad de ADN (ng)
0,2	30	0,3	30	0,4	30
	45		45		45
	60		60		60

Para realizar la qPCR se empleó el fluoróforo *SYBR Green*, el cual se une de forma inespecífica a cualquier doble hebra de ADN y esto permite detectar y cuantificar el fragmento de ADN amplificado del *gen CSN2*. Como muestra de ADN se empleó un pool de 14 muestras extraídas con el método *Nucleospin tissue*, procedentes de muestras de leche fresca comercial. Para realizar la qPCR se emplearon los volúmenes de reactivos indicados en la *Tabla 10*.

Tabla 10. Condiciones PCR en tiempo real para realizar la matriz de cebadores.

Reactivos	Volumen en μL por reacción								
SYBR Green	5			5			5		
Cebador FW	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4
Cebador RV	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4
H2O Tipo I	2,6	2,4	2,2	1,6	1,4	1,2	0,6	0,4	0,2
ADN	2 (30 ng)			3 (45 ng)			4 (60 ng)		
Volumen Total	10			10			10		

La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador en placas de 96 pocillos. El programa seleccionado en el termociclador fue el que se detalla en la *Tabla 8*.

3.4.2. Optimización de la concentración de cebadores y sondas.

Para la optimización de las concentraciones de sondas se probaron las condiciones de 0,2 μM y 0,4 μM de cebador, junto con 30 y 60 ng ADN y 2 concentraciones diferentes de sondas: 0,2 μM y 0,15 μM (*Tabla 11*).

Tabla 11. Matriz de cebadores y sondas para la amplificación del *gen CSN2*.

Cebadores (μM)	Cantidad de ADN (ng)	Sonda (μM)
0,2	30	0,15
	60	
0,4	30	0,2
	60	

Para realizar la qPCR se empleó el sistema de sondas específicas *Affinity Plus* para detectar los alelos A1 y A2 de la β -caseína. Las muestras de ADN a amplificar fueron también un pool de 14 muestras de ADN procedentes de leche fresca comercial, que había sido

extraídas con el método *Nucleospin Tissue*. Para realizar la qPCR se emplearon los volúmenes de reactivos indicados en la *Tabla 12*.

Tabla 12. Condiciones qPCR para matriz de cebadores y sondas.

Reactivos	Volumen en uL por reacción			
	5		5	
SYBR Green	5		5	
Sonda A1	0,15	0,2	0,15	0,2
Sonda A2	0,15	0,2	0,15	0,2
Cebador FW	0,2	0,4	0,2	0,4
Cebador RV	0,2	0,4	0,2	0,4
H2O Tipo I	2,6	2,2	0,6	0,2
ADN	2 (30 ng)		4 (60 ng)	
Volumen Total	10		10	

El programa seleccionado para la amplificación del ADN para este análisis atendía a los ciclos y temperaturas detallados en la *Tabla 13*.

Tabla 13. Condiciones de amplificación PCR tiempo real con las sondas *Affinity Plus*.

Etapas de amplificación		Condiciones
Etapa de desnaturalización inicial		95°C, 30 seg
Etapa cíclica de amplificación (40 ciclos)	Fase de desnaturalización	95°C, 5 seg
	Fase de extensión	60°C, 30 seg

3.5. Validación del método de qPCR para identificación de alelos A1 y A2 de la β -caseína mediante.

Para la puesta a punto de una técnica, es necesario la validación de la misma. Por ello, el método qPCR desarrollado, fue validado mediante el análisis de una serie de parámetros: eficiencia, sensibilidad, repetibilidad y selectividad.

3.5.1. Eficiencia de amplificación de la qPCR.

Para poder comprender las posibilidades de la qPCR en la detección y cuantificación del ADN diana, es esencial describir el principio matemático en el que está basado el método (Kralik and Ricchi, 2017). La reacción de amplificación sigue la siguiente ecuación:

$$N_n = N_0 \times (1 + E)^n$$

Donde n es el número de ciclos de la qPCR, N_n es el número de copias obtenidos por la qPCR después de n ciclos; N_0 es el número inicial de copias de la muestra de ADN y E es la eficiencia de amplificación de la qPCR.

Para la obtención de la eficiencia de amplificación de la qPCR es necesario realizar las curvas estándar. Para ello, por un lado, se utilizaron las muestras de ADN de referencia

(controles) y por otro, una muestra de ADN heterocigota (A1A2) de un animal previamente genotipado. En el primer caso, se realizaron diluciones seriadas 1:10 y para las muestras genotipadas se utilizaron diluciones serias 1:2, debido a su baja concentración.

Asimismo, también se procedió al cálculo de la eficiencia de mezclas de alelo A1 en alelo A2 tanto con las muestras de referencia (concentración decreciente de control A1 en A2), como con las muestras genotipadas (concentración decreciente de muestra homocigota A1A1 en A2A2), tal y como se refleja en la *Tabla 14*.

Las muestras se amplificaron mediante la qPCR. La amplificación se realizó en duplex, es decir, incorporando ambas sondas (sonda A1 y sonda A2) en una misma reacción. Para la correcta validación del método, se realizaron un total de 12 réplicas de cada muestra de ADN (4 réplicas por placa x 3 placas), teniendo en cuenta la información extraída de la guía de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, 2019).

Los resultados obtenidos se representaron gráficamente, los valores medios de Cq en el eje de ordenadas frente al logaritmo de la cantidad de ADN (número de copias) en el eje de abscisas. Para calcular el número de copias de ADN se procedió de la siguiente forma:

- Muestras de ADN de referencia: se empleó la fórmula disponible en la web de la casa comercial *IDT* (casa comercial de los cebadores y sondas empleados en el presente ensayo).

$$C \left(\frac{ng}{\mu L} \right) \times M \left(\frac{fmol}{ng} \right) \times \left(\frac{1 \times 10^{-15} mol}{fmol} \right) \times 6,022 \times 10^{23}$$

donde *C* es la concentración en ng/μL de las muestras de referencia (10 ng/μL); y *M* es el peso molecular en fmol/ng (12,18 fmol/ng para ambos controles).

Como resultado se obtuvo que con una concentración de 10 ng/μl de muestra de referencia equivalen a $7,34 \times 10^{10}$ copias/μL. En el caso de las diluciones seriadas 1:10, fue necesario reducir dicha concentración hasta los $7,34 \times 10^6$ copias/2μL, el rango de cantidad de ADN ensayado fue de $7,34 \times 10^6$ copias/2μL a $7,34 \times 10^{-2}$ copias/2μL. Por otro lado, para las mezclas de alelo A1 en alelo A2 con las muestras de referencia, se ensayaron cantidades de ADN desde $7,34 \times 10^2$ copias/2μL de alelo A1 y 0 copias de alelo A2 (100% alelo A1), hasta las 0 copias de alelo A1 (*Tabla 14*).

- Muestra de ADN heterocigota (A1A2): se empleó la fórmula desarrollada por Nejati et al. (2020).

$$\frac{\text{Cantidad total de ADN (ng)} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{Tamaño del genoma (pb)} \times 10^9 \times \text{Masa molar de un bp}}$$

donde el tamaño del genoma en pares de bases (pb) es de 3000 millones de pares de bases y la masa molar de un par de bases es de 660 g/mol.

Como resultado se obtuvo que una concentración de 6,4 ng/2 µL de ADN equivale 1946 copias de ADN. Para elaborar la curva estándar con las muestras genotipadas, el rango de diluciones ensayado fue de 1946 copias/2 µl hasta las 30,41 copias/2 µL. Por su parte, para el caso de las mezclas de alelo A1 en alelo A2 con las muestras genotipadas, se ensayaron cantidades desde las 1824 copias de alelo A1 y 0 copias de alelo A2 (100% alelo A1) hasta las 0 copias de alelo A1 (*Tabla 14*).

Tabla 14. Concentraciones decrecientes de control A1 en A2 y muestras genotipadas A1A1 en A2A2.

% A1 en A2	Muestras de referencia		Muestras genotipadas	
	Nº Copias A1	Nº Copias A2	Nº copias A1A1	Nº copias A2A2
100	734	0	1824,9	0
50	367	367	912,4	912,4
40	293	440	729,9	1094,9
30	220	514	547,5	1277,4
20	147	587	365	1459,9
10	73	660	182,5	1642,4
5	37	697	91,2	1733,6
2	15	719	36,5	1788,4
1	7	726	18,3	1806,6
			0	1824,9

Finalmente, la eficiencia de amplificación (E) de la qPCR se calculó teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$E = (10^{-1/n}) - 1$$

Donde n es la pendiente de la recta de la curva estándar (Friedman et al., 2014). El parámetro E hace referencia al número medio de copias de producto de ADN por cada ciclo de amplificación, el cual puede asumir valores en el rango de 0-1 (0-100%). Si la eficiencia de amplificación (E) de la qPCR fuera del 100% el número de moléculas de ADN se duplicaría de forma teórica tras cada ciclo. En la práctica, esto es difícil de alcanzar de manera repetida, por lo que es probable que este parámetro se sitúe en el rango 90-110% (Friedman et al., 2014; Taylor et al., 2010).

Para las curvas estándar de diluciones seriadas 1:10, la diferencia de valores Cq entre dos diluciones seriadas *10-fold* puede expresarse como $10 = 2^n$; por lo que n debe ser igual a 3,32 (Kralik and Ricchi, 2017). Es por ello que una curva estándar con diluciones 1:10 se considera correcta si la pendiente de la recta se aproxima a -3,32 y el valor de R² se sitúa cercano a 0,97 o superior (Nolan et al., 2017; Kralik and Ricchi., 2017).

3.5.2. Sensibilidad de la qPCR: rango dinámico, límite de detección y límite de cuantificación.

Para la correcta validación del método de qPCR es necesario el cálculo de parámetros como el rango dinámico, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ).

El rango dinámico hace referencia a las concentraciones entre las cuales el método funciona. Indica la concentración más alta y más baja donde los resultados obtenidos son fiables y el ADN se amplifica, detecta y cuantifica correctamente (FDA, 2019).

El límite de detección (LOD) se define como la concentración mínima de ADN que puede detectarse con un nivel de confianza superior al establecido, pero que no se cuantifica como un valor exacto (OIE Terrestrial Manual, 2018). De acuerdo con la guía de la FDA (FDA, 2019) el LOD será la dilución con el menor número de copias, a la que se detecta el 95% de muestras positivas realizando 12 réplicas de cada dilución. Es importante tener en cuenta que el LOD no es un valor límite y que los valores C_q inferiores al LOD no pueden considerarse automáticamente negativos. A partir de la definición de LOD, es evidente que los valores inferiores al LOD son válidos en cuanto a la amplificación; sin embargo, la probabilidad de que se repitan es inferior al 95% (Kralik and Ricchi, 2017).

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la menor cantidad de ADN en una muestra que el método de qPCR es capaz de cuantificar con un nivel aceptable de incertidumbre. El LOQ se define, por tanto, como la menor concentración de ADN que permite obtener un resultado positivo en cada una de las 12 réplicas evaluadas, con un coeficiente de variación (CV) del C_q no superior a 0,5 C_q (FDA, 2019; Kralik and Ricchi, 2017). Al igual que el LOD, la cantidad también puede evaluarse en muestras de concentraciones de ADN inferiores al LOQ, pero la confianza de dicha cuantificación será inferior a la declarada por la definición de LOQ.

Se calculó la sensibilidad absoluta y relativa siguiendo las pautas de Chen et al. (2020). Por un lado, para el cálculo de la sensibilidad absoluta (LOD y LOQ), se realizaron curvas estándar a partir de diluciones seriadas con las muestras de referencia A1 y A2 y con la muestra de vaca heterocigota A1A2. Por otro lado, para el cálculo de la sensibilidad relativa (LOD y LOQ), se elaboraron mezclas del alelo A1 en alelo A2 (%), tanto con las muestras de referencia, como con las muestras genotipadas A1A1 y A2A2 (*Tabla 14*).

La amplificación por qPCR se realizó en duplex. Finalmente, para determinar el LOQ se calculó el CV de cada muestra en cada placa, según la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{\mu}{\sigma}$$

donde μ es la media de cada uno de los Cq evaluados y σ es la desviación estándar de los mismos.

3.5.3. Repetibilidad de la qPCR.

La repetibilidad del método de qPCR se refiere al grado de concordancia entre resultados sucesivos e independientes obtenidos por el mismo método con idéntico material de ensayo en las mismas condiciones (aparato, trabajador, laboratorio y cortos intervalos de tiempo) y expresa las variaciones dentro del laboratorio (Pérez de Ciriza, 2017; ISO 5725-1, 1994; NMKL, 2009). La repetibilidad se compone de dos variables diferentes: la variación intra-ensayo y la variación inter-ensayo. La variación intra-ensayo describe la variabilidad de las réplicas realizadas en el mismo experimento y la variabilidad inter-ensayo describe la variabilidad entre experimentos realizados en días diferentes. Numéricamente, la repetibilidad se caracteriza como la desviación estándar (SD) de las réplicas en cada concentración de cada matriz para cada método.

Para calcular la variabilidad intra-ensayo, se calculó la SD y CV, dentro de una misma placa, es decir, entre los Cq de cada una de las 4 réplicas por muestra. También se determinó la variabilidad inter-ensayo, es decir, la SD y el CV, entre los Cq de las 12 réplicas de las 3 placas de qPCR (Kralik and Ricchi, 2017).

Para la correcta validación del método, la repetibilidad intra-ensayo debe tener un CV menor al 25% y la inter-ensayo, menor al 35% (FDA, 2019).

Este parámetro se evaluó a partir de las curvas estándar de las diluciones seriadas de las muestras de referencia A1 y A2 y de la muestra de vaca heterocigota A1A2, además de las curvas estándar de las mezclas del alelo A1 en alelo A2 (%) tanto para las muestras de referencia como para las muestras genotipadas A1A1 y A2A2.

3.5.4. Selectividad de la qPCR.

La selectividad del método hace referencia a la capacidad del método para distinguir el ADN diana de otros fragmentos de ADN. La selectividad, exclusividad o especificidad también puede definirse como la ausencia de interferencias y de reacciones cruzadas entre cebadores, sondas y dianas de ADN. El número deseable de muestras positivas en las pruebas de exclusividad es cero, es decir, se espera que no haya interferencias (Johnson et al., 2013).

La qPCR duplex, además de servir para determinar la sensibilidad del método de qPCR, también servirá para determinar la selectividad del mismo, ya que en cada reacción de amplificación se añaden la sonda A1 y A2. Para determinar la selectividad del método se emplean muestras de genotipo conocido A1A1, A1A2 y A2A2 procedentes de 3 vacas previamente genotipadas. En cada pocillo de la qPCR se añaden tanto sonda A1 (sonda HEX)

como sonda A2 (sonda FAM), con el fin de determinar si la sonda es lo suficientemente específica como para detectar ambos alelos o solamente uno de ellos, según la muestra empleada.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección del método óptimo de extracción de ADN a partir de células somáticas de leche.

Para determinar el método óptimo de extracción de ADN de las células somáticas de la leche se analizaron las variables: concentración de ADN (ng/ μ L), calidad de ADN ($A_{260/280}$) y Cq (se verificó la amplificación del ADN extraído), cuyos resultados se muestran en la *Tabla 15*.

Tabla 15. Estadísticos descriptivos resultados del ANOVA de la concentración (ng/ μ L), calidad del ADN ($A_{260/280}$) y Cq de los cuatro métodos de extracción ensayados.

	<i>Nucleospin Blood</i>		<i>Nucleospin Blood modificado</i>		<i>Pokorska</i>		<i>Nucleospin Tissue</i>		<i>P-valor</i>
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	
Concentración (ng/ μL)	8,96 ^b	2,75	5,2 ^b	2,66	220,8 ^a	174,2	15,6 ^b	3,75	<0,001
Calidad ($A_{260/280}$)	2,05 ^a	0,16	1,79 ^b	0,19	1,1 ^c	0,11	1,93 ^{ab}	0,13	<0,001
Cq	22,79 ^b	0,68	26,22 ^a	0,58	/	/	22,86 ^b	0,4	<0,001

SD = desviación estándar.

Según estos resultados, si se tiene en cuenta la variable concentración de ADN, el método de *Pokorska* es el que permitió obtener una cantidad significativamente mayor respecto al resto de métodos ($P<0,01$). Además, es de destacar que mediante el método *Nucleospin Blood modificado* se obtuvo una cantidad de ADN muy baja (5,2 ng/ μ L).

La ratio $A_{260/280}$ es óptima cuando los valores son cercanos a 1,8 o algo superiores (Popa et al., 2007). De esta manera, se puede ver que con el método *Nucleospin Tissue* se obtuvieron los mejores resultados, aunque no se detectaron diferencias significativas con respecto al método *Nucleospin Blood* y *Nucleospin Blood modificado* ($P>0,05$). El método de *Pokorska* mostró los peores resultados, con una calidad media de 1,1, y con diferencias significativas con respecto al resto de métodos ($P<0,05$).

Por otro lado, si se tiene en cuenta el Cq, tanto el método *Nucleospin Tissue* como el *Nucleospin Blood* permitieron obtener unos resultados óptimos, con unos valores de Cq de entorno a 23, y sin diferencias significativas entre ambos ($P>0,05$). Por su parte, las muestras obtenidas con el método *Pokorska*, no amplificaron correctamente por lo que no se obtuvo ningún valor de Cq. Esto parece estar relacionado con la mala calidad de estas muestras, pudiendo haber presente gran cantidad de proteínas u otros tipos de contaminantes que impedirían la correcta actuación de las polimerasas o de los cebadores durante la qPCR.

Teniendo esto en cuenta, los métodos *Nucleospin tissue* y *Nucleospin Blood* fueron los métodos más óptimos para la extracción de ADN a partir de células somáticas de la leche. Sin embargo, la concentración de ADN en las muestras extraídas con el método *Nucleospin tissue* (15,6 ng/μL) fue mayor que con el método *Nucleospin Blood* (8,96 ng/μL), si bien, el test ANOVA no detectó esta diferencia como significativa ($P>0,05$), debido a la presencia del método *Pokorska* en el análisis. Por ello, se determinó que el método más óptimo para la extracción del ADN a partir de las células somáticas de la leche fue el kit comercial *Nucleospin tissue*.

No obstante, cabe mencionar que la extracción del ADN de las células somáticas de la leche es un proceso complicado y delicado, debido a la presencia en la leche, de proteínas, azúcares y, principalmente grasa, que dificultan la obtención de una alta eficiencia en la extracción del ADN.

4.2. Optimización de las condiciones de amplificación para qPCR.

4.2.1. Optimización de la concentración de cebadores

Los resultados de la optimización de la concentración de cebadores se muestran en la *Tabla 16*.

Tabla 16. Valores de Cq y RFU obtenidos en la optimización de la concentración de cebadores de amplificación para qPCR.

Cebadores (μM)	Cantidad de ADN (ng)	Cq	SD	RFU	SD
0,2	30	23,16	0,55	1154,32	84,48
	45	22,47	0,13	1087,1	42,76
	60	22,16	0,05	1033,28	89,75
0,3	30	24,07	1,26	817,68	480,67
	45	22,96	1,01	938,81	483,54
	60	22,62	0,22	835,52	622,05
0,4	30	22,68	0,33	1411,09	285,38
	45	22,18	0,39	1517,51	217,56
	60	21	0,36	5474,61	1354,55

SD = desviación estándar, RFU = relative fluorescence units.

Tal y como se refleja en la presente tabla, los resultados obtenidos no fueron muy concluyentes, aunque se pudo establecer que las condiciones de 0,4 μM de cebador y 60 ng de ADN fueron adecuadas, puesto que presentaron un valor de Cq adecuado (21) y las RFU obtenidas fueron muy elevadas (5474,61). Por su parte, las condiciones de 0,2 μM de cebador y 60 ng de ADN fueron también adecuadas, ya que el valor de Cq medio fue bajo (22,16), así como la SD (0,05). Además, los valores de RFU fueron adecuados (superiores a 1000) con una baja variabilidad de los resultados. Por ello, se decidió seleccionar las condiciones de 0,2 y 0,4

μM de cebador para continuar con la optimización del ensayo. Además, como no hubo unas diferencias claras entre ninguna de las cantidades de ADN empleadas, se decidió seleccionar las condiciones extremas (30 y 60 ng ADN). Por otro lado, se decidió rechazar las condiciones de 0,3 μM de cebador, ya que los valores de Cq fueron ligeramente superiores y sus valores de RFU fueron menores (800-900), en comparación con el resto de grupos.

4.2.2. Optimización de la concentración de cebadores y sondas

Los resultados de la optimización de la concentración de cebadores y sonda se presentan en la *Tabla 17*.

Tabla 17. Valores de Cq y fluorescencia (RFU) obtenidos en la optimización de la concentración de cebadores y sondas de amplificación para qPCR.

Tipo de sonda	Sonda (μM)	Cebadores (μM)	Cantidad de ADN (ng)	Cq	SD	RFU	SD
Sonda FAM	0,15	0,2	30	24,93	1,23	658,30	290,39
			60	25,53	1,58	303,45	226,53
	0,2	0,4	30	24,80	0,43	985,02	211,16
			60	23,71	0,25	1169,64	441,17
Sonda HEX	0,15	0,2	30	22,66	2,21	329,68	131,94
			60	23,23	1,32	149,08	122,7
	0,2	0,4	30	24,90	1,81	557,97	87,37
			60	23,85	1,24	653,52	242,54

SD = desviación estándar, RFU = relative fluorescence units.

El análisis de los valores de Cq no permitió obtener conclusiones claras entre ninguna de las condiciones. En cuanto a los niveles RFU, se observó que los niveles más altos, tanto con la sonda FAM como con la sonda HEX, se consiguieron con 0,2 μM sonda y 0,4 μM de cebador. Las cantidades de ADN ensayadas no mostraron claras diferencias en los niveles RFU ni en los valores de Cq, por lo que se decidió elegir 30 ng ADN y así emplear menor cantidad de ADN en cada ensayo, puesto que la cantidad de ADN disponible de cada muestra era muy limitada.

Las condiciones qPCR optimizadas se detallan en la *Tabla 18*.

Tabla 18. Condiciones PCR tiempo real optimizadas para la amplificación y detección de las variantes de la β -caseína.

Reactivo	[] inicial	μl /reacción	[] final
SYBR Green	2 X	5	1 X
Cebador FW	10 μM	0,4	0,4 μM
Cebador RV	10 μM	0,4	0,4 μM
Sonda A1 (HEX)	10 μM	0,2	0,2
Sonda A2 (FAM)	10 μM	0,2	0,2
H2O Tipo I		1,8	

ADN		2	50-100 ng/ μ L
Total		10	

4.3. Validación del método de identificación de alelos A1 y A2 de la β -caseína mediante qPCR.

4.3.1. Eficiencia de amplificación de la qPCR.

Para determinar las eficiencias de amplificación de la reacción de qPCR se elaboraron curvas estándar tanto con las diluciones seriadas de las muestras de ADN de referencia y de las muestras de ADN heterocigota (A1A2), como con las mezclas de alelo A1 en A2 (%) de las muestras de ADN de referencia y de las muestras genotipadas.

En la *Figura 14* se muestra la curva estándar para el alelo A1 y el alelo A2 de la β -caseína correspondiente a las muestras de referencia. Se elaboró de igual manera la curva estándar correspondiente a la muestra heterocigota A1A2 genotipada (*Anexo 1*). En ambos casos, los valores de R^2 fueron correctos, próximos al 1, y la linealidad de la recta se mantuvo.

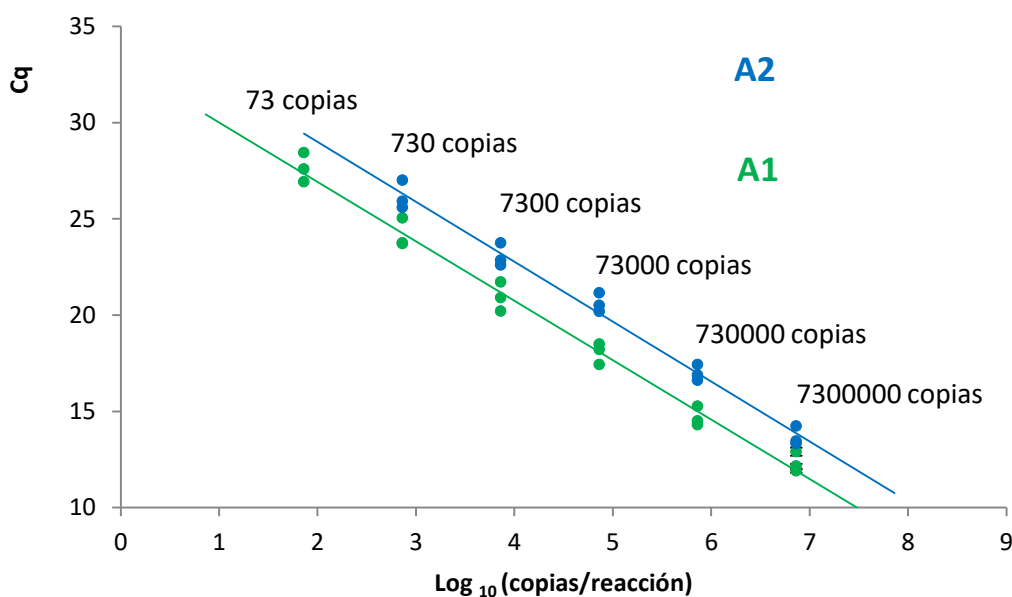


Figura 14. Curvas estándar de las muestras de referencia de las variantes A1 y A2 del gen de la β -caseína.

En la *Tabla 19* se muestran los valores medios de eficiencia de las muestras de referencia y de las muestras provenientes de los animales genotipados, obtenidos a partir de los valores de eficiencia de las curvas estándar de cada placa (individual). Se pudo observar que los valores de R^2 fueron elevados, lo que reflejó una buena linealidad de los datos en las curvas estándar. Por su parte, las eficiencias de amplificación fueron similares en todos los casos, con valores superiores al 100%. Según Taylor et al. (2010) la eficiencia de amplificación de los cebadores tiene que estar cercana a 100%, entre 90–110% son valores aceptables, y los

valores de R^2 tienen que ser superiores a 0,98. Teniendo en cuenta estos parámetros las curvas estándar presentaron unas buenas características y las eficiencias de amplificación fueron también adecuadas.

Tabla 19. Eficiencia de amplificación de qPCR empleando muestras de referencia y la muestra genotipada heterocigota.

Tipo de muestra	Tipo de sonda	Pendiente (n)	Eficiencia (%)	R^2
Muestra de referencia A1	Sonda HEX (Curva A1)	-3,09	111,01	0,987
Muestra de referencia A2	Sonda FAM (Curva A2)	-3,11	109,75	0,985
Muestra genotipada heterocigota	Sonda HEX (Curva A1)	-3,08	111,15	0,960
	Sonda FAM (Curva A2)	-3,22	105,16	0,980

Por otro lado, también se procedió al cálculo de la eficiencia de amplificación con las mezclas de alelo A1 en alelo A2 (%) de las muestras de referencia y genotipadas (Tabla 20), a partir de los valores de eficiencia de las curvas estándar de cada placa (individual). Se pudo observar que la eficiencia de amplificación con las muestras de referencia fue correcta (102%), sin embargo, con las muestras genotipadas no fue adecuada (73%), por lo que habría que optimizar este último ensayo.

Tabla 20. Eficiencia de amplificación de las mezclas de alelo A1 en alelo A2 (%).

Tipo de muestra	Tipo de sonda	Pendiente (n)	Eficiencia (%)	R^2
% A1 en A2 con muestras de referencia	Sonda HEX (Curva A1)	-3,27	102,02	0,97
% A1 en A2 con muestras genotipadas	Sonda HEX (Curva A1)	-4,38	73,17	0,91

4.3.2. Sensibilidad de la qPCR: rango dinámico, límite de detección y límite de cuantificación.

Para determinar la sensibilidad absoluta y relativa, hay que tener en cuenta que para que un resultado sea positivo, se deben cumplir los siguientes criterios:

- El C_q medio de la muestra (o dilución) debe ser menor que el C_q del control negativo.
- Se debe mantener la linealidad de las curvas estándar y el valor de R^2 se debe aproximar a la unidad.
- La amplificación debe ser específica. Por ejemplo, si se emplea la muestra de ADN con el alelo A1, solo se debe producir señal de la sonda A1 y no con ambas sondas. Si esto ocurriera indicaría que, debido a la poca cantidad de ADN disponible, se habría

producido una amplificación inespecífica por dimerización entre de ambas sondas (*primer-dimer*), y el resultado no sería correcto.

Los resultados de la sensibilidad absoluta con las muestras de referencia y muestras genotipadas se muestran en las *Tablas 21 y 22*.

Tabla 21. Valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) absolutos del método qPCR con las muestras de referencia.

Nº de Ensayo	Muestras de referencia				
	Tipo de sonda	Rango dinámico (copias)	Nº de resultados positivos	LOD 95%	LOQ
Placa 1	Sonda A1	7300000 a 73	24/24 (100%)	73	73
	Sonda A2	7300000 a 730	20/20 (100%)	730	730
Placa 2	Sonda A1	7300000 a 73	23/24 (95,8%)	73	73
	Sonda A2	7300000 a 730	24/24 (100%)	73	73
Placa 3	Sonda A1	7300000 a 73	24/24 (100%)	73	73
	Sonda A2	7300000 a 730	23/24 (95,8%)	73	73

LOD y LOQ expresados en nº de copias.

Tabla 22. Valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) absolutos del método qPCR con las diluciones seriadas de la muestra genotipada.

Nº de Ensayo	Muestra genotipada				
	Tipo de sonda	Rango dinámico (copias)	Nº de resultados positivos	LOD 95%	LOQ
Placa 1	Sonda A1	1946 a 60,8	27/28 (96,4%)	60,8	60,8
	Sonda A2	1946 a 30,4	28/28 (100%)	30,4	30,4
Placa 2	Sonda A1	1946 a 30,4	28/28 (100%)	30,4	30,4
	Sonda A2	1946 a 30,4	27/28 (96,4%)	30,4	30,4
Placa 3	Sonda A1	1946 a 30,4	28/28 (100%)	30,4	30,4
	Sonda A2	1946 a 30,4	28/28 (100%)	30,4	30,4

LOD y LOQ expresados en nº copias.

Una vez calculados los parámetros de rango dinámico, LOD y LOQ para cada placa, hubo que establecer el valor más restrictivo para cada ensayo. El rango dinámico de ADN del ensayo con las muestras de referencia fue de 7300000 a 73 copias para el caso de la sonda A1 y de 7300000 a 730 copias para el caso de la sonda A2 (*Tabla 21*). En cuanto las muestras genotipadas, fue de 1946 copias a 30,4 copias de ADN para la sonda A2 y de las 1946/μl a las 60,8 copias para la sonda A1 (*Tabla 22*).

En el ensayo con las muestras de referencia, en la sonda A2, en la placa 1, el LOD fue más elevado (730 copias). Esto pudo ser debido a un error experimental durante la ejecución

de este ensayo. Asimismo, es importante mencionar que a partir de 7,3 copias no se pudo considerar que el método fuera sensible debido a que se produjo amplificación de ambas sondas por dimerización (*primer-dimer*), perdiéndose así la selectividad de la reacción y de la sonda. Por ello, el LOD y LOQ absolutos se situaron en 73 copias de ADN/ μ l para la sonda A1 y de 730 copias de ADN/ μ l en el caso de la sonda A2 si se empleaban muestras de referencia. En cuanto a las muestras genotipadas, la sensibilidad del método fue similar, siendo el LOD y LOQ de 30,4 copias para el alelo A2 y de 60,8 copias para el alelo A1.

La curva estándar que se presenta en la *Figura 15*, fue elaborada con las muestras de referencia con concentraciones desde el 100% hasta el 0% de A1 en A2 (0 copias), para que la linealidad de la misma fuera correcta y el valor de R^2 se aproximara a la unidad. Se elaboró de igual manera la curva estándar con las mezclas de muestras genotipadas (*Anexo 2*).

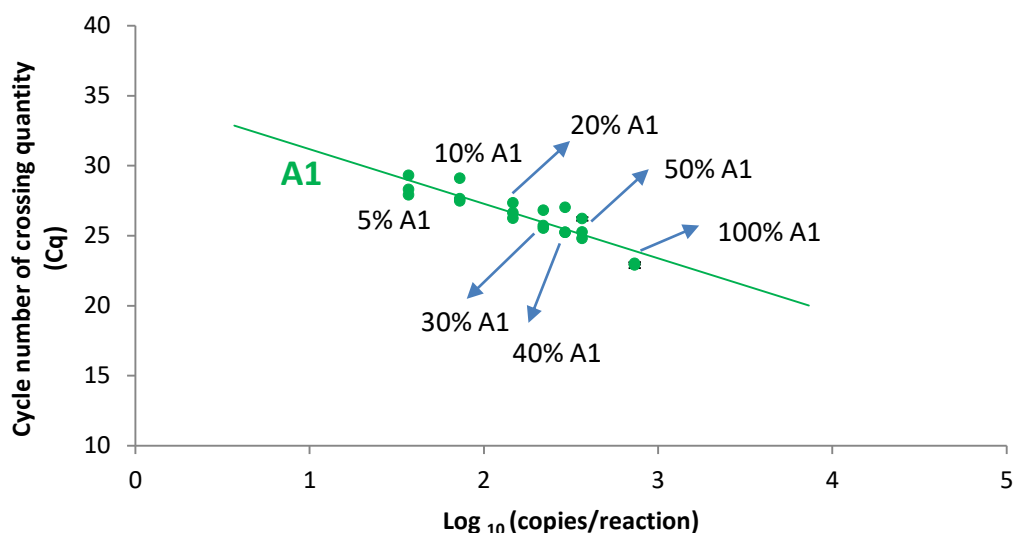


Figura 15. Curva estándar de las mezclas elaboradas con las muestras de referencia.

Los resultados de sensibilidad relativa se muestran en las *Tabla 23* y *24*.

Tabla 23. Valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) relativos de las mezclas de las muestras de referencia.

% A1 en A2 muestras de referencia				
	Rango dinámico	Nº de resultados positivos	LOD 95%	LOQ
Placa 1	100% a 2%	36/36 (100%)	1%	2%
Placa 2	100% a 5%	35/36 (97%)	1%	5%
Placa 3	100% a 2%	36/36 (100%)	1%	2%

Tabla 24. Valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) relativos de las mezclas de las muestras genotipadas.

% A1 en A2 muestras genotipadas				
	Rango dinámico	Nº de resultados positivos	LOD 95%	LOQ
Placa 1	100% a 10%	23/24 (95,8%)	10%	10%
Placa 2	100% a 5%	27/28 (96%)	5%	5%
Placa 3	100% a 5%	28/28 (100%)	5%	5%

En el caso de las muestras de referencia, el rango dinámico del ensayo fue del 100% al 5% de alelo A1 en A2, el LOD fue del 1% y el LOQ fue ligeramente superior, situándose en el 5% (Tabla 23). En el caso de las muestras genotipadas, el rango dinámico del ensayo se situó entre el 100% y el 10% del alelo A1 en A2. En este caso, el LOD del ensayo fue el 10% y el LOQ también fue del 10% (Tabla 24).

De esta forma se pudo determinar que la sensibilidad del ensayo empleando las muestras de referencia fue mayor en comparación a las muestras genotipadas y el protocolo de qPCR fue capaz de detectar un menor porcentaje de alelo A1 en A2, por lo que el método sería más sensible. La sensibilidad del ensayo fue peor cuando se emplearon muestras genotipadas, lo cual pudo ser debido a una menor calidad o cantidad de ADN obtenida durante la extracción con el método *Nucleospin Tissue* por parte del operario. En contraposición, las muestras de referencia fueron suministradas directamente por el fabricante con un alto grado de pureza y calidad de su ADN.

La qPCR fue lo suficientemente sensible como para detectar los genotipos SNP de la β -caseína (alelos A1 y A2). La discriminación alélica es el proceso por el cual se detectan las 2 variantes de la secuencia de 1 nucleótido (SNP) en una muestra. Esto fue posible gracias a que cada sonda es complementaria para cada uno de los SNP, y esta posee un fluorocromo diferente: la sonda A1 el HEX y la sonda A2 el FAM. En este sentido, en el gráfico de discriminación alélica que se representa en la *Figura 18*, se pudo observar que el método qPCR fue capaz de discernir entre las diferentes proporciones de alelo A1 sobre alelo A2 en función de las RFU emitidas por cada una de las sondas, hasta el límite de cuantificación. En el eje de ordenadas se representaron las RFU emitidas por la sonda HEX, mientras que, en el eje de abscisas, se representaron las RFU emitidas por la sonda FAM.

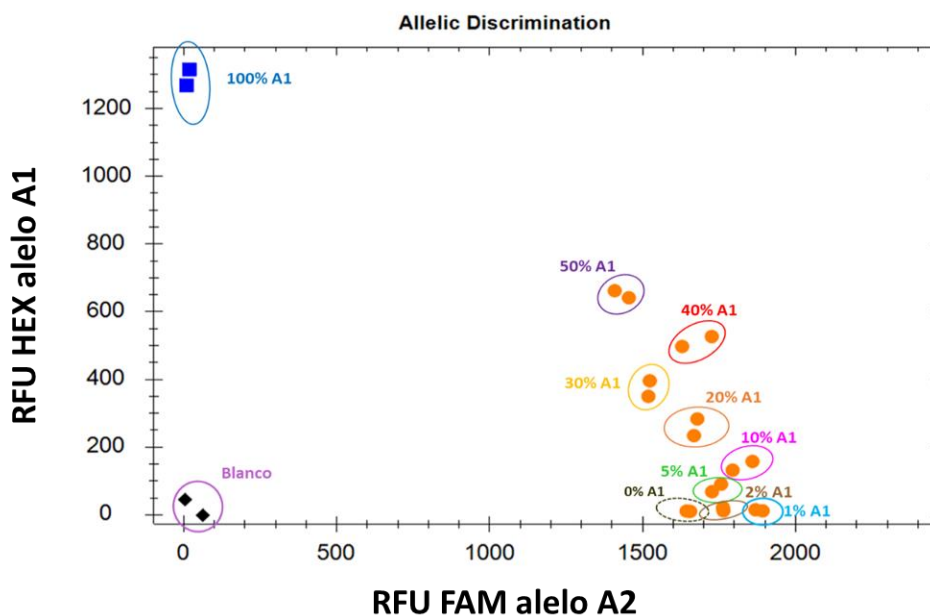


Figura 16. Gráfico de discriminación alélica de las mezclas de alelo A1 en alelo A2 con las muestras de referencia.

En la Figura 16 se pudo observar claramente cómo en las muestras de 100% A1 las RFU de la sonda HEX fueron muy elevadas, cercanas a 1300, mientras que las de la sonda FAM fueron cercanas a 0. Por el contrario, cuanto menor fue la proporción de alelo A1 mayores fueron los niveles de RFU en el sentido del eje de abscisas, hasta llegar a unas RFU para la sonda HEX cercanas a 0 y unas RFU para la sonda FAM alrededor de 2000. De esta manera, se pudo concluir que el experimento logró distinguir entre las 2 variantes de la β -caseína (A1 y A2) con éxito, hasta un 5% (el límite de cuantificación relativo) de muestra de referencia. Las proporciones de 0, 1 y 2% de alelo A1 en A2, se mostraron en el gráfico en la parte inferior, difícilmente distinguibles entre ellas.

4.3.3. Repetibilidad de la qPCR.

La repetibilidad se compone de dos variables diferentes: la variabilidad intra-ensayo y la variabilidad inter-ensayo.

En las Tablas 25 y 26, se muestran los resultados obtenidos en 3 ensayos de qPCR para la detección de las variantes A1 y A2 de la β -caseína con las muestras de referencia, empleando 4 réplicas por muestra en cada uno de los ensayos.

Tabla 25. Repetibilidad intra e inter-ensayo de la sonda A1 empleando muestras de referencia de ADN.

Sonda	Placa	(copias/reacción)	Variabilidad intra-ensayo			Variabilidad inter-ensayo		
			Cq medio	SD	CV (%)	Cq medio	SD	CV (%)
A1	1	7,30E+06	12,91	0,21	1,60	12,32	0,53	4,27
	2	7,30E+06	11,90	0,65	5,44			
	3	7,30E+06	12,14	0,08	0,66			
	1	7,30E+05	15,26	0,08	0,51	14,68	0,51	3,45
	2	7,30E+05	14,49	0,44	3,06			
	3	7,30E+05	14,30	0,17	1,18			
	1	7,30E+04	18,49	0,13	0,72	18,04	0,56	3,08
	2	7,30E+04	18,21	0,21	1,14			
	3	7,30E+04	17,42	0,22	1,27			
	1	7,30E+03	21,71	0,01	0,06	20,94	0,76	3,61
	2	7,30E+03	20,20	0,22	1,07			
	3	7,30E+03	20,91	0,44	2,12			
	1	7,30E+02	25,04	0,25	1,01	24,17	0,75	3,12
	2	7,30E+02	23,75	0,44	1,87			
	3	7,30E+02	23,71	0,27	1,14			
	1	7,30E+01	28,43	0,25	0,88	27,64	0,76	2,75
	2	7,30E+01	26,92	0,19	0,70			
	3	7,30E+01	27,58	0,21	0,75			
1	7,30E+00	31,09	0,31	0,99	30,38	0,95	3,13	
2	7,30E+00	29,30	0,25	0,86				
3	7,30E+00	30,74	0,31	1,00				
1	7,30E-01	32,05	0,33	1,03	31,05	0,96	3,10	
2	7,30E-01	30,13	0,58	1,94				
3	7,30E-01	30,98	0,19	0,62				
1	7,30E-02	32,51	0,55	1,68	31,71	0,82	2,59	
2	7,30E-02	30,87	0,72	2,33				
3	7,30E-02	31,75	0,33	1,05				

Tabla 26. Repetibilidad intra e inter-ensayo de la sonda A2 empleando muestras de referencia de ADN.

Sonda	Placa	(copias/reacción)	Variabilidad intra-ensayo			Variabilidad inter-ensayo		
			Cq medio	SD	CV (%)	Cq medio	SD	CV (%)
A2	1	7,30E+06	14,22	0,18	1,25	13,66	0,49	3,60
	2	7,30E+06	13,44	0,49	3,65			
	3	7,30E+06	13,32	0,41	3,06			
	1	7,30E+05	17,42	0,07	0,39	16,97	0,41	2,42
	2	7,30E+05	16,61	0,20	1,19			
	3	7,30E+05	16,87	0,67	3,96			
	1	7,30E+04	21,15	0,16	0,77	20,61	0,49	2,39
	2	7,30E+04	20,50	0,62	3,01			
	3	7,30E+04	20,18	0,30	1,50			
	1	7,30E+03	23,74	0,12	0,49	23,06	0,60	2,59
	2	7,30E+03	22,60	0,29	1,28			
	3	7,30E+03	22,85	0,50	2,19			
	1	7,30E+02	27,01	0,11	0,39	26,17	0,74	2,85
	2	7,30E+02	25,58	0,16	0,64			
	3	7,30E+02	25,91	0,27	1,06			
	1	7,30E+01	30,45	0,52	1,70	29,56	0,80	2,70
	2	7,30E+01	28,92	0,16	0,56			
	3	7,30E+01	29,31	0,30	1,02			
1	7,30E+00	31,36	0,29	0,92	30,85	0,51	1,64	
2	7,30E+00	30,35	0,52	1,70				
3	7,30E+00	30,84	0,41	1,33				

	1	7,30E-01	32,22	0,96	2,99			
	2	7,30E-01	31,29	0,30	0,95	32,00	0,63	1,97
	3	7,30E-01	32,50	0,61	1,88			
	1	7,30E-02	32,78	0,61	1,86			
	2	7,30E-02	34,38	2,95	8,58	33,65	0,81	2,41
	3	7,30E-02	33,80	0,64	1,88			

Analizando la variabilidad intra-ensayo, los resultados fueron correctos, ya que los Cq de las 4 réplicas por placa, presentaron CV entre el 1-3%, siendo el rango admitido por la FDA de CV<25% para la correcta validación del método. Por su parte, los resultados de la variabilidad inter-ensayo, fueron también correctos, ya que los Cq entre las 12 réplicas, presentaron CV entre el 3-4%, siendo el rango admitido por la FDA de CV<35% (FDA, 2019).

Estos resultados guardaron relación con los obtenidos en otros experimentos de validación del método qPCR. Así, por ejemplo, en Peixoto et al. (2005), los CV de los valores de Cq fueron de alrededor del 5% para una muestra que contenía aproximadamente 1,40E+04 copias de ADN. En el trabajo desarrollado por Martins et al. (2019), los CV intra-ensayo se calcularon a partir de 3 réplicas por experimento y los inter-ensayo a partir de 3 experimentos independientes y los CV se enmarcaron entre el 1-3%. Zhen et al. (2019), en el protocolo de validación qPCR que desarrollaron, obtuvieron una repetibilidad intra e inter-ensayo muy adecuada con CV menores a 1%.

Por tanto, los resultados del ensayo de qPCR desarrollado en el presente trabajo, tanto con la sonda A1 y A2, presentaron una repetibilidad intra-ensayo e inter-ensayo adecuada con valores muy por debajo del 25% de CV (intra-ensayo) y 35% (inter-ensayo) según los límites aceptados por la guía FDA (FDA, 2019).

4.3.4. Selectividad de la qPCR.

Como ya se detalló en el apartado de materiales y métodos, para el análisis de la selectividad se emplearon muestras de genotipos conocidos de vacas previamente genotipadas: A1A1, A1A2 y A2A2 para el gen de la β -caseína. El objetivo fue determinar si el método qPCR era lo suficientemente selectivo como para distinguir entre estas variantes.

Para ello, en primer lugar, se representan cada una de las curvas de amplificación que se obtuvieron con cada una de las 3 muestras.

En la *Figura 17*, se representa la curva de amplificación obtenida con la muestra A1A1, observándose que únicamente se obtuvo señal de la sonda HEX (color verde), ya que únicamente había alelo A1 en esta muestra.

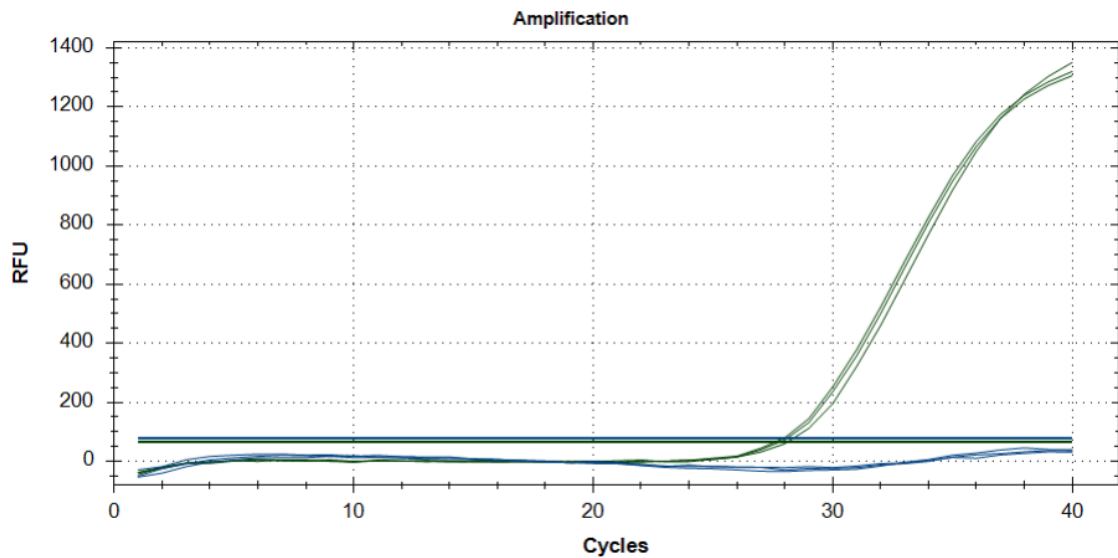


Figura 17. Curva de amplificación de la muestra genotipada A1A1.

Color verde: sonda A1 HEX. Color azul: sonda A2 FAM.

En la *Figura 18*, se muestra la curva de amplificación obtenida con la muestra A1A2. En este caso, se obtuvo señal de ambas sondas, tanto la sonda HEX (color verde) como de la sonda FAM (color azul), puesto que en esta muestra heterocigota estaban presentes los dos alelos de la β -caseína. Además, en esta figura se pudo observar que, tal y como se mencionó en otros experimentos anteriores, la sonda FAM produjo más señal (más RFU) que la HEX, debido a una mayor especificidad o mayor capacidad de unión a su secuencia específica.

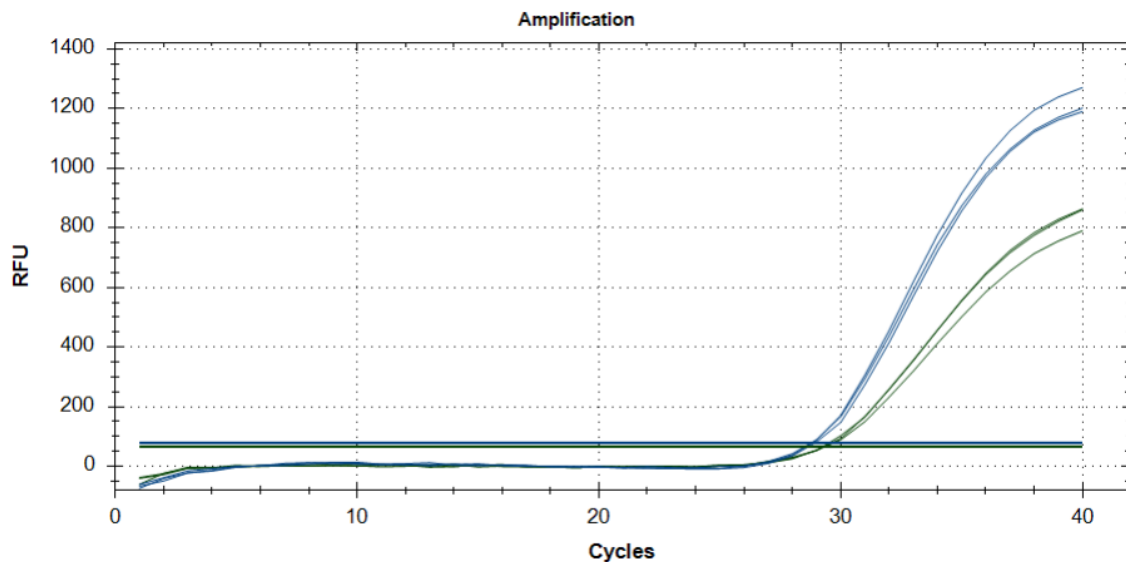


Figura 18. Curva de amplificación de la muestra genotipada A1A2.

Color verde: sonda A1 HEX. Color azul: sonda A2 FAM.

Por último, en la *Figura 19*, se muestra la curva de amplificación obtenida con la muestra homocigota A2A2, donde solo se obtuvo señal de la sonda FAM (color azul), ya que únicamente había alelo A2 en esta muestra de ADN.

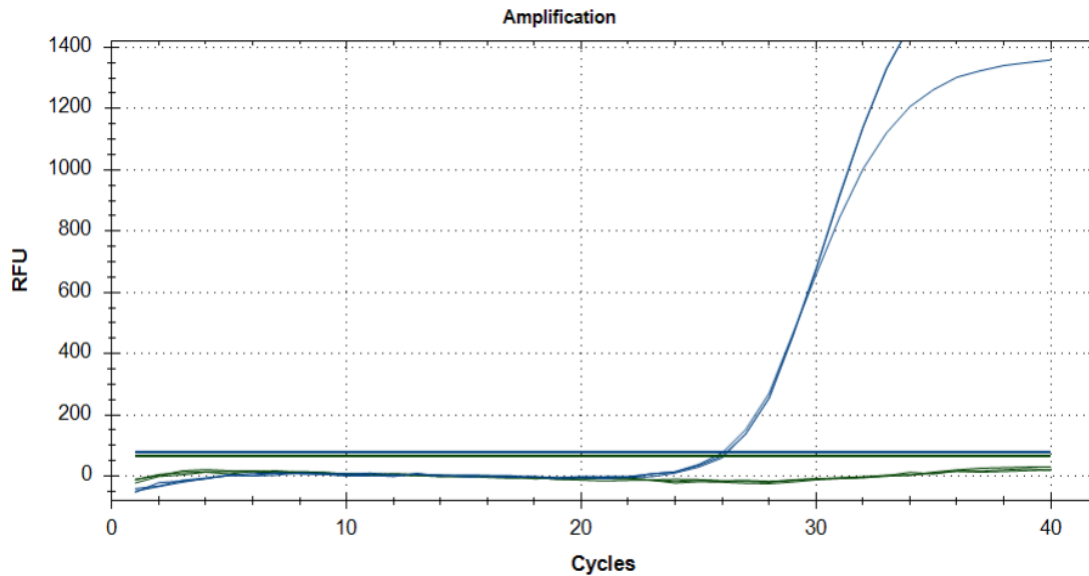


Figura 19. Curva de amplificación de la muestra genotipada A2A2.
Color verde: sonda A1 HEX. Color azul: sonda A2 FAM.

Asimismo, en la *Figura 20* se muestra el gráfico de discriminación alélica que ofreció el software de termociclador, donde se representaron los valores de RFU de la sonda A1 HEX (eje de ordenadas), y de la sonda A2 FAM (eje de abcisas).

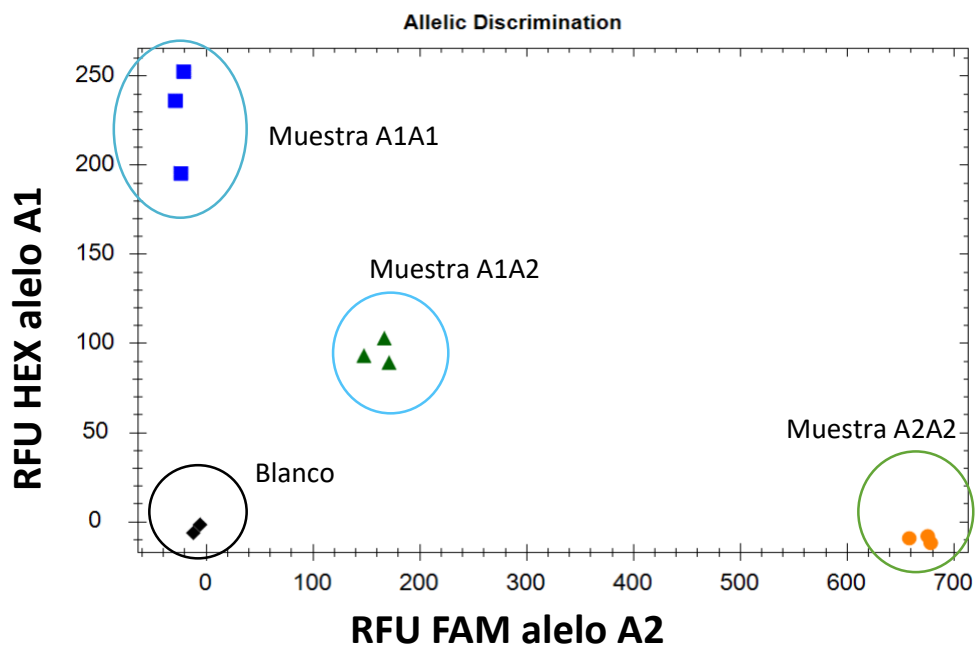


Figura 20. Gráfico de discriminación alélica de las muestras de vacas genotipadas.

Se pudo observar que, la muestra homocigota A1A1 (azul) se situó en la parte superior, ya que únicamente fue detectada por la sonda HEX, generando una fluorescencia de en torno a 250 RFU en el eje de ordenadas; pero no fue detectada por parte de la sonda FAM. En la muestra heterocigota (color verde) se midió la señal de ambas sondas. En cuanto a la muestra homocigota A2A2 (color amarillo), únicamente fue detectada por la sonda FAM generando una fluorescencia de en torno a 700 RFU en el eje de abscisas. En este caso, de igual forma que en los casos anteriores, la sonda FAM produjo más señal que la sonda HEX. Por su parte el blanco (color negro), en el que no había presente ninguna muestra de ADN, no se produjo señal.

5. CONCLUSIONES

- I. La **extracción** de ADN a partir de las células somáticas de la leche es un proceso complicado debido a la gran cantidad de componentes presentes en la matriz láctea, como grasas o proteínas.
- II. El **método más óptimo de extracción de ADN** a partir de las células somáticas de la leche fue el kit comercial *Nucleospin Tissue*. El método que presentó peores resultados fue el desarrollado por *Pokorska et al. (2016)*, puesto que ninguna de las muestras amplificó (no se obtuvieron valores de Cq).
- III. En la **optimización** de las condiciones de qPCR, cuando se ensayaron las condiciones de 0,2 μ M de sonda, 0,4 μ M de cebador y 30/60 ng de ADN, se obtuvieron los mayores niveles de RFU, aunque sin diferencias claras entre los Cq.
- IV. En la **validación** del método qPCR se estudiaron la eficiencia, sensibilidad, repetibilidad y selectividad. La validación presentó mejores resultados cuando se emplearon muestras de ADN de referencia, que cuando se emplearon muestras de ADN genotipadas.
- V. La **eficiencia** de amplificación (E) del método qPCR fue correcta cuando se ensayaron las diluciones seriadas y las mezclas de A1 en A2 (%) de las muestras de referencia, con valores de E entre 90-110%. Sin embargo, cuando se ensayaron las mezclas de A1 en A2 (%) de las muestras genotipadas, la eficiencia no fue óptima (73%).
- VI. El **límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) absolutos** con las muestras de referencia se situó en 73 copias de ADN para el alelo A1 y 730 copias para el alelo A2, indicando que el método qPCR tuvo buena sensibilidad. En cuanto a las muestras genotipadas, fueron de 30,4 copias para el alelo A2 y de 60,8 copias para el alelo el A1.
- VII. El **LOD relativo** con las muestras de referencia fue más bajo que con las muestras genotipadas, pudiéndose detectar hasta un 1% de alelo A1 en alelo A2. El **LOQ relativo** fue del 5% y 10%, en mezclas del alelo A1 en A2 (%) en las muestras de referencia y en las muestras genotipadas, respectivamente.
- VIII. La **repetibilidad** del método qPCR con las diluciones de las muestras de referencia, fue adecuado, presentando sus valores Cq unos CV entre el 1-3% en la repetibilidad intra-ensayo y CV 3-4% en la repetibilidad inter-ensayo.
- IX. El método qPCR presentó una adecuada **selectividad**; cada sonda se unió de forma adecuada a su respectivo alelo y permitieron distinguir entre muestras de genotipo A1A1 (señal de sonda A1, HEX), A1A2 (señal de ambas sondas) y A2A2 (señal de sonda A2, FAM).

- X. El método **qPCR** puesto a punto en el trabajo, se presenta como un método óptimo para el control de calidad de leche A2, puesto que presentó una elevada especificidad y sensibilidad para la determinación de ausencia de alelo A1 en muestras de ADN de leche de vaca.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo, G.A. y Bedoya, M.O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación* 1 (2), 38-42.
- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2014). PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 175-202.
- Alfonso Ruiz, L., Urrutia Vera, O., & Mendizábal Aizpuru, J. A. (2019). Conversión de las explotaciones de vacuno de leche a la producción de leche A2 ante una posible demanda del mercado: posibilidades e implicaciones. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*, 115 (3), 231-251.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Pate, H. R. (2000). Basic Principles of Quantitative PCR. *Molecular Biotechnology*, 15(2), 115-122. <http://doi.org/10.1385/MB:15:2:115>.
- Asledottir, T., Le, T.T., Poulsen, N.A., Devold, T.G., Larsen, L.B. & Vegarud, G.E. (2018). Release of β -casomorphin-7 from bovine milk of different β -casein variants after ex vivo gastrointestinal digestion. *Int. Dairy J.* 81, 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.12.014>.
- Banerjee, S. (2018). A2 Milk: The unknown story about a milk protein. *Acta Scientific Nutritional Health*, 2(3), 28-31.
- Bekuma, A. & Galmessa, U. (2019). A1 β casein: Devil in the milk-A short communication. Approaches in Poultry, *Dairy & Veterinary Sciences*. 7(1):606-608.
- Bonfatti, V., Grigoletto, L., Cecchinato, A., Gallo, L., & Carnier, P. (2008). Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *Journal of Chromatography A*, 1195(1-2), 101-106.
- Brooke-Taylor, S., Dwyer, K., Woodford, K., Kost, N. (2017). Systematic review of the gastrointestinal effects of A1 compared with A2 β -casein. *Adv. Nutr.* 8:739-748.
- Brussow, H. (2013). Nutrition, population growth and disease: a short history of lactose. *Environ Microbiol.* 15:2154–61.
- Bulgari, O., Raineri, M., Gigliotti, C., & Caroli, A. M. (2013). A method for the quantification of the genetic variants of β -casein. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 64(3/4), 101-107.
- Caroli, A., M., Chessa, S., & Erhardt, G. J. (2009). Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5335–52. <http://doi.org/10.3168/jds.2009-2461>.
- Cass, H., Gringras, P., March, J., McKendrick, I., O'Hare, A.E., Owen, L. & Pollin, C. (2008). Absence of urinary opioid peptides in children with autism. *Arch Dis Child*. 93(9):745-50. doi: 10.1136/adc.2006.114389. Epub. PMID: 18337276.
- Chen, X., Lu, L., Xiong, X., Xiong, X., & Liu, Y. (2020). Development of a real-time PCR assay for the identification and quantification of bovine ingredient in processed meat products. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- Chessa, S., Gattolin, S., Finocchiaro, R., Van Kaam, J. T., Marusi, M., & Civati, G. (2019). β -casein A2 variant: is the frequency changing in Holstein cattle? In ASPA 23rd CONGRESS (Vol. 18, No. sup1, pp. 125-126).
- Chia, JSJ, McRae, J.L., Enjapoori, A.K., Lefevre, C.M., Kukuljan, S. & Dwyer, K.M. (2018). Dietary cow's milk protein A1 β -casein increases the incidence of T1D in NOD Mice. *Nutrients*;10, 1291.
- Chuang, L., Cheng, Y., & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35, 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>.
- Clemens, R.A. (2011). Milk A1 and A2 peptides and diabetes. In: *Milk and Milk Products in Human Nutrition 2011* (Vol. 67, pp. 187-195). Karger Publishers.

Dai, R., Fang, Y., Zhao, W., Liu, S., Ding, J., Xu, K., ... & Meng, H. (2016). Identification of alleles and genotypes of β -casein with DNA sequencing analysis in Chinese Holstein cow. *Journal of Dairy Research*, 83(3), 312-316.

Daniloski, D., McCarthy, N. A., & Vasiljevic, T. (2021). Bovine β -Casomorphins: Friends or Foes? A comprehensive assessment of evidence from in vitro and ex vivo studies. *Trends in Food Science & Technology*.

De Noni RJ, FitzGerald HJT, Korhonen Y, LeRoux CT, Livesey I, Thorsdottir D, Tome RW. (2009). Scientific report of EFSA prepared by a DATEX working group on the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. *Eur. Food Saf. Auth.*; 231: 1-107.

De Oliveira, L. S. M., Alves, J. S., Bastos, M. S., da Cruz, V. A. R., Pinto, L. F. B., Tonhati, H., ... & de Camargo, G. M. F. (2021). Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) only have A2A2 genotype for β -casein. *Tropical Animal Health and Production*, 53(1), 1-4.

Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (45), e2565.

Deth, R., Clarke, A., Ni, J. & Trivedi, M. (2016). Clinical evaluation of glutathione concentrations after consumption of milk containing different subtypes of β -casein: Results from a randomized, cross-over clinical trial. *Nutr. J.* 15, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0201-x>.

Dumpler, J., Wohlschläger, H., & Kulozik, U. (2017). Dissociation and coagulation of caseins and whey proteins in concentrated skim milk heated by direct steam injection. *Dairy Science & Technology*, 96(6), 807-826.

EFSA. (2009). Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. European Food Safety Authority. Rep.231, 1–107.

FAO. (2021). Composición de la leche de vaca. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación. Consultado el día 26/05/ 2021. Disponible en internet: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>.

Farrell, H.M.J., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L...., & Swaisgood, H.E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J Dairy Sci* 87: 1641-1674.

FDA. (2019). Guidelines for the validation of analytical methods for nucleic acid sequence-based analysis of food, feed, cosmetics and veterinary products. U.S. Food and Drug Administration, 1 st edition.

Friedman, C. S., Wight, N., Crosson, L. M., White, S. J., & Strenge, R. M. (2014). Validation of a quantitative PCR assay for detection and quantification of 'Candidatus Xenohalotus californiensis'. *Diseases of aquatic organisms*, 108(3), 251-259.

Frister H. (2007). Composition of the milk. In: Kroemker V. Milk Science and Milk Hygiene. *Parey*. 80-102 (in Germany).

Gallagher, S. R., & Desjardins, P. R. (2006). Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in molecular biology*, 76(1), A-3D.

Gallinat J.L., Qanbari, S., Drögemüller, C., Pimentel, ECG., Thaller, G. & Tetens J. (2013). DNA-based identification of novel bovine casein gene variants. *J Dairy Sci.* 96(1): 699-709.

García, S.A.N. (2015). Estudio comparativo de composición química de leche (cabra y vaca). (Tesis doctoral). Universidad de Mexico. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Gigliotti, R., Gutmanis, G., Katiki, L. M., Okino, C. H., de Sena Oliveira, M. C., & Vercesi Filho, A. E. (2020). New high-sensitive rhAmp method for A1 allele detection in A2 milk samples. *Food chemistry*, 313, 126167.

Givens, I., Aikman, P., Gibson, T., & Brown, R. (2013). Proportions of A1, A2, B and C β -casein protein variants in retail milk in the UK. *Food chemistry*, 139(1-4), 549-552.

Guðnason, H., Dufva, M., Bang, D. D., & Wolff, A. (2007). Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic acids research*, 35(19), e127.

Hazard, S. (1997). Variación de la composición de la leche. *Serie Carillanca*.

He, M., Sun, J., Jiang, Z.Q. & Yang, Y.X. (2017). Effects of cow's milk β -casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: A multicentre, randomised controlled study. *Nutr. J.* 16, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12937-017-0275-0>

Hedge, N. (2019). Research on A1 and A2 milk: A1 milk is not a matter of health concern. *Indian J Anim Sci.* 89(7):707–711.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10(4), 413-417.

Ho, S., Woodford, K., Kukuljan, S. & Pal, S. (2014). Comparative effects of A1 versus A2 β -casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 68, 994.

IDT. (2021). Affinity Plus qPCR Probes. Integrated DNA Technologies. (IDTdna.com).

IDT. (2020). Real-time PCR guide: Design, validation, analysis, and troubleshooting. Integrated DNA Technologies (IDTdna.com).

ISO 5725-1, (1994) - Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results — Part 1: General Principles and Definitions. Geneva: ISO - International Organization for Standardization.

Jianqin, S., Leiming, X.U., Xia Lu Gregory, W.Y., Jiayi, N.I. & Clarke, A.J. (2016). Effects of milk containing only A2 β casein versus milk containing both A1 and A2 β casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behaviour of people with self-reported intolerance to traditional cow's milk. *Nutrition J.* 15, 35-51.

Johnson, G., Nolan, T., & Bustin, S. A. (2013). Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. *Methods Mol. Biol.* 943, 1–16. doi: 10.1007/978-1-60327-353-4_1.

Kamiński S., Ruść A. & Cieślińska A. (2006). A note on frequency of A1 and A2 variants of bovine β -casein locus in Polish Holstein bulls. *J Anim Feed Sci* 15: 195–198.

Kamiński, S. Cieslinka, A. & Kostyra, E. (2007). Polymorphism of bovine β -casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics*, vol.48, no.3, p. 189-198.

Kaskous, S. (2020). A1-and A2-Milk and Their Effect on Human Health. *Journal of Food Engineering and Technology*, 9(1), 15-21.

Keating, A. F., Smith, T. J., Ross, R. P., & Cairns, M. T. (2008). A note on the evaluation of a β -casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to β -casomorphin. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 99-104.

Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in microbiology*, 8, 108.

Lamb, M.M., Miller, M., Seifert, J.A., Frederiksen, B., Kroehl, M., Rewers, M. & Norris, J.M. (2015). The effect of childhood cow's milk intake and HLA-DR genotype on risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: The diabetes autoimmunity study in the young. *Pediatr. Diabetes*.16, 31-38.

Landi, V., Gómez, M., Pleguezuelos, J., Gama, L. T., Carolino, N., Delgado, J. V. & Martinez, A. (2011). Study of the effects of kappa casein (CSN3) genotype on milk production breeding value component in murciano-granadina goat breed. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal-AICA*.

Laugesen, M. & Elliott, R. (2003). Ischaemic heart disease, type 1 diabetes, and cow milk A1 β -casein. *N. Zeal. Med. J.*116(1168):U295

Malarmathi, M., Senthil, K.T., Parthiban, M., Muthuramalingam, T., Palanisammi. (2014). A: Analysis of β -casein gene for A1 and A2 genotype using allele specific PCR in Kangeyam and Holstein-Friesian crossbred cattle in Tamil Nadu. *Indian J Anim Sci.* 43: 310-315.

MAPA. (2020a). Industrias Lácteas Anual. Principales Resultados. Año 2020. Edita: © Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. NIPO: 003211007. Catálogo de publicaciones AGE : <https://cpage.mpr.gob.es/>.

MAPA. (2020b). Caracterización del sector español de vacuno de leche. Datos SITRAN 2018. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios.

Martins, L., Fernandes, C., Albuquerque, P., & Tavares, F. (2019). Assessment of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* bacterial load in infected walnut fruits by quantitative PCR. *Plant disease*, 103(10), 2577-2586.

McLachlan, C.N. (2001). B-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med. Hypotheses.*; 56(2): 262-272.

Mercado Michel, B. G., & Vasquez Michel, A. (2018). Estandarización de la PCR en tiempo real por análisis de curvas melting para la detección de tuberculosis drogoresistente. *Revista CON-CIENCIA*, 6(2), 111-122.

Morris, C. A., Hickey, S. M., Cullen, N. G., Prosser, C. G., Anderson, R. M., & Tate, M. L. (2005). Associations between β -casein genotype and milk yield and composition in grazing dairy cows. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 48(4), 441-450.

Mullen, M. P., McClure, M. C., Kearney, J. F., Waters, S. M., Weld, R., Flynn, P., ... & Berry, D. P. (2013). Development of a custom SNP chip for dairy and beef cattle breeding, parentage and research. *Interbull Bulletin*, (47).

Ng-Kwai-Hang K.F., Grosclaude, F. (2002). Genetic polymorphism of milk proteins. In: Fox PF, McSweeney PLH (eds). *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins, Parts A. & B.* Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. p: 739-816.

Ng-Kwai-Hang K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E., & Monardes, H.G. (1984). Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat and protein production by dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 67: 835-840.

NMKL. (2009). Protocol for the Validation of Alternative Microbiological Methods. NordVal International. Søborg.

OIE Terrestrial Manual. (2018). Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 1.1.6, 72–87. <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/accessonline>.

Oleński, K., Cieslinska, A., Suchocki, T., Szyda, J., & Kamiński, S. (2012). Polymorphism in coding and regulatory sequences of β -casein gene is associated with milk production traits in Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 30(1), 12.

Olfao de Matos, A., & Pinto, R. (2011). Extracción de ácidos nucleicos, 29.

Pabinger, S., Rödiger, S., Kriegner, A., Vierlinger, K., & Weinhäusel, A. (2014). A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomolecular Detection and Quantification*, 1(1), 23-33.

Pal, S., Woodford, K., Kukuljan, S. & Ho, S. (2015). Milk intolerance, β -casein and lactose. *Nutrients*, 7(9), 7285-7297.

Parashar, A., & Saini, R. K. (2015). A1 milk and its controversy-a review. *International journal of bioassays*, 4(12), 4611-4619.

Peixoto, C. C., Marcelino, I., Vachiéry, N., Bensaid, A., Martinez, D., Carrondo, M. J., & Alves, P. M. (2005). Quantification of *Ehrlichia ruminantium* by real time PCR. *Veterinary microbiology*, 107(3-4), 273-278.

Pérez de Ciriza López, A. (2017). Desarrollo de un método rápido basado en la PCR a tiempo real para recuento de *Escherichia coli* en leche cruda.

Pokorska, J., Kułaj, D., Dusza, M., Żychlińska-Buczek, J., & Makulska, J. (2016). New rapid method of DNA isolation from milk somatic cells. *Animal Biotechnology*, 27(2), 113-117.

Pons Fita, A. (2015). Determinación de la frecuencia del alelo A2 de la β -caseína (CSN2) en pajillas de toros de la raza *Holstein*. (Trabajo fin de máster). Universitat de Girona. Escola Politècnica Superior.

Popa, O. P., Murariu, D. U. M. I. T. R. U., & Popa, L. O. (2007). Comparison of four DNA extraction methods from invasive freshwater bivalve species (Mollusca: Bivalvia) in Romanian fauna. *Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle Grigore Antipa*, 6, 527-536.

Psifidi, A., Dovas, C. I., & Banos, G. (2010). A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. *Molecular and cellular probes*, 24(2), 93-98.

Rangel, A. H. D. N., Sales, D. C., Urbano, S. A., Galvao, J. G. B., Andrade, J. C. D., & Macêdo, C. D. S. (2016). Lactose intolerance and cow's milk protein allergy. *Food science and Technology*, 36, 179-187.

Reichelt, K.L. & Knivsberg, A.M. (2003). Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? *Nutr Neurosci*.6(1):19-28. doi: 10.1080/1028415021000042839. PMID: 12608733.

Rijnkels M. (2002). Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7(3): 327-345.

Roca, I. & González, A. (2012). Influencia de la raza sobre el rendimiento del ganado vacuno lechero. *Rev. Albeitar, España*, 154: 20.

Rodríguez, M. Á. (2004). Utilización de técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (Elisa) para la detección y cuantificación de diferentes especies animales en Foie Gras. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, servicio de publicaciones. [https://doi.org/ISBN: 978-84-693-1123-3](https://doi.org/ISBN:978-84-693-1123-3)

Ruijter, J. M., Lorenz, P., Tuomi, J. M., Hecker, M., & van den Hoff, M. J. (2014). Fluorescent-increase kinetics of different fluorescent reporters used for qPCR depend on monitoring chemistry, targeted sequence, type of DNA input and PCR efficiency. *Microchimica Acta*, 181(13), 1689-1696.

Sebastiani, C., Arcangeli, C., Ciullo, M., Torricelli, M., Cinti, G., Fisichella, S., & Biagetti, M. (2020). Frequencies evaluation of β -casein gene polymorphisms in dairy cows reared in Central Italy. *Animals*, 10(2), 252.

Sukumaran, S. (2011). Concentration determination of nucleic acids and proteins using the micro-volume bio-spec nano spectrophotometer. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (48).

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78. <https://doi.org/10.1157/13059826>.

Taylor S., Wakem M., Dijkman G., Alsarraj M., & Nguyen M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50: S1-S5.

Tsiatis, A. C., Norris-Kirby, A., Rich, R. G., Hafez, M. J., Gocke, C. D., Eshleman, J. R., & Murphy, K. M. (2010). Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(4), 425-432.

USDA. (2021). Dairy: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, 1-21.

Usman, T., Yu, Y., Liu, C., Fan, Z., & Wang, Y. (2014). Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. *Genet Mol Res*, 13(2), 3319-3328.

Wassermann, S. (2020). A1/A2 β -Casein Charakterisierung mittels Real-Time-PCR (Doctoral dissertation, lmu).

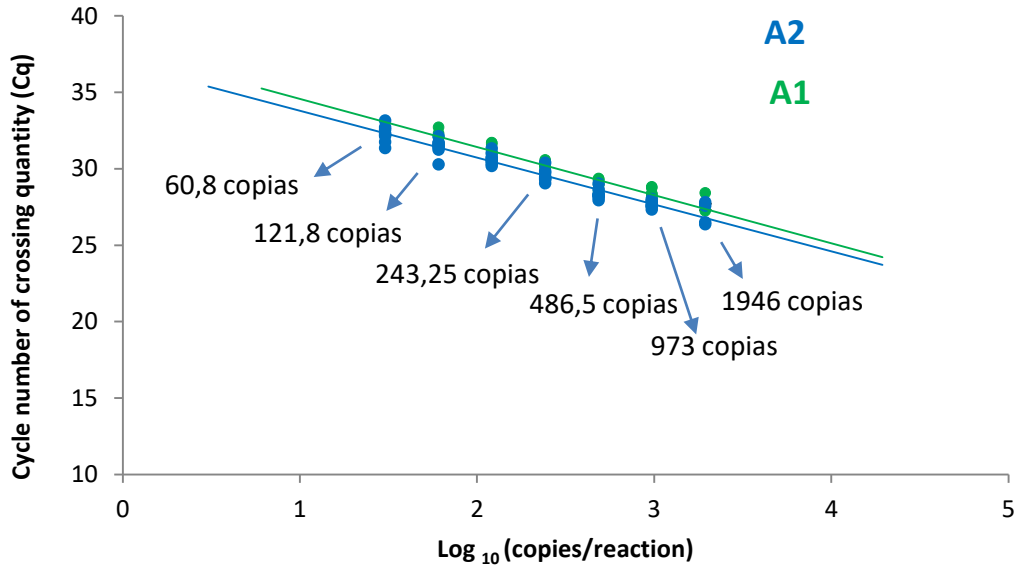
Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., & Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22(1), 130-138.

Yap, M., Feehily, C., Walsh, C. J., Fenelon, M., Murphy, E. F., McAuliffe, F. M., ... & Cotter, P. D. (2020). Evaluation of methods for the reduction of contaminating host reads when performing shotgun metagenomic sequencing of the milk microbiome. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.

Zheng, W., Jiang, L., Lei, Q., Yang, J., Gao, X., Wang, W., ... & Li, G. (2019). Development and validation of quantitative real-time PCR for the detection of residual CHO host cell DNA and optimization of sample pretreatment method in biopharmaceutical products. *Biological procedures online*, 21(1), 1-7.

ANEXOS

Anexo 1. Curva estándar de la muestra genotipada A1A2 de las variantes A1 y A2 del gen de la β -caseína.



Anexo 2. Curva estándar de las mezclas elaboradas con las muestras genotipadas de las variantes A1 y A2 del gen de la β -caseína.

