

PURIFICACIÓN E INMUNODETECCIÓN DE DOS VARIANTES GENÉTICAS DE BETA-LACTOGLOBULINA EN LECHE DE VACA JERSEY

Angélica Tello Sánchez¹, Carlos Regalado González¹, Carlos García Ugalde², Silvia Amaya LLano¹, Aldo Amaro Reyes¹, Blanca E. García Almendárez¹, ¹DIPA, PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, 76010 Querétaro, Qro. ²Ecológico Tierra Viva S.P.R. de R. L., 37804 Dolores Hidalgo, Gto. angelicatello.cv@gmail.com

Palabras clave: Variantes de β -lactoglobulina, leche de vaca Jersey, fórmulas infantiles.

Introducción. En México ha aumentado el consumo de fórmulas infantiles (FI), las cuales se fabrican en su mayoría con leche de bovino, debido a su composición similar a la leche humana. Sin embargo, existen diferencias importantes en la fracción proteica, La β -lactoglobulina (β -Lg) no se encuentra en la leche humana, además de ser reconocida como uno de los alérgenos más potentes en este alimento; existen 11 variantes genéticas, siendo las más comunes la A y la B (1). La respuesta inmune infantil hacia la β -Lg A puede provocar alteraciones gastrointestinales, aumento en la proliferación celular y diabetes infantil tipo 2 (2). El objetivo de esta investigación es la purificación e inmunodetección de la β -Lg, así como de sus variantes A y B en leche de vaca Jersey.

Metodología. Se estableció la estrategia de purificación en muestras de leche cruda mediante un método adaptado para obtener las proteínas del suero (3). La concentración de proteína se obtuvo por el ensayo fluorométrico Qubit (Life Technologies) y la separación electroforética por SDS-PAGE, Urea-PAGE y SDS-PAGE con gradiente. La inmunodetección se realizó con un anticuerpo policlonal anti β -Lg de conejo y para la variante B se utilizó un anticuerpo policlonal anti β -Lg B de oveja. La detección se realizó mediante anticuerpo secundario acoplados a peroxidasa de rábano picante. El revelado se llevó a cabo mediante un kit (Bio-Rad) usando 1-cloro, 4-naftol y peróxido de hidrógeno 0.3%.

Resultados.

Mediante la estrategia de purificación se obtuvieron de 10 mL de leche descremada, las proteínas del suero de leche en concentración $360 \pm 30 \mu\text{g/mL}$ ($500 \mu\text{L}$) (Fig. 1a). El análisis densitométrico reveló que en la etapa de ultrafiltración, el número de proteínas pasó de 7 a 2 y el porcentaje de abundancia de la β -Lg se incrementó de 15% a 77% (Fig. 1b).

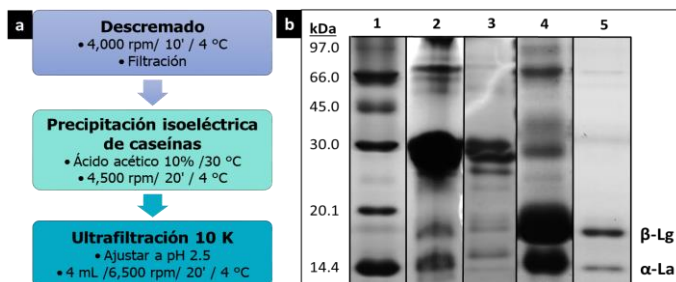


Fig. 1. a) Estrategia de purificación. b) SDS-PAGE 12 %T, carril 1: Marcador LMW 17044601 (GE), carril 2: Leche descremada, carril 3: fracción de caseínas precipitadas, carril 4: Muestras del permeado de la ultrafiltración del suero, carril 5: Muestras del retenido de la ultrafiltración del suero, la cual contiene las proteínas de interés.

El uso de diversos agentes desnaturizantes y gradientes permitió la separación electroforética de las variantes, y mediante SDS-PAGE con gradiente de 8 a 16 %T, se logró observar las variantes A y B de β -Lg (Fig. 2).

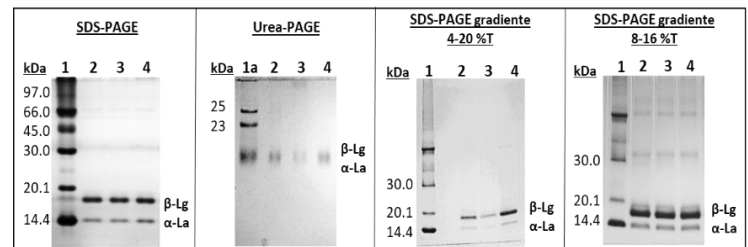


Fig. 2. Resultados de la separación electroforética. SDS-PAGE, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2 a 4: proteínas de suero de leche de vaca Jersey. Urea-PAGE, carril 1a: estándar de α y β Caseína.

La inmunodetección de β -Lg se logró mediante un anticuerpos policlonales (Fig. 3a), los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 3b y 3c.

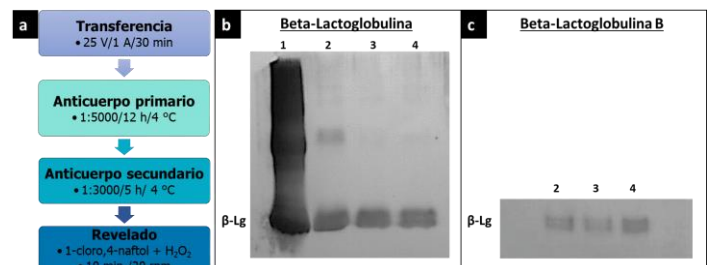


Fig. 3. a) Estrategia para la inmunodetección. b) Resultados del inmunoblot para β -Lg. c) Resultados del inmunoblot para β -Lg B. Carril 1: Estándar de β -Lg bovina (Sigma), carril 2: Muestra de β -Lg de leche Jersey homocigota AA, carril 3: Muestra heterocigota AB y carril 4: muestra homocigota BB.

Conclusiones. Fue posible obtener un método de purificación de las proteínas de suero, conservando la integridad de las proteínas. Se logró la separación de las variantes de β -Lg mediante geles SDS-PAGE con gradiente 8-16 %T. Se realizó la inmunodetección de la β -Lg y sus variantes.

Agradecimientos. CONACYT, proyecto PEI-INNOVAPYME 252440.

Bibliografía.

- Farrell H. *et al.* (2004). *J Dairy Sci*, 87(6), 1641–1674.
- Tai C. *et al.* (2016). *Biomed Res Int*, 2016, 1–12.
- Duarte-Vázquez, M. *et al.* (2017). *Foods*, 6(7), 50.