

Comportamiento inmunoelectroforético de las caseínas y otras proteínas de leche de vaca F-1 Cebú y Holstein

A. GRANADO JIMÉNEZ

Lab. de Inmunogenética, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba

Recibido: 17 Octubre 1973

ABSTRACT. Antisera from casein and other milk protein products were obtained by utilization of a new immunization technique. The caseins obtained from fresh milk and suspended in aluminium showed greater antigenic activity than that found in quality commercial caseins. We consider the antisera obtained from fresh milk more useful than casein antiserum. Although this technique cannot be used as a genetic marker, we nevertheless consider it valuable for the identification of milk protein fractions.

RESUMEN. Se obtuvieron antisueros, anticaseínas y de otras proteínas de la leche utilizando el esquema de inmunización adjunto. Las caseínas obtenidas de leche fresca y suspendidas en hidróxido de Aluminio, tienen una actividad antigenica mayor cuantitativamente que las obtenidas por caseínas comerciales de calidad de reactivos tratadas en la misma forma. Se considera que los antisueros obtenidos de leche completa son más útiles que los de anticaseína. Aunque consideramos no pueda usarse como marcador genético, en cambio es una técnica muy valiosa para la identificación de las fracciones proteicas lácteas.

INTRODUCCION

Como un aporte a nuestra línea de trabajo que consiste en el estudio de parámetros del polimorfismo bioquímico y marcadores genéticos en las diversas razas e híbridos que se formen en nuestro país, se realizó este trabajo que persigue dos objetivos: el primero de ellos ver cómo se comportan frente a sus antisueros las proteínas de la leche de vacas F-1 Cebú-Holstein. El segundo objetivo es estudiar y medir las velocidades

de migración de un grupo de estas proteínas, las Alfa S, Beta, Gamma y Kappa caseínas, las cuales poseen diferentes velocidades de migración en el gel de almidón según sus variantes genéticas. (*Neelin, 1964*).

MATERIALES Y METODOS

Se obtuvieron tres tipos de antisueros, denominados I, II y III. El antisuero I se obtuvo inyectando a los conejos una caseína comercial de calidad de reactivo (B.D.H. casein) más adyuvante incompleto. El antisuero II se obtuvo inyectando a los conejos caseína obtenida de leche fresca de vacas F-1 por precipitación a pH 4.6 y según la técnica adjunta al esquema de inmunización. El antisuero III se obtuvo también según el esquema anterior pero precipitando los prótidos lácteos según la técnica usada por nosotros para precipitar las proteínas séricas (*Granado y cols., 1965*).

Se utilizó para la suspensión de las proteínas de la leche, hidróxido de aluminio por no haberse podido obtener anticuerpos por ninguna de las técnicas preconizadas por otros autores (*Gardnier y cols., 1962 y Martínez Resa y cols., 1969*).

La migración electroforética se hizo sobre gel de agar al 1.2% utilizando, tanto para el gel como para la migración, una solución de veronal acetato de pH 8.6 F.I. 0.075 (*Block y cols., 1955*). La migración duró 90 min. en un mA de 15 y un volt de 10 voltios/cm.

la inmunodifusión se hizo durante 36 horas

Se efectuaron 406 pruebas de leche fresca de F-1 y con las caseínas obtenidas de esas leches. Tanto una como otras se pusieron frente a los tres tipos de antisueros mencionados.

En la lectura de la movilidad electroforética se ha seguido el método de Heremans (*1960*).

Se hicieron pruebas patrones con caseínas de leche con variantes de Kappa caseína conocida (variantes AA, BB y AB) y también con una variante de K caseína AB, obtenida según la técnica de Wake y Mckenzie, (*1961*).

RESULTADOS Y DISCUSION

Las imágenes inmunoelectroforéticas de los antisueros son iguales con la diferencia de una mayor concentración de precipitados en el caso de los antisueros del tipo II.

De las fracciones obtenidas colocando en antisueros tipo I y tipo II frente a las caseínas frescas precipitadas de leche de vacas F-1 se estudiaron tres fracciones que migran hacia el polo positivo y una fracción que migra hacia el polo negativo.

La primera de estas fracciones, denominada por nosotros, CB, tiene una velocidad de migración de 3.3 que se aproxima a la velocidad de migración de la Beta caseína y corresponde por su posición a ese mismo tipo de caseína en el esquema presentado por Gardnier y cols., (1962). La segunda fracción denominada C Alfa S, con una movilidad de 6.8, corresponde al de la caseína Alfa S. La tercera fracción denominada CK, con una movilidad media de 6.06 a 6.72 correspondiente a la Kappa caseína y en la cual no se encontraron diferencias significativas de migración, ni en las muestras desconocidas ni en los patrones conocidos.

La fracción de migración catódica posee una velocidad de 1.9 que corresponde a la Gamma caseína (Fig. 1).

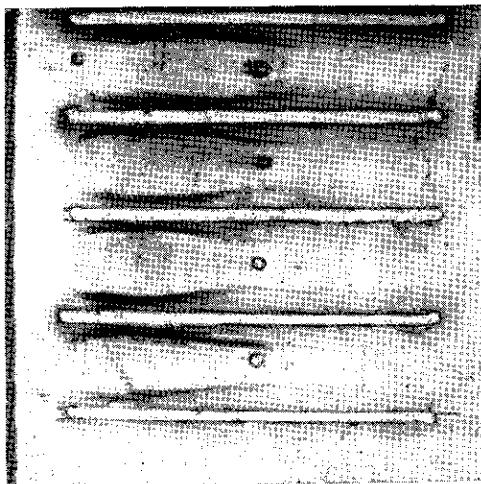


Fig. 1. Inmunoelectroforesis. La fracción inmunoelectroforética correspondiente a la Gamma Caseína es la fracción que se sitúa a la izquierda del punto de migración.

Las leches frescas totales puestas frente a los antisueros I y II presentaron el mismo espectro imunolectroforético que las caseínas solas y las K caseínas se distinguen mejor que en aquellas muestras en que se precipitan las caseínas (Fig. 2).

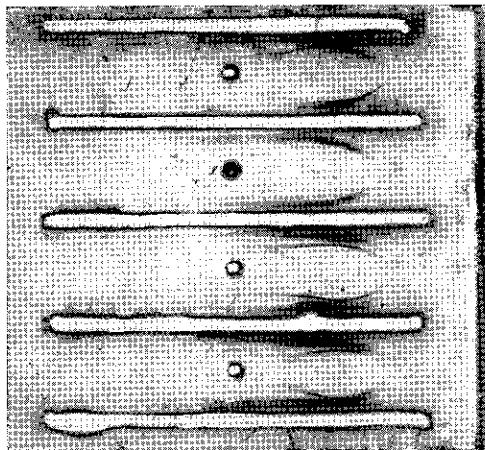


Fig. 2. Las fracciones de Kappa Caseína se observa mejor en las muestras de leche total (1ra. y 2da. de abajo hacia arriba) que las muestras obtenidas por precipitación de la Caseína (3ra. y 4ta.).

Frente a un suero bovino aparece una fracción de movilidad 3.6 equivalente a la lacto-ferrina.

El antisuero III frente a las caseínas da los mismos espectros que los antisueros I y II, lo que nos revela la sensibilidad de los antisueros así como su gran especificidad.

Las leches totales frente a los antisueros III dieron seis fracciones, cuatro que migran hacia el ánodo y dos que lo hacen hacia el cátodo. De las cuatro fracciones que van hacia el polo positivo, tres de ellas coinciden con las ya citadas, Alfa S, Beta y Gamma caseína y la cuarta de una velocidad de migración de 4.2, que corresponde a la lacto albúmina. De las fracciones que migran al polo negativo, una de ellas corresponde a la ya citada Gamma caseína y la otra a las inmunoglobulinas (Fig. 3). Estas

Ig se detectaron también por medio de un antisuero sérico obteniéndose las fracciones A y G como lo asevera también la literatura especializada (Haurowitz, 1968; Buttle, 1969, y Rose y cols., 1970) (Fig. 4).

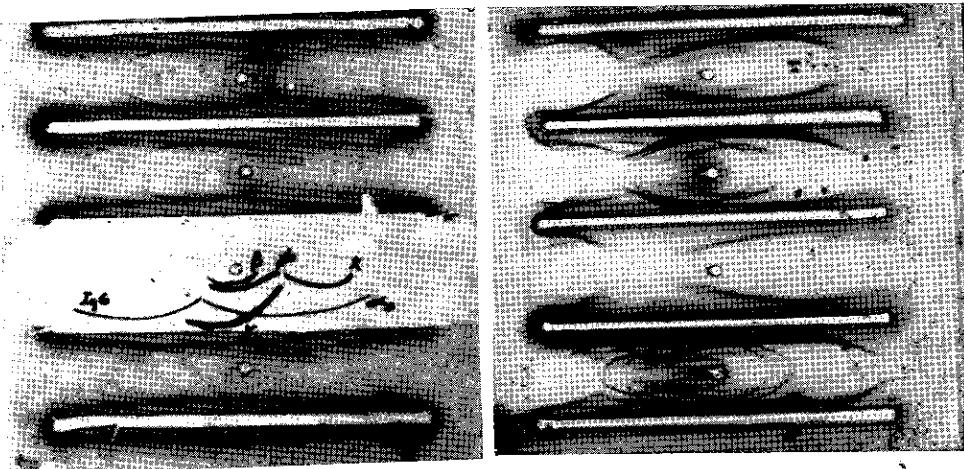


Fig. 3. En el diagrama intercalado estas fracciones se identifican como:

K	Kappa Caseína
Alb	Lacto Albúmina
α_s	Alfa s Caseína
β	Beta Caseína
γ	Ganma Caseína
IgG	Inmunoglobulina

Fig. 4. Inmunolectroforesis en suero, calostro, y leche. Se observan precipitaciones antigenicas frente a antisueros de proteínas séricas bovinas de las siguientes muestras: 1ra. Superior calostro, 2da. Suero de ternero, 3ra. Leche, y 4ta. Suero sanguíneo de bóvido adulto.

CONCLUSIONES

1. Se puede obtener antisueros, anticaseínas y otras proteínas de la leche utilizando el esquema de inmunización adjunto.

2. Los sueros específicos anticaseínas, obtenidos por inyección de caseína extraída de leche fresca de vacas F-1 suspendidas en hidróxido de Aluminio, tienen la misma actividad cualitativa y ligeramente aumentada cuantitativamente que los antisueros obtenidos por inyección de caseínas comerciales en calidad de reactivos.
3. Los antisueros de leche completa presentan, además de todas las fracciones correspondientes a la caseína, las fracciones precipitantes correspondientes a la lacto albúmina y a las inmunoglobulinas.
4. Este antisuero de proteínas lácteas totales es útil para visualizar los diferentes tipos de dichas proteínas.

OBTENCION DE CASEINAS Y PROTEINAS TOTALES DE LA LECHE EN SUSPENSION DE HIDROXIDO DE ALUMINIO

Reactivos: Sulfato alumínico potásico al 10%
Hidróxido de Sodio 5 N

Técnica de precipitación: 50 ml leche fresca
50 ml agua destilada
50 ml de sulfato alumínico potásico

Después de tener preparados los materiales, se unen formando una precipitación, a la cual se le ajusta a un pH 4.6 con hidróxido de sodio 5 N. Una vez logrado, se centrifuga durante 15 min. a 3,000 rpm, separando bien el suero de la mezcla de caseína: el sobrenadante es ajustado a un pH 6.4, a 6.6, logrando con ello la precipitación de las albúminas. Se comienza a centrifugar nuevamente para separar la albúmina del suero. Esta albúmina se mezcla con la caseína inicial, lavándola con suero fisiológico dos veces para eliminar las impurezas que tenga la misma, una última lavada con agua destilada para que el hidróxido que contenga se disuelva en la misma.

ESQUEMA DE INMUNIZACION

Día 1ro.: Al grupo I se le inyectó 1 cc de caseína comercial diluida con penicilina (200,000 U) intramuscularmente en las 4 extremidades, más adyuvante. Al grupo II se le inyectó 1 cc de caseí-

na con hidróxido de sodio intramuscularmente en las 4 extremidades. Al grupo III se le inyectó 1 cc de leche completa con hidróxido alumínico intramuscularmente en las cuatro extremidades.

Día 3ro.: Grupos I y II ídem al día anterior.

Día 5to.: Grupos I y II ídem al primer día.

Grupo III se le inyectó 1 cc de leche diluida en solución de penicilina intraperitonealmente.

Día 8vo.: Grupos I y II ídem al primer día.

Día 10mo.: Grupos I, II y III ídem.

Grupo III ídem al quinto día.

Día 12mo.: Grupos I, II y III ídem.

Día 15to.: Grupos I, II y III ídem.

Día 18vo.: Grupos I, II y III ídem.

Día 21ro.: Grupos I, II y III ídem.

Día 24to.: Grupo I se le inyectó la caseína comercial diluida en penicilina intravenosa.

Grupo II se le inyectó la caseína fresca preparada por nosotros, intravenosa.

Grupo III se le inyectó la leche completa diluida en solución de penicilina intravenosa.

Día 27mo.: Se le extrajo sangre para realizar las pruebas, dando éstas positivas, sacrificando a los conejos para la obtención de la sangre.

REFERENCIAS

BLOCK R., DURRUM E. L. AND SWEIG L. A manual of paper chromatography and paper electrophoresis. Part. 2 Acad. Press. New York, 1955.

BUTTLE E. Bovine Inmunoglobuline. A review. *J. Dairy Science*, 52, 1895, 1969.

GARDNIER J., RIBADEAU D. B., DUMAS B. AND GANTREAU. XVI Int. Dairy Congress, 655,

Dinamarca, 1962.

GRANADO A., PÉREZ ATENCIO R. Y MASSOPUST J. La inmunoelectroforesis. *Rev. Cub. Ped.*, 37, 331, 1965.

HAUROWITZ C. Inmunochemistry and the biosynthesis of antibodies. 83 Inter Science New York, 1968.

HEREMANS J. F. Les globulines seriques du systeme gamma. Leur nature et leur pathologie. Masson, París, 1960.

MARTÍNEZ RESA P., ALVAREZ MORENO C., HERMIDA F. AND CHORDI A. Identification by inmunoelectrophoresis of bovine milk proteins. *J. Dairy Science*, 52, 1, 1969.

NEELIN J. M. Variants of K-cassein revealed by improved starch gel electrophoresis. *J. Dairy Science*, 50, 1, 1964.

ROSE D., BRUNNER J. R., KALAN E. B., LARSON B. L., MELNYCHYN P., SWAISGOOD H. E. AND WAUGH D. F. Nomenclature of the proteins of cow milk. Third revision. *J. Dairy Science*, 53, 1, 1970.

WAKE R. G. Y MCKENZIE H. A. Citado por Gardnier y cols., (opus cit), 1961.