

MINISTERO DELLE POLITICHE  
AGRICOLE E FORESTALI

ASSOCIAZIONE NAZIONALE  
ALLEVATORI SPECIE BUFALINA

UNIVERSITA' FEDERICO II NAPOLI  
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA  
DIPARTIMENTO SCIENZE ZOOTECNICHE  
ED ISPEZIONI DEGLI ALIMENTI



# Atti 3° Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo

## 1<sup>st</sup> Buffalo Symposium of Europe and the Americas

12 - 15 Ottobre 2005  
Capaccio - Paestum (SA)



Regione Campania  
Assessorato all'Agricoltura e  
all'Attività Produttiva



Food and Agriculture Organization



Provincia di Caserta



Comune di Salerno



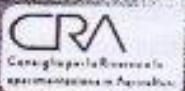
Società Italiana Veterinari  
per Animali da Sottile



Consorzio di Tutela del  
Formaggio Mozzarella di Bufala Campana



Università degli Studi di Napoli  
Paestum



Consiglio Nazionale delle Ricerche  
Istituto per lo Studio e la Produzione  
di Zootecnia BOVA



Istituto Zootecnico Sperimentale  
della Regione Lazio e Toscana



Associazione Nazionale Allevatori  
Bufalini



Associazione Scientifica Produzione Animale



## NEW CONSERVATIVE EXONIC MUTATION AT *BLG* LOCUS IN ITALIAN MEDITERRANEAN BUFFALO

Cosenza, G.; Pauciullo, A.; Gallo, D.; Di Palo, R.; Campanile, G.; Ramunno, L.  
Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli  
"Federico II", Italia. E-mail: [ramunno@unina.it](mailto:ramunno@unina.it)

### Introduction

$\beta$ -lactoglobulin is the fourth most abundant protein in ruminants milk and it represents ~50% of the whey protein component. Bovine was most polymorphic specie at *LGB* locus. Nowadays, 12 variants of bovine  $\beta$ -lg have been described at the DNA level (*LGB* A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,Dr and W). The variants *LGB* A and *LGB* B are the most frequent and they have been associated to quantitative effects on proteins production (2,5 g/l e 1,6 g/l respectively; Mariani *et al.*, 1987). In sheep, the  $\beta$ -lactoglobulin is polymorphic with at least three variants: *LGB* A, B (King *et al.*, 1969) and C (Erhardt *et al.* 1989) associated with dairy performances (reviewed in Moioli *et al.* 1998). Also goat  $\beta$ -lg locus is polymorphic with 4 detected alleles: *LGB* A, B (Di Stasio *et al.*, 1987), C e D (Narain *et al.*, 1992), not associated to difference in milk protein production. However recently differences in  $\beta$ -lg content have been detected in the milk of the Italian Girgentana goats (Chianese *et al.* 2000). On the contrary, no polymorphism at protein and DNA level was described for  $\beta$ -lg in river buffalo specie. In this paper we report the identification of a silent allele at the river buffalo *LGB* locus and describe a method based on PCR-RFLP for its detection.

### Materials and methods

Genomic DNA was extracted from leukocytes obtained from individual blood samples drawn by 60 randomly chosen Italian Mediterranean river buffalo reared in the province of Salerno and Caserta (Italy). A 353 bp fragment spanning the 5<sup>th</sup> exon and part of the 6<sup>th</sup> exon of the buffalo *LGB* gene was amplified by PCR with the following primers: BLG5F (forward: 5'-CCGGAGGTGGACGACG-3') and BLG6R (reverse: 5'-CCCAGAGGCGCTGTCA-3'). The 50  $\mu$ l reaction mix comprised: 100 ng of genomic DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 pmol of each primer, dNTPs each at 400  $\mu$ M, 2.5 U of *Taq* DNA Polymerase (Promega), 0.04% BSA. The amplification programs consisted of an initial cycle at 97°C for 2 min, 63°C for 45 s, 72°C for 1 min. Then 30 cycles at 94°C for 45 s, 63°C for 45 s and 72°C for 1 min with 10 min of extension time in the last cycle. Digestion of 17  $\mu$ l of each PCR amplification was accomplished with 10 U of *Hsp92II* endonuclease (CATG↓) (Promega) for 5 h at 37°C following the supplier's direction for buffer condition. PCR and digestion products were analysed directly by electrophoresis in 3% TBE agarose gel stained with ethidium bromide.

### Results and conclusions

A new single nucleotide polymorphism (SNP) (transition C→T) was detected at the 67<sup>th</sup> nucleotide of the 5<sup>th</sup> exon at the *BLG* locus. This mutation is responsible of the loss of *Hsp92II* restriction site and it identifies a silent allele, named *BLG* A1. The *Hsp92II* digestion of a PCR product (353 bp) is characterised by first invariant fragment of 187 bp and second fragment of 166 bp that is uncutted in TT omozigotes (*BLG* A1 allele) whereas it is restricted into two fragments of 60 bp and 106 bp in CC omozigotes (*BLG* A allele). The allelic frequency of the *BLG* A1 allele, determined in 60 randomly chosen Italian Mediterranean river buffalo reared in 8 different breedings the province of Salerno and Caserta (Italy), was 0.79. The mutation at the *BLG* 5<sup>th</sup> exon represents the first observed polymorphism at *LGB* locus in river buffalo (*Bubalus bubalis*) specie.

### References

Chianese *et al.*, *Proc. 7<sup>th</sup> Int. Conf. Goats*, v.2, p.946-9, 2000; Di Stasio *et al.*, *Ann. Fac. Agraria (SS)*, 1987; Erhardt *et al.*, *Anim. Gen.*, v.20, p.197-204, 1989; King *et al.*, *Anim. Prod.*, v.11, p.53-7, 1969; Mariani *et al.*, *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, v.39, p.431-8, 1987; Moioli *et al.*, *Small Rum. Res.*, v.27, p.185-95, 1998; Narain *et al.*, *5<sup>th</sup> Int. Conf. Goats*, v.1, p.68, 1992.



## UNA MUTAZIONE ESONICA CONSERVATIVA AL *LOCUS* *BLG* NELLA BUFALA MEDITERRANEA ITALIANA

Cosenza, G.; Paucullo, A.; Gallo, D.; Di Palo, R.; Campanile, G.; Ramunno, L.  
Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli  
"Federico II", Italia. E-mail: [ramunno@unina.it](mailto:ramunno@unina.it)

### Introduzione

La  $\beta$ -Ig è la quarta proteina più abbondante prodotta nel latte dei ruminanti e, tra le frazioni sierose proteiche rappresenta circa il 50%. La specie che ha evidenziato il più esteso polimorfismo a tale *locus* è quella bovina per la quale sono state individuate almeno 12 varianti genetiche (*LGB* A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, Dr and W). I due alleli più frequenti *LGB* A e *LGB* B sono stati associati a differenti livelli di sintesi della proteina corrispondente (2,5 g/l e 1,6 g/l rispettivamente; Mariani *et al.*, 1987). Nella specie ovina sono state individuate almeno 3 varianti genetiche: *LGB* A, B (King *et al.*, 1969) e C (Erhardt *et al.* 1989) che sembrano essere associate a differenze nella resa casearia (reviewed in Moioli *et al.* 1998). Anche il *locus* della  $\beta$ -Ig caprina è polimorfo essendo stati evidenziati 4 alleli: *LGB* A, B (Di Stasio *et al.*, 1987), C e D (Narain *et al.*, 1992), nessuno dei quali sembra determinare differenze nel contenuto di tale frazione nel latte. Tuttavia, recentemente sono state evidenziate differenze nel contenuto di  $\beta$ -Ig nel latte prodotto da capre di razza Girgentana Italiana (Chianese *et al.* 2000). Di contro, a tutt'oggi non è stato individuato alcun polimorfismo, né a livello proteico né a livello di DNA, della  $\beta$ -Ig nella specie bufalina. In questo studio è stata evidenziata una mutazione esonica conservativa al *locus* della  $\beta$ -Ig nella bufala mediterranea italiana e viene proposto un metodo basato sulla PCR-RFLP per la sua identificazione.

### Materiali e metodi

Il DNA genomico è stato estratto da campioni individuali di sangue appartenenti a 60 bufali di razza mediterranea italiana scelti a caso, ed allevati in provincia di Salerno e Caserta. Un frammento di 353 bp comprendente il 5° esone e parte del 6° esone del gene della  $\beta$ -Ig è stato amplificato utilizzando i seguenti primer: BLG5F (for: 5'-CGGAGGTGGACGACG-3') e BLG6R (rev: 5'-CCCAGAGGCGCTGTCA-3'). La reazione, in 50  $\mu$ l di mix, è così composta: 100 ng of DNA genomico, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 pmol of ciascun primer, 400  $\mu$ M di ciascun dNTPs, 2.5 U of *Taq* DNA Polymerase (Promega), 0.04% BSA. Il programma di amplificazione ha previsto un iniziale ciclo a 97°C per 2 min, 63°C per 45 s e 72°C per 1 min. Sono seguiti 30 cicli a 94°C per 45 s, 63°C per 45 s e 72°C per 1 min completati da un ultimo ciclo a 72°C per 10 min. 17  $\mu$ l of ciascun prodotto di PCR è stato digerito in apposito buffer, con 10 U dell'endonucleasi *Hsp92II* (CATG↓) (Promega) per 5 h a 37°C. I prodotti di PCR e di digestione sono stati controllati su gel di agarosio al 3%.

### Risultati e conclusioni

Una mutazione esonica conservativa (SNP) (transizione C→T) è stata individuata al 67° nt del 5° esone al *locus* *BLG*. Tale mutazione è responsabile della scomparsa di un sito di restrizione *Hsp92II* ed identifica un nuovo allele silente (*BLG* A1). La digestione del prodotto di PCR (353 bp) è caratterizzato da tre frammenti di restrizione, il primo di 187 bp che resta invariato e un secondo di 166 bp, che negli individui omozigoti TT risulta indigerito (allele *BLG* A1), mentre negli individui CC è ristretto in due frammenti di 60 bp e 106 bp (allele *BLG* A). L'indagine di popolazione condotta su 60 bufali scelti a caso in 8 differenti allevamenti, ha messo in evidenza che la frequenza dell'allele *BLG* A1 è pari a 0.79. La mutazione al quinto esone del gene della  $\beta$ -Ig rappresenta il primo polimorfismo osservato a tale *locus* nella bufala mediterranea italiana.

### Bibliografia

Chianese *et al.*, *Proc. 7<sup>th</sup> Int. Conf. Goats*, v.2, p.946-9, 2000; Di Stasio *et al.*, *Ann. Fac. Agraria (SS)*, 1987; Erhardt *et al.*, *Anim. Gen.*, v.20, p.197-204, 1989; King *et al.*, *Anim. Prod.*, v.11, p.53-7, 1969; Mariani *et al.*, *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, v.39, p.431-8, 1987; Moioli *et al.*, *Small Rum. Res.*, v.27, p.185-95, 1998; Narain *et al.*, *5<sup>th</sup> Int. Conf. Goats*, v.1, p.68, 1992.