

POLYMORPHISM OF BETA-LACTOGLOBULIN GENE IN SELECT POPULATION SLOVAK SPOTTED BREED.

Martina Miluchová, Michal Gábor, Anna Trakovická

ABSTRACT

The goal of the paper was to identify β - lactoglobulin gene polymorphism and analyse of genotype structure in population Slovak spotted breed. The β - lactoglobulin (LGB) expressed in milk and is important in the evaluation of milk production potential and butterfat and protein content. LGB is localized on bovine chromosome 11. The AA genotype of LGB is associated with higher milk yield, the BB genotype with higher fat and casein content and is more desirable for cheese making. The material involved 28 cattle. Bovine genomic DNA was isolated from sperm by commercial kit NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel) and used in order to estimate LGB genotypes by means of PCR RFLP method with using *HaeIII* restriction enzyme. In the population included in the study, genotype AA (148 bp, 99 bp), genotype AB (148 bp, 99 bp, 74 bp), genotype BB (99 bp, 74 bp). There were detected homozygote genotype AA with frequency 50 %, heterozygote genotype AB with frequency 21.43 % and homozygote genotype BB with frequency 28.57 % in evaluated Slovak spotted breed. Results point out that frequency of A allele was high and was represented 60.71 %. Frequency of B allele was 39.29 %.

Keywords: Slovak spotted breed, beta – lactoglobulin, LGB, PCR – RFLP

ÚVOD

Analýza polymorfizmu mliečnych bielkovín poskytuje užitočné informácie pre šľachtiteľov a spracovateľov mlieka. Mnoho výskumných prác poukazuje na to, že určité bielkovinové varianty mlieka môžu byť asociované s produkciou mlieka (Bech, Kristiansen, 1990), jeho zložením (Hill et al., 1997; Lunden, Nisson, Janson, 1997; Robitaille et al., 2002) a produkciou syrov (Hill et al., 1997; Vandenberg et al., 1992).

LGB bol prvý mliečny proteín, u ktorého bol detegovaný polymorfizmus. Pomocou elektroforézy boli zistené dva varianty a boli označené ako $\beta 1$ a $\beta 2$ (A a B) (Aschaffenburg, Drewry, 1955). V súčasnosti je známych 12 variant LGB, z ktorých sú najfrekvencovanejšie A a B varianty. LGB je hlavný srvátkový proteín mlieka kráv a ďalších prežúvavcov ako jeleň, bizón a byvol a niektorých neprežúvavcov ako ošípané, kone, psy, delfíny a veľryby, ale nie je prítomný v ľudskom mlieku (Hambling et al., 1992).

LGB je extrémne stabilný proteín, ktorý existuje pri normálnom pH bovinného mlieka ako dimér s molekulovou hmotnosťou 36 000 Daltonov. Jednovláknový polypeptid s molekulovou hmotnosťou 18 kDa pozostáva zo 162 aminokyselinových zvyškov (Creamer, Parry, Malcolm, 1983).

Bovinný LGB variant A sa odlišuje od variantu B v dvoch aminokyselinách a to asparagín-64 a valín-118. Tieto aminokyseliny sú substituované glycínom a alanínom u variantu B. Biologická funkcia nie je dosiaľ známa. Predpokladá sa, že majú úlohu v metabolizme fosfátov a transporte retinolu a mastných kyselín (Hill et al., 1997).

Cieľom práce bolo zistiť genotypovú štruktúru slovenského strakatého plemena pre β -laktoglobulínový gén.

MATERIÁL A METÓDY

Pre štúdium polymorfizmu vybraného génu bol použitý biologický materiál získaný od 28 býkov slovenského strakatého plemena.

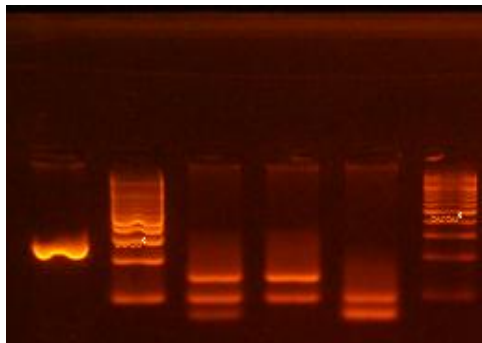
DNA bola izolovaná z insemináčnych dávok pomocou komerčného kitu NucleoSpin Bood (Macherey Nagel) podľa priloženého protokolu s drobnými úpravami.

Analýza polymorfizmu LGB bola uskutočňovaná metódou PCR–RFLP podľa Medrano a Aguilar-Cordova., (1990). PCR reakčná zmes v celkovom objeme 25 μ l obsahovala 50 ng DNA, 1 U/ μ l Taq polymerázy (Fermentas), 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 1 x Reaction buffer, 0,5 μ M každého primeru (LGB FOR 25-mer: 5' - TGT GCT GGA CAC CGA CTA CAA AAA G - 3', LGB REV 24-mer: 5' - GCT CCC GGT ATA TGA CCA CCC TCT - 3'). PCR pozostávala zo štartu 94 °C 2 minúty, 35 cyklov (denaturácia 94 °C 60 sekúnd, annealing 55 °C 60 sekúnd a polymerizácia 72 °C 60 sekúnd), posledný krok – elongácia prebiehal pri 72 °C počas 8 minút. PCR produkty boli vizualizované pod UV transiluminátorom na 2 % agarózovom géle s prídavkom etídium bromidu. PCR produkt bol následne poštiepený reštrikčným enzýmom *HaeIII* pri teplote 37°C po dobu 3 hodín. Štiepne produkty boli vizualizované pod UV transiluminátorom na 3 % agarózovom géle s prídavkom etídium bromidu.

VÝSLEDKY

Amplifikované PCR produkty o veľkosti 247 bp boli štiepené enzýmom *HaeIII* a vizualizované v 3% agarózovom géle.

V populácii hovädzieho dobytku v celkovom počte 28 zvierat boli zistené všetky tri genotypy a to genotyp AA (148 bp, 99 bp) 14 zvieratá, genotyp AB (148 bp, 99 bp, 74) 6 zvierat a genotyp BB (99bp, 74 bp) 8 zvierat. V tabuľke 1 sú hodnoty frekvencií alel a frekvencií genotypov.



Obrázok 1 Reprezentatívne výsledky PCR RFLP analýzy LGB štiepené enzýmom *HaeIII* na 3% agarózovom géle

Dráha 1 - PCR produkt (247 bp), 2 - marker 100 bp DNA Step Ladder (Fermentas); 3 – genotyp AB (148 bp, 99 bp, 74 bp), 4 – genotyp AA (148 bp, 99 bp), 5 – genotyp BB (99 bp, 74 bp), 6 – marker 100 bp DNA Step Ladder (Fermentas)

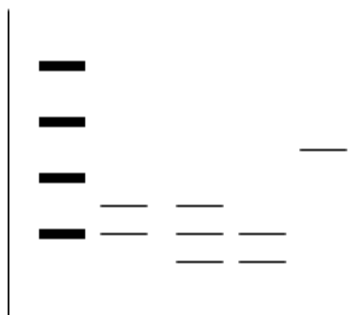


Schéma 1 Schémstické znázornenie štiepneho produktu LGB

1– DNA ladder 100 bp, 2 – genotyp AA (148 bp, 99 bp), 3 – genotyp AB (148 bp, 99 bp, 74 bp), 4 – genotyp BB (99 bp, 74 bp), 5 – PCR produkt (247 bp)

Ako vidieť z tabuľky 1 v populácii sa vyskytoval genotyp AA s frekvenciou 50 %, frekvencia genotypu BB bola 28,57 % a najmenej zastúpený bol genotyp AB s frekvenciou 21,43 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely A bola vysoká a bola v populácii zastúpená 60,71 %. Frekvencia alely B bola 39,29 %.

Na základe χ^2 - testu sme zistili štatisticky preukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov v sledovanej populácii hovädzieho dobytku.

FREKVENCIE	GENOTYPY (n=28)			ALELY		χ^2 d.f. = 2
	AA	AB	BB	A	B	
ABSOLÚTNE	pozorované			34	22	8,50
	14	6	8			
	teoretické					
10,3208	13,3588	4,3204	0,6071	0,3929		
pozorované						
0,5	0,2143	0,2857				
RELATÍVNE	teoretické			0,6071	0,3929	
	0,3686	0,4771	0,1543			

$p < 0,05$

Tabuľka 1 Genotypové a alelové frekvencie beta-laktoglobulínového génu

Lokus	Alely	H _c	PIC	C _a	ENA	V%
BLG	A; B	0,4771	0,3634	0,5229	1,9124	49,48

Tabuľka 2 Efektívnosť pôsobenia alel génu LGB v populácii slovenského strakatého plemena

V analyzovanej populácii slovenského pinzgauského dobytku bol pozorovaný mierny nárast homozygotnosti (0,5229), čo bolo spôsobené vyšším podielom homozygotného genotypu AA v populácii. Efektívnosť pôsobenia alel sa blížila k hornej hranici 2,000 (1,9124). Možná premenlivosť sa realizovala na 49,48 %.

DISKUSIA

Naše údaje korešpondujú s údajmi viacerých autorov. **Curik et al. (1997)** detegovali u plemena simentál vyššiu frekvenciu alely A (52 %). Tieto údaje sú v zhode so zistením **Dinç (2009)**, ktorá pozorovala vyššie zastúpenie alely A u plemien turecké šedé (52,13 %) a holštejn (54,55 %). Naopak **Uhrín et al. (1994)** v populácii hovädzieho dobytku detegovali prevahu alely B (98 %) nad alelou A. **Uhrín et al. (1995)** pozorovali u náhodne vybranej skupiny kráv vysokú frekvenciu alely B (76,9%). Podobne **Bulla et al. (2007)** zistili prevahu alely B (73 %). Vysoká frekvencia alely B (82,79 %) u pinzgauského plemena sa zhoduje aj s údajmi autorov **Miluchová et al. (2009)**.

ZÁVER

V analyzovanej populácii hovädzieho dobytku boli detegované všetky tri genotypy beta-laktoglobulínového génu. Homozygotný genotyp AA

s frekvenciou 50 %, heterozygotný genotyp AB s frekvenciou 21,43 % a homozygotný genotyp BB s frekvenciou 28,54 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely A bola vysoká a bola v populácii zastúpená 60,71 %. Frekvencia alely A bola 39,29 %.

LITERATÚRA

- ASCHAFFENBURG, R., DREWRY, J., 1955. Occurrence of different β -lactoglobulins in cow's milk. In *Nature*, vol. 176, 1955, p. 218-219.
- BECH, A. M., KRISTIANSEN, K.R., 1990. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetics variants on milk yield. In *J. Dairy Sci.*, vol. 57, 1990, p. 53-63.
- BULLA, J., CHRENEK, P., MICHALCOVÁ, A., KRUPOVÁ, Z., SZAREK, J., BULLA, R., LADYKOVÁ, M., ADAMCZYK, K., 2007. Influence of κ -Casein and β -Lactoglobulin genes on milk yield, milk composition and technological properties of the different cattle breeds. In *Biotech*, vol. 54, 2007, p. 60.
- CREAMER, L., PARRY, D., MALCOLM, G., 1983. Secondary structure of β -lactoglobulin B. In *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 227, 1983, p. 98-105.
- CURIK I., HAVRANEK J, SAMARZIJA D., 1997. Milk protein polymorphism and genetic structure of Croatian Simmental cattle. In Milk protein polymorphism. Proceedings of the IDF Seminar held in Palmerston North, New Zealand. *Int Dairy Fed*, 1997, p. 93-99.
- DINÇ H., 2009. *Genotyping of Beta-casein, Kappa-casein and Beta-lactoglobulin Genes in Turkish Native Cattle Breeds and Efforts to Delineate BCM-7 on Human PBMC* : doktorandská práca. Ankara : Middle East Technical University, 2009. 187 p.
- HAMBLING, S.G., McALPINE, A.S., SAWYER, L., 1992. *β -lactoglobulin*. In *Advanced Dairy Chemistry*, vol.1 Proteins. London : Elsevier Applied Science, 1992, p. 141-190.
- HILL, J. P., THRESHER, W. C., BOLAND, M. J., CREAMER, L. K., ANEMA, S. G., MANDERSON, G., OTTER, D. E., PATERSON, G. R., HOWE, R., BURR, R.G., MOTION, R. L., WINDELMAN, A., WICKHAM, B. 1997. *The polymorphism of the milk protein β -lactoglobulin*. In *Milk composition, production and biotechnology* Edited by: Welch RAS, et al. CAB International, Wallingford: UK. 1997, p. 173-213.
- LUNDEN, A., NISSON, M., JANSON, L., 1997. Marked effect of β -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein milk. In *J. Dairy Sci.*, vol. 80, 1997, p. 2996-3005.
- MEDRANO, J.F., AGUILAR-CORDOVA, E., 1990. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. In *Anim. Biotechnol.*, vol. 1, 1990, p. 73 - 77.
- MILUCHOVÁ, M., TRAKOVICKÁ, A., GÁBOR, M., 2009. Molekulárno-genetická detekcia génov CSN3 a LGB v populácii slovenského pinzgauškého plemena metódou MULTIPLEX PCR-RFLP. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, SPU v Nitre, roč. 12, 2009, č. Mimoriadne číslo, s. 450-454, ISSN 1335-258X.
- ROBITAILLE, G., BRITTEN, M., MORISSET, J., PETITCLERC, D., 2002. Quantitative analysis of β -lactoglobulin A and B genetic variants in milk of cows β -lactoglobulin AB through lactation. In *J. Dairy Res.*, vol. 69, 2002, p. 651-654.
- SAMBROOK, J., FRITZ, E. F., MANIATIS, T., 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harb. Lab. Press, USA. 1989. ISBN
- UHRÍN, P., VAŠÍČEK, D., BAUEROVÁ, M., CHRENEK, P., HETÉNYI, L., BULLA, J., 1994. Genotyping of different breeds of the cattle for kappa-casein and beta-lactoglobulin alleles. In 45th Meet. of the Europ. Assoc. for Anim. Produkt. 25.-28.08.1997 in Edinburg, UK, 1994, p. 1-3.
- UHRÍN, P., CHRENEK, P., VAŠÍČEK, D., BAUEROVÁ, M., BULLA, J., 1995. Genotyping of beta-lactoglobulin gene in different breeds of cattle in Slovakia. In *Živočišna Výroba*, vol. 40, no. 2, 1995, p. 49-52.
- VANDENBERG, G., ESCHER, J. T. M., DE KONING, P. J., BOVENHUIS, M., 1992. Genetic polymorphism of κ -casein and β -lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. In *Net. Milk Dairy J.*, vol. 46, 1992, p. 145-168.

PodĎakovanie:

Tento článok bol vytvorený realizáciou projektu VEGA č. 1/0061/10

Kontaktná adresa:

Martina Miluchová, Department of Genetics and Breeding Biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Researches, Slovak University of Agliculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, Email: martina.miluchova@centrum.sk

Michal Gábor, Department of Genetics and Breeding Biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Researches, Slovak University of Agliculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, Email: misogabor@yahoo.com

Anna Trakovická, Department of Genetics and Breeding Biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Researches, Slovak University of Agliculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, Email: Anna.Trakovicka@uniag.sk