

Acta fytotechnica et zootechnica 3
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2010, s. 79–82

HRM ANALÝZA BETA-LAKTOGLOBULÍNÓVÉHO GÉNU SLOVENSKEHO PINZGAUSKÉHO PLEMENA

HRM ANALYSIS OF BETA-LACTOGLOBULINE GENE IN SLOVAK PINZGAU BREED

Martina MILUCHOVÁ, Anna TRAKOVICKÁ, Ondrej KADLEČÍK, Radovan KASARDA, Eva HAZUCHOVÁ

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

The goal of the paper is to identify the β -lactoglobulin gene polymorphism and to analyse the genotype structure of Pinzgau cattle population. The β -lactoglobulin (LGB) is synthesized in milk and is important for 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 sample involved 39 cattle animals. Bovine genomic DNA was isolated by phenol-chloroform deproteinization and ethanol precipitation and used in order to estimate LGB genotypes by means of PCR RFLP method and HRMA. There homozygote genotype AA with frequency 7.69 %, heterozygote genotype AB with frequency 25.64 % and homozygote genotype BB with frequency 66.67 % were detected in evaluated Pinzgau population. The results point out that the frequency of B allele was very high and reached 79.49 % of the population. The frequency of A allele reached 20.51 %.

Key words: pinzgau cattle, beta-lactoglobulin, LGB, PCR RFLP, HRMA

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 and Kristiansen, 1990), jeho zložením (Hill et al., 1997; Lunden, Nis-son and Janson, 1997; Robitaille et al., 2002) a produkciou syrov (Hill et al., 1997; Vandenberg et al., 1992).

LGB bol prvý mliečny proteín pri ktorom bol detegovaný polymorfizmus. Pomocou elektroforézy boli zistené dva varianty a boli označené ako $\beta 1$ a $\beta 2$ (A a B) (Aschaffenburg and Drewry, 1955). V súčasnosti je známych 12 variantov 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 and 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 glycinom a alanínom pri variante 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 pinzgauského dobytká pre β -laktoglobulínový gén.

DNA bola izolovaná fenol-chloroformovou deprotenizáciou a etanolovou precipitáciou (Sambrook et al., 1989).

PCR RFLP

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 (Promega), 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP, 1 \times 10 \times 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 % agarovom géle s prídavkom etídium bromidu. PCR produkt bol následne štiepený reštrikčným enzýmom Hae III pri teplote 37 °C po dobu 3 hodín. Štiepne produkty boli vizualizované pod UV transiluminátorom na 3 % agarózovom géle s prídavkom etídium bromidu.

HRMA

HRM analýza prebiehala na prístroji RotorGene 6000, ktorý bol zakúpený z finančných prostriedkov projektu „Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity“. PCR reakčná zmes v celkovom objeme 25 μ l obsahovala 50 ng DNA, 12,5 μ l SensiMix HRM (Bioline), 1 μ l fluorescenčnej farbičky EvaGreen, 0,5 μ M každého primeru. PCR pozostávala zo štartu 95 °C 10 minút, 35 cyklov (denaturácia 95 °C 60 sekúnd, annealing 55 °C 60 sekúnd a polymerizácia 72 °C 60 sekúnd). Topenie PCR produktu v priebehu HRMA bolo vykonané v rozmedzí teplôt 85 °C až 95 °C s nárastom 0,1 °C. Ako štandardy pre jednotlivé genotypy boli použité vzorky genotypované pomocou PCR RFLP metódy.

Materiál a metódy

Pre štúdium polymorfizmu vybraného génu bol použitý biologický materiál získaný od 39 pinzgauských kráv.

Výsledky a diskusia

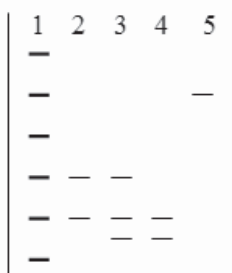
Amplifikované PCR produkty s veľkosťou 247 bp boli štiepené enzýmom Hae III a vizualizované v 3% agarózovom géle.

V populácii hovädzieho dobytku v celkovom počte 39 zvierat boli zistené všetky tri genotypy a to genotyp AA (148 bp, 99 bp) 3 zvieratá, genotyp AB (148 bp, 99 bp, 74) 10 zvierat a genotyp BB (99bp, 74 bp) 26 zvierat. V tabuľke 1 sú hodnoty frekvencií alel a frekvencií genotypov.



Obrázok 1 Reprezentatívne výsledky PCR RFLP analýzy LGB na 3% agarózovom géle
Dráha 1 – marker 50 bp DNA Step Ladder (Promega); 2, 4–8,11,14 – genotyp BB (99 bp, 74 bp); 3,10,12,13 – genotyp AB (148 bp, 99 bp, 74 bp); 9 – genotyp AA (148 bp, 99 bp); 16 – PCR produkt (247 bp)

Figure 1 Representative results of PCR analysis for LGB on 3% agarose gel
Line 1 – marker 50 bp DNA Step Ladder (Promega); 2, 4–8,11,14 – genotype BB (99 bp, 74 bp); 3,10,12,13 – genotype AB (148 bp, 99 bp, 74 bp); 9 – genotype AA (148 bp, 99 bp); 16 – PCR product (247 bp)



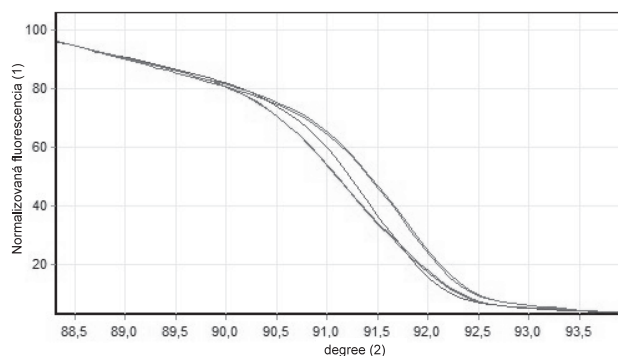
Obrázok 2 Schematické znázornenie štiepeného produktu LGB
1 – DNA ladder 50 bp, 2 – genotyp AA (148 bp, 99 bp), 3 – genotyp AB (148 bp, 99 bp, 74 bp), 4 – genotyp BB (99 bp, 74 bp), 5 – PCR produkt (247 bp)

Figure 2 Schematic image of digested product LGB
1 – DNA ladder 50 bp, 2 – genotype AA (148 bp, 99 bp), 3 – genotype AB (148 bp, 99 bp, 74 bp), 4 – genotype BB (99 bp, 74 bp), 5 – PCR product (247 bp)

Tabuľka 1 Genotypové a alelové frekvencie beta-laktoglobulínového génu

Frekvencie (1)	Genotypy (2) (n = 39)			Alely (3)		χ^2 d.f. = 2
	AA	AB	BB	A	B	
Absolútne (4)	pozorované (6)			16	62	0,20
	3	10	26			
	teoretické (7)					
Relatívne (5)	1,6419	12,7179	24,6402	0,2051	0,7949	
	pozorované (6)					
	0,0769	0,2564	0,6667			
	teoretické (7)					
	0,0421	0,3261	0,6318			

Table 1 Genotype and allele frequencies of beta-lactoglobulin gene
(1) frequencies, (2) genotypes, (3) alleles, (4) absolute, (5) relative, (6) observed, (7) expected



Vzorka (3)	Farba (4)	Genotyp (5)	Spôľahlivosť % (6)
1	■	AB	99,90
3	■	AB	99,90
6	■	AA	100,00
8	■	BB	99,45
9	■	BB	99,45

Obrázok 3 Normalizovaný graf pre HRMA

Figure 3 Normalised Graph for HRMA

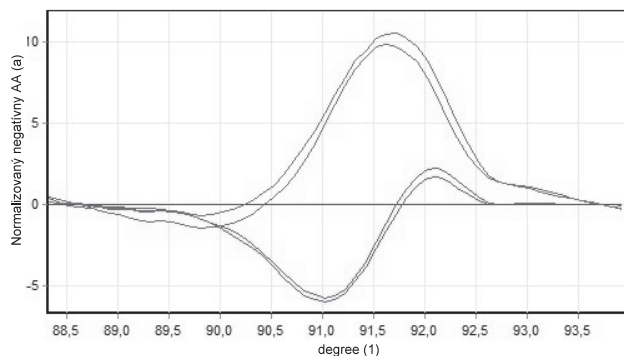
(1) normalised fluorescence, (2) stupeň, (3) sample, (4) colour, (5) genotype, (6) relevance

Ako vidieť z tabuľky 1, v populácii sa vyskytoval genotyp BB s frekvenciou 66,67 %, frekvencia genotypu AB bola 25,64 % a najmenej zastúpený bol genotyp AA s frekvenciou 7,69 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely B bola veľmi vysoká a je v populácii zastúpená 79,49 %. Frekvencia alely A bola 20,51 %.

Na základe χ^2 -testu sme zistili, že rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov hovädzieho dobytku bol štatisticky nepreukazný, čo znamená, že sa v sledovanej populácii zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

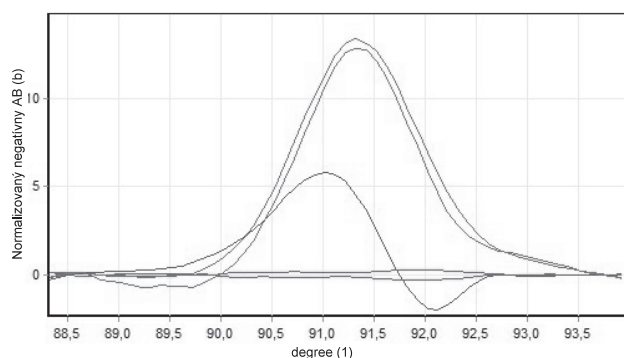
Naše údaje korešpondujú s údajmi viacerých autorov. Uhrín et al. (1994) v populácii hovädzieho dobytku detegovali prevahu alely B (98 %) nad alelou A. Uhrín et al. (1995) detegovali v náhodne vybranej skupine kráv vysokú frekvenciu alely B (76,9%). Podobne Bulla et al. (2007) zistili prevahu alely B (73 %). Vysoká frekvencia alely B (82,79 %) sa zhoduje aj s údajmi autorov Miluchová et al. (2009).

V analyzovanej populácii slovenského pinzgauského dobytku bol pozorovaný vyšší nárast homozygotnosti (0,6739), čo bolo spôsobené vysokým podielom homozygotného genotypu



Obrázok 4a Diferenciačné grafy pre HRMA normalizované na genotypy AA, AB a BB

Figure 4a Difference graphs for HRMA normalised on genotypes AA, AB and BB
(a) normalised minus AA
(1) stupeň



Obrázok 4b Diferenciačné grafy pre HRMA normalizované na genotypy AA, AB a BB

Figure 4b Difference graphs for HRMA normalised on genotypes AA, AB and BB
(b) normalised minus AB
(1) stupeň

BB v populácii. To malo za následok mierny pokles stupňa realizácie novej premenlivosti (33,47 %), čomu zodpovedá aj efektívnosť pôsobenia alelí v populácii (1,4839).

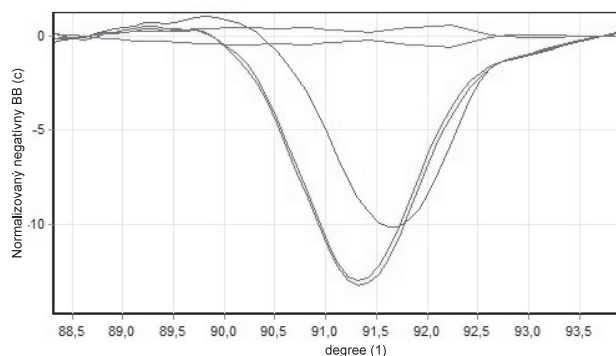
Tabuľka 2 Efektívnosť pôsobenia alelí génu LGB v populácii slovenského pinzgauského dobytky

Lokus1	Alely2	He	PIC	Ca	ENA	V%
BLG	A; B	0,3261	0,2729	0,6739	1,4839	33,47

Table 2 Effectivity of alleles LGB gene function in population of Slovak Pinzgau cattle
(1) locus, (2) alleles

Záver

V analyzovanej populácii hovädzieho dobytky boli detegované všetky tri genotypy beta-laktoglobulínového génu. Homozygotný genotyp AA s frekvenciou 7,69 %, heterozygotný genotyp AB s frekvenciou 25,64 % a homozygotný genotyp BB s frekvenciou 66,67 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely B je veľmi vysoká a je v populácii zastúpená 79,49 %. Frekvencia alely A je 20,51 %.



Obrázok 4c Diferenciačné grafy pre HRMA normalizované na genotypy AA, AB a BB

Figure 4c Difference graphs for HRMA normalised on genotypes AA, AB and BB
(c) normalised minus BB
(1) stupeň

Súhrn

Cieľom práce bolo identifikovať polymorfizmus beta-laktoglobulínového génu a analyzovať genotypovú štruktúru v populácii pinzgauského dobytky. LGB je syntetizovaný v mlieku a je dôležitý pri hodnotení mliekovej produkcie a percenta mliečného tuku a proteínov v mlieku. LGB je lokalizovaný na bovinom chromozóme 11. Genotyp AA LGB je asociovaný s vysokým mliečnym výťažkom a genotyp BB je asociovaný s vysokým obsahom tuku a kazeínov potrebných pre výrobu syrov. Materiál zahŕňal 39 zvierat hovädzieho dobytky. Bovinná genómová DNA bola izolovaná fenol-chloroformovou deproteinizáciou a etanolovou precipitáciou a bola použitá pre zistenie LGB genotypov pomocou PCR RFLP metódy a HRMA. V analyzovanej populácii hovädzieho dobytky bol detegovaný homozygotný genotyp AA s frekvenciou 7,69 %, heterozygotný genotyp AB s frekvenciou 25,64 % a homozygotný genotyp BB s frekvenciou 66,67 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely B bola veľmi vysoká a bola v populácii zastúpená 79,49 %. Frekvencia alely A bola 20,51 %.

Kľúčové slová: pinzgauský dobytok, beta-laktoglobulín, LGB, PCR RFLP, HRMA

Podakovanie

Tento článok bol vytvorený realizáciou projektu „Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity“, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- ASCHAFFENBURG, R. – DREWRY, J. 1955. Occurrence of different β -lactoglobulins in cow's milk. In: Nature, 1955, vol. 176, 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., 1990, vol. 57, 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, 2007, vol. 54, p. 60.

- CREAMER, L. – PARRY, D. – MALCOLM, G. 1983. Secondary structure of β -lactoglobulin B. In: Arch. Bioch. Bioph., 1983, vol. 227, p. 98–105.
- HAMBLING, S.G. – MCALPINE, A.S. – SAWYER, L. 1992. β -lactoglobulin. In: Advanced Dairy Chemistry, Proteins. London : Elsevier Applied Science, vol. 1, 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. 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., 1997, vol. 80, 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. Bio-Technol., 1990, vol. 1, 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, roč. 12, 2009, 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 b-lactoglobulin AB throughout lactation. In: J. Dairy Res., 2002, vol. 69, p. 651–654.
- SAMBROOK, J. – FRITZ, E. F. – MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harb. Lab. Press, USA, 1989.
- UHRÍN, P. – VAŠÍČEK, D. – BAUEROVÁ, M. – CHRENEK, P. – HETÉNYI, L. – BULLA, J. 1994. Genotyping of different breeds of the cattle for κ -casein and β -lactoglobulin alleles. In: 45th Meet. of the Europ. Assoc. for Anim. Produkt. 25.–28. 8. 1997. Edinburg : UK, 1994, p. 1–3.
- UHRÍN, P. – CHRENEK, P. – VAŠÍČEK, D. – BAUEROVÁ, M. – BULLA, J. 1995. Genotyping of β -lactoglobulin gene in different breeds of cattle in Slovakia. In: Živočišna výroba, 1995, vol. 40, no. 2, 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., 1992, vol. 46, p. 145–168.

Kontaktná adresa:

Ing. Martina Miluchová, PhD., Katedra genetiky a plemenárskej biológie, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, e-mail: martina.miluchova@centrum.sk

Acta fytotechnica et zootechnica 3
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2010, s. 82–84

VYUŽITIE NETRADIČNÝCH ADITÍV VO VÝŽIVE BROJLEROVÝCH KURČIAT A ICH VPLYV NA NUTRIČNÚ HODNOTU MÄSA

THE USE OF NON-TRADITIONAL ADDITIVES IN BROILER CHICKENS NUTRITION AND THEIR EFFECT ON THE NUTRITION VALUE OF MEAT

Erika HORNIÁKOVÁ, Edina RUZSÍKOVÁ, Kamaran A. ABAS

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

In the experiment we tested herbal preparations from *Lactuca serriola* L. and from *Rhus coriaria* L. on the nutritional value of chicken meat. The experiment consisted of two control (C1, C2) and three experimental groups (E1, E2, E3). The control was fed a commercial feed mixture without additive (negative control, C1) or with the addition of APC (in the positive control, C2). In the experimental groups we applied the product from the fruit (Sumac) of *Rhus coriaria* plants at 1% (E1) or 2% (E2). The third group was fed a combination of plant (2%) of the Sumac and *Lactuca serriola* in a 1 : 1 ratio. Product from the fruit of *Rhus coriaria* at 2% positively affected ($P < 0.01$) the total mineral content (5.86 %) in thigh meat compared to a commercial feed mixture (4.8 %) and mixture with the addition of APC (4.41 %). Fat reduction (15.77 %) in the thigh muscle and fat storage (6.16 %) caused an increase in breast muscle ($P > 0.05$). The combination of spices (Sumac) with the preparation of the *Lactuca serriola* statistically significantly increased dry matter content in breast muscle (26.11 %), but the concentration of minerals (4.98 %) in the thigh muscle was negatively affected ($P < 0.05$).

Key words: herbs, chicken, breast muscle, thigh muscle, nutritional value

Byliny a koreniny sú používané od dávnych čias na rôzne účely (ochucovadlá, farbivá) vo všetkých častiach sveta. Mnohé tieto rastliny obsahujú špecificky účinné látky a pre svoje liečivé účinky našli uplatnenie v ľudovom liečiteľstve už pred tisíc rokmi (Abas, 2009). Od roku 2006 je v štátoch EÚ zakázané používanie kŕmnych antibiotík a rastových stimulátorov vo výžive hospodárskych zvierat. Tieto opatrenia vyvolali sústredenie pozornosti vedcov na hľadanie možných alternatív nahradenia týchto látok v kŕmnych zmesiach. Jednou z možností ako zabezpečiť požadovaný zdravotný stav a úžitkovosť zvierat vo veľkochovoch je pridávanie výťažkov liečivých a aromatických rastlín do krmív

(Opletal, 1998; Bíro et al., 2010). Flóra niektorých krajín, ako Grécka, Turecka, Číny alebo arabských štátov je bohatým zdrojom druhov liečivých rastlín, z ktorých niektoré boli zdomácnené aj u nás. Typickými predstaviteľmi sú oregáno (*Origanum vulgare*), divá redkev (*Raphanus raphanistrum*) (Eslami, 2006), rozmarín (*Rosmarinus officinalis*) alebo majorán (*Origanum majorana*) (Della, Paraskeva-Hadjichambi and Hadjichambis, 2006), šalát kompasový (*Lactuca serriola*) a škumpa koželužská (*Rhus coriaria*) (Lev, Kislev and Bar-Yosef, 2005). Šalát kompasový je zdomácnená rastlina roniaca mliečnu šťavu pri poranení, ktorá je pravdepodobne divým predchodcom pestovaného šalá-