

Acta fytotechnica et zootechnica 4
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2011, s. 85–87

ANALÝZA POLYMORFIZMU *CSN3* GÉNU V POPULÁCIÍ KRÍŽENIEK SLOVENSKEHO STRAKATÉHO A HOLŠTAJNSKÉHO PLEMENA

ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF THE *CSN3* GENE IN POPULATION OF SLOVAK SPOTTED AND HOLSTEIN CROSSBREDS

Nina MORAVČÍKOVÁ, Anna TRAKOVICKÁ

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

CSN3 gene was suggested as a candidate gene for milk yield, percentage of protein and fat content. *CSN3* variant B is reported to be favorable for milk quality and is considered to be included in breeding strategies of dairy animals. The aim of this paper was to use the PCR – RFLP as a fast and efficient method to detect the genetic variants of *CSN3* gene in dairy cattle followed by use of restriction enzymes *HindIII* for genotyping. The polymorphism of *CSN3* gene was studied in a group of 80 cows (crossed Slovak spotted × Holstein of different share). Genotype AA was the most frequent one with observed frequency of 57.5 %, while the frequency of the AB genotype was lower (36.25 %). The BB genotype was represented with the frequency of 6.25 %. The frequency of alleles A was 0.7563 and B was 0.2437.

Key words: *CSN3*, polymorphism, PCR – RFLP, dairy cattle

Kazeíny sú bielkoviny vylučované bunkami mliečnej žľazy. Tvoria 80 % zo všetkých bielkovín syntetizovaných týmito bunkami v priebehu laktácie. Kazeínový komplex pozostávajúci zo štyroch kazeínov (α_1 , α_2 , β a κ) vytvára nerozpustnú frakciu v mlieku a významne ovplyvňuje skladbu a fyzikálno-chemické vlastnosti mlieka (Grosclaude, 1988). Pri hovädzom dobytku sú gény kazeínov zoskupené na chromozóme 6 (BTA6), vo vnútri 200 kb dlhej oblasti, v zhlukoch kazeínových lokusov obsahujúcich tri paralógy kódujúce kalcium – senzitivne kazeíny ako aj evolučne vzdialený gén kappa – kazeínu (Ferretti et al., 1990).

Molekula kappa – kazeínu je jednoreťazcový polypeptid zložený zo 169 aminokyselín s molekulovou hmotnosťou 19,2 kDa. Bovinný *CSN3* gén je lokalizovaný v oblasti 6q31 a skladá sa z piatich exónov (Threadgill and Womack, 1990). Rodina *CSN3* pozostáva z hlavného voľného uhlíkovodíkového komponentu a niekoľkých minoritných glykozylátových zložiek, s rovnakou aminokyselínovou sekvenciou, ale rozdielnym charakterom a počtom uhlíkovodíkových skupín (MacKinlay and Wake, 1965). Pri hovädzom dobytku bolo identifikovaných 11 genetických variantov. Za veľmi frekventované genetické varianty sú považované alely A a B. Rozdiely medzi nimi spočívajú v substitúcii aminokyselín na 136 a 148 pozícii. Alela A má v reťazci aminokyselín na pozícii 136 treonín a na pozícii 148 kyselínu asparágovú. Alela B má na pozícii 136 izoleucín a na pozícii 148 alanín a takto získava odlišné fyzikálno-chemické vlastnosti (Farrel et al., 2004).

Gén *CSN3* kóduje mliečne bielkoviny, ktoré sú dôležité pre štruktúru a stabilitu kazeínových micel (Boettcher et al., 2004). V prítomnosti vápenatých iónov je *CSN3* úplne rozpustný a je jediným kazeínom, ktorý môže byť spojený s uhlíkovým kofaktorom. Všetky *CSN3* frakcie sú štiepené chymozýnom, čo predstavuje prvý krok pri výrobe syra. Špecifické miesto pôsobenia tohto enzýmu je v peptidovej väzbe medzi fenylalanínom (150) a metionínom (106) (Kučerová et al., 2006). Pre stabilitu kazeínových micel má najväčší význam práve frakcia kappa, ktorá sa pôsobením iónov vápnika nezráža. Účinkom proteolytického enzýmu, nachádzajúceho sa v syridle, sa odštiepi časť frakcie kappa (para – kappa – kazeín), ktorá plní funkciu ochranného

koloidu vo vzťahu ku komplexu kazeínov a z neho vytvoreným micelám. Kľúčový význam z tohto pohľadu má tá frakcia *CSN3*, ktorá sa nachádza na povrchu micely. V malých micelách je väčší pomer kappa – kazeínu ako vo väčších micelách, pričom malé micely sú charakteristické pre homozygotov s genotypom BB, zatiaľ čo veľké micely pre genotyp AA (Huba et al., 2001).

Vplyv prejavu polymorfných variantov *CSN3* na produkčné ukazovatele je najčastejšie asociovaný s výskytom homozygotných alebo heterozygotných genotypov v populácii. Genotyp AA je spájaný s vyššou produkciou mlieka, nižším obsahom tukov a bielkovín, dlhším časom potrebným na syrenie, nižšou kvalitou a produkciou syreniny či menšou výťažnosťou syra. Genotypy AA a BB zvyšujú obsah tuku a obsah bielkovín v mlieku. Genotyp BB má pozitívny vplyv na syriteľnosť, zvyšuje výťažnosť syra, znižuje obsah syrového prachu v srvátke a skracuje dobu syrenia (Kučerová et al., 2006).

Cieľom našej práce bola analýza genotypovej a alelovej štruktúry *CSN3* génu v selektovanej populácii zvierat pomocou metódy PCR – RFLP.

Materiál a metódy

Biologický materiál určený na sledovanie polymorfizmu kandidátskeho génu *CSN3* bol získaný od 80 kusov hovädzieho dobytku (krížanky s rôznym podielom slovenského strakatého a holštajnského plemena) z poľnohospodárskeho podniku zamieraného na produkciu mlieka.

Genómová DNA bola izolovaná z chlpových cibuliek. Bunkový lyzát sme získali pomocou komerčného kitu Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich). Postup izolácie bol v súlade s protokolom komerčného kitu. Pre štúdium polymorfizmu génu *CSN3* sme použili metódu PCR – RFLP podľa metodiky Miluchová et al. (2009a). Na amplifikáciu špecifických cieľových úsekov *CSN3* sme použili primery (Schlieben et al., 1991):

FOR: 5' – GCT GAG CAG GTA TCC TAG TTA T – 3'
REV: 5' – CTT CTT TGA TGT CTC CTT AGA G – 3'

Do PCR reakčnej zmesi v celkovom objeme 20 μ l sme pridávali zložky v nasledovných výsledných koncentráciách: 1 \times Extract-N-Amp reakčný mix 2 \times , 0,5 pM Primer CSN3 10 pM, μ l⁻¹ (KRD) a 4 μ l DNA extraktu. Teplotný a časový režim PCR reakcie pozostával zo štartu – 94 °C 5 minút, 45 cyklov (denaturácia – 94 °C 1 minúta, annealing – 55 °C 1 minúta, polymerizácia – 72 °C 1 minúta) a elongácie prebiehajúcej pri 72 °C počas 8 minút. PCR produkty sme vizualizovali na 2 % agarózovom géle s obsahom interkalačnej farbivky etídium bromidu pod UV transiluminátorom. Naamplifikované PCR produkty sme následne štiepili reštrikčným enzýmom *HindIII* (Promega) pri teplote 37 °C počas 3 hodín. Štiepne produkty boli vizualizované pod UV transiluminátorom na 2 % agarózovom géle s prídavkom etídium bromidu.

Výsledky a diskusia

Amplifikované PCR produkty *CSN3* génu s veľkosťou 443 bp boli štiepené reštrikčným enzýmom *HindIII* a vizualizované na 2 % agarózovom géle. Reštrikčným štiepením 443 bp PCR produktu vznikli štiepne fragmenty, ktoré svojou veľkosťou identifikovali prítomnosť konkrétnej alely. V populácii hovädzieho dobytku v celkovom počte 80 zvierat boli zistené všetky tri genotypy génu *CSN3* a to genotyp AA (443 bp) 46 zvierat, genotyp AB (443 bp, 348 bp, 95 bp) 29 zvierat a genotyp BB (348 bp, 95 bp) 5 zvierat.

V hodnotenej populácii mal najväčšie zastúpenie homozygotný genotyp AA a najmenej zastúpený bol genotyp BB. Prevládajúcou bola alela A s frekvenciou 0,7563. Frekvencia alely B bola 0,2437. Pomer alel sa realizoval aj v genotypových kombináciách na základe čoho bola potvrdená vysoká homozygotnosť populácie (0,6314). Z dôvodu rozdielu frekvencií sa zrealizovala nižšia premenlivosť v populácii, čomu zodpovedá efektívny počet alel (1,5839). Nízka úroveň polymorfnosti lokusu sa zároveň preniesla do nízkej heterozygotnosti testovanej populácie, v ktorej bolo 36,86 % heterozygotov.

Nami zistené údaje v selektovanej populácii zvierat sú porovnateľné s údajmi viacerých autorov. Mácha (1992) zistil pri mliekových plemenách prevahu alely A nad alelou B. Rovnako sa vysoká frekvencia alely A zhoduje s údajmi autorov Miluchová (2008) a Miluchová et al. (2009b). Mederano a Van Eenennaam (1991) uvádzajú prevahu alely A pri holštajnskom plemene a prevahu alely B pri plemene jersey a brown swiss.

Tabuľka 1 Genotypové a alelové frekvencie *CSN3* génu

	Frekvencia (1)	Genotypy (2)			Alely (3)	
		AA	AB	BB	A	B
Križenky (4) (n = 80)	absolútna (5)	46	29	5	121	39
	relatívna (6)	0,575	0,3625	0,0625	0,7563	0,2437

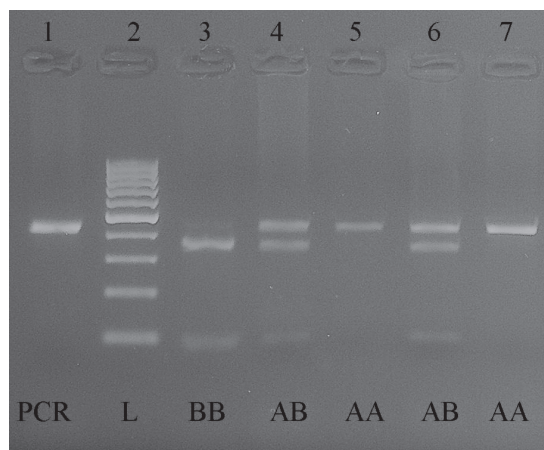
Table 1 Genotype frequencies and allele frequencies of *CSN3* gene
(1) frequency, (2) genotypes, (3) alleles, (4) crossbreeds, (5) absolute, (6) relative

Tabuľka 2 Efektívnosť pôsobenia alel génu *CSN3*

Lokus (1)	Alely (2)	He	PIC	Ca	ENA	V %
<i>CSN3</i>	A; B	0,3686	0,3006	0,6314	1,5839	37,33

He – heterozygotnosť, PIC – polymorfný iniciačný obsah, Ca – koeficient homozygotnosti, ENA – efektívny počet alel, V % – stupeň realizácie možnej premenlivosti
He – heterozygosity, PIC – polymorphic initiator content, Ca – coefficient of homozygosity, ENA – effective number of alleles, V % – degree of realization of the potential variability

Table 2 Efficiency alleles of the gene *CSN3* activity
(1) locus, (2) alleles



Obrázok 1 Reprezentatívne výsledky PCR – RFLP analýzy *CSN3* na 2 % agarózovom géle

1 – PCR produkt (443 bp), 2 – DNA ladder (100 bp), 3 – genotyp BB (348 bp, 95 bp), 4 – genotyp AB (443 bp, 348 bp, 95 bp), 5 – genotyp AA (443 bp), 6 – genotyp AB (443 bp, 348 bp, 95 bp), 7 – genotyp AA (443 bp)

Figure 1 Representative results of PCR – RFLP analysis *CSN3* on 2% agarose gel

1 – PCR product (443 bp), 2 – DNA ladder (100 bp), 3 – genotype BB (348 bp, 95 bp), 4 – genotype AB (443 bp, 348 bp, 95 bp), 5 – genotype AA (443 bp), 6 – genotype AB (443 bp, 348 bp, 95 bp), 7 – genotype AA (443 bp)

Žitný et al. (2001) detegovali pri plemene slovenské strakaté čiastočnú prevahu alely A. Zistená prevaha genotypu AA v sledovanej populácii je v súlade s výsledkami Keatinga et al. (2007). Podobne Sulimova et al. (2007) zistili pri mliekových plemenách najvyššie zastúpenie genotypu AA a najnižšie genotypu BB. V práci Kučerová et al. (2006) uvádzajú pri českéom strakatom dobytku prevahu genotypu AB. Rozdiely vo frekvenciách alel a genotypov sú spôsobené odchýlkami medzi plemenami, ktoré vyplývajú z ich produkčného zamerania. Pri plemenách s vysokou produkciou mlieka sa predpokladá vyššia frekvencia výskytu alely A a pri plemenách, ktoré produkujú menej mlieka s vyšším obsahom bielkovín a tukov naopak alely B.

Záver

Genetickou analýzou *CSN3* génu sme vo vybranej populácii hovädzieho dobytku zistili všetky tri genotypy a to genotyp AA 46 zvierat, genotyp AB 29 zvierat a genotyp BB 5 zvierat. Najväčšie zastúpenie mala alela A s frekvenciou výskytu 0,7563.

Súhrn

CSN3 gén bol navrhnutý ako kandidátsky gén pre produkciu mlieka, percentuálne zastúpenie mliečnych bielkovín a tukov. *CSN3* variant B je priaznivý pre kvalitu mlieka a môže byť začlenený v stratégiách šľachtenia mliekového typu dobytky. Cieľom tejto práce bolo použitie PCR – RFLP ako rýchlej a efektívnej metódy pre detekciu genetických variantov *CSN3* génu s následným využitím reštrikčného enzýmu *HindIII* na stanovenie jeho genotypov. Polymorfizmus *CSN3* génu bol sledovaný v skupine 80 kráv (s rôznym podielom plemien Slovenské strakaté x Holštajn). V sledovanej populácii bol najviac zastúpený genotyp AA s pozorovanou frekvenciou 57,5 %, zatiaľ čo frekvencia genotypu AB bola nižšia (36,25 %). Najmenej zastúpený bol genotyp BB s frekvenciou výskytu 6,25 %. Frekvencia alely A bola 0,7563 a alely B 0,2437.

Kľúčové slová: *CSN3*, polymorfizmus, PCR – RFLP, hovädzí dobytok

Práca vznikla s podporou projektu VEGA. Registračné číslo projektu: 1/0061/10.

Literatúra

- BOETTCHER, P. J. – CAROLI, A. – STELLA, A. – CHESSA, S. – BUDELLI, E. – CANAVESI, F. – GHIROLDI, S. – PAGNACCO, G. 2004. Effects of casein haplotypes on milk production traits in Italian Holstein and Brown Swiss cattle. In: J. Dairy Sci., vol. 87, 2004, no. 12, p. 4311 – 4317.
- FARREL, H. M. – JIMENEZ – FLORES, R. – BLECK, G. T. – BROWN, E. M. – BUTLER, J. E. – CREAMER, L. K. – HICKS, C. L. – HOLLAR, C. M. – NG – KWAI – HANG, F. – SWAISGOOD, H. E. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk – Sixth Revision. In: J. Dairy Sci., vol. 87, 2004, no. 6, p. 1641 – 1674.
- FERRETTI, L. – LEONE, P. – SGARAMELLA, V. 1990. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. In: Nucleic Acids Res., vol. 18, 1990, p. 6829 – 6833.
- GROSCLAUDE, F. 1988. The genetic polymorphism of the main bovine lactoproteins. Relationships with milk yield, composition, and cheese yielding capacity. In: INRA Production Animales, vol. 1, 1988, no. 1, p. 5 – 17.
- HUBA, J. – CHRENEK, P. – VAŠÍČEK, D. 2001. Genetická analýza populácie plemena braunvieh na Slovensku z hľadiska variant kapa kazeínu. In: Slovenský chov, roč. 6, 2001, č. 7, s. 8 – 9. ISSN 1335-1990
- KEATING, A. F. – DAVOREN, P. – SMITH, T. J. – ROSS, R. P. – CAIRUS, M. T. 2007. Bovine κ -Casein Gene Promoter Haplotypes with Potential Implications for Milk Protein Expression. In: J. Dairy Sci., vol. 90, 2007, no. 9, p. 4092 – 4099.
- KUČEROVÁ, J. – METĚJÍČKOVÁ, A. – JANDUROVÁ, O. M. – SØRENSEN, P. – NĚMCOVÁ, E. – ŠTIPKOVÁ, M. – KOTT, T. – BOUŠKA, J. – FRELICH, J. 2006. Milk protein genes *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LGB* and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. In: Czech J. Anim. Sci., vol. 51, 2006, no. 6, p. 241 – 247.
- MACKINLAY, A. G. – WAKE, R. G. 1965. Fractionation of S-carboxymethyl- κ -casein and characterization of the components. In: Biochim. Biophys. Acta, vol. 104, 1965, p. 167 – 180.
- MÁCHA, J. 1992. Genetický polymorfizmus bílkovin mléka a možnosti jeho využití. Brno : MZLU, 1992, 60 s.
- MEDERANO, F. – VAN EENENNAAM, E. 1991. Milk Protein Polymorphism in California Dairy Cattle. In: J. Dairy Sci., vol. 74, 1991, no. 5, p. 1730 – 1742.
- MILUCHOVÁ, M. 2008. Analýza vybraných kandidátskych génov úžitkovosti prežúvavcov metódami analýzy DNA. Nitra : SPU, 2008, 143 s.
- MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – GÁBOR, M. 2009a. Molekulárno-genetická detekcia génov *CSN3* a *LGB* v populácii slovenského pinzgauškého plemena metódou MULTIPLEX PCR – RFLP. In: Acta fytotechnica et zootechnica, 2009, Mimoriadne číslo, s. 450 – 454.
- MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – GÁBOR, M. 2009b. Genetické markéry kvality mlieka a zdravia hovädzieho dobytky. Nitra : SPU, 2009, 71 s. ISBN 978-80-552-0281-5.
- SCHLIEBEN, S. – ERHARDT, G. – SENFT, B. 1991. Genotyping of bovine kappa-casein following DNA sequence amplification and direct sequencing of kappa-CN^F PCR produkt. In: Animal Genetics, vol. 22, 1991, no. 4, p. 333 – 342.
- SULIMOVA, G. E. – AHANI – AZARI, M. – ROSTAMZADEH, J. – MOHAMMAD – ABADI, M. R. – LAZEBNY, O. E. 2007. κ -casein Gene (*CSN3*) Allelic Polymorphism in Russian Cattle Breeds and Its Information Value as a Genetic Marker. In: Russian Journal of Genetics, vol. 43, 2007, no. 1, p. 73 – 79.
- TREADGILL, D. W. – WOMACK, J. E. 1990. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. In: Nucleic Acid Research, vol. 18, 1990, no. 23, p. 6935 – 6942.
- ŽITNÝ, J. – KÚBEK, A. – TRAKOVICKÁ, A. – OSTERTÁG, I. 2001. Štruktúra genotypových variantov kapa – kazeínu mlieka v chránečných chovoch slovenského strakatého plemena. In: Slovenský chov, roč. 6, 2001, č. 5, s. 36 – 37.

Kontaktná adresa:

Ing. Nina Moravčíková, Katedra genetiky a plemenárskej biológie, SPU, Nitra, nina.moravcikova1@gmail.com