

## **ANALYSIS OF GENOMIC MARKER CSN2 IN COW'S MILK**

### **ANALÝZA GENOMICKÉHO MARKERU CSN2 V MLÉCE SKOTU**

**Šrubařová P., Dvořák J.**

Ústav Morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: s.petra@volny.cz, dvorakJ@mendelu.cz

---

#### **ABSTRACT**

The aim of this paper was to analyze, evaluate and interpret genetic variability of beta-casein gene between populations of Normande breed in Czech Republic and Holstein breed in Czech Republic. At first the information about genetic marker and possible associations of marker with human health from literature was processed. Two populations were investigated, Normande breed and Holstein breed. Genotypes were detected using PCR-RFLP. The genetic diversity was studied. The frequencies of alleles and genotypes were calculated. The frequencies between populations were found out. It was established that frequencies of alleles and genotypes were in agreement with literature in most cases. Frequencies of alleles and genotypes of CSN2 are comparable between breeds. These results can be more developed and used for comparison with other cattle breeds in Czech Republic.

**Key words:** genetic polymorphism, beta-casein, Normand breed, Holstein breed, PCR-RFLP.

## ÚVOD

Mléko je významnou složkou potravy člověka a mléčné bílkoviny jsou proto sledovány jako možné genetické markery užitkových vlastností, ale také pro svůj význam ve vztahu k lidskému zdraví. Mléčné výrobky patří k základním potravinám člověka. Obsahují živiny potřebné pro rostoucí organismus dítěte a mladého člověka i látky potřebné pro výživu v dospělosti. Kravské mléko je produkt mléčných žláz samice Tura domácího (*Bos primigenius f. taurus*). Význam mléka spočívá především v obsahu hodnotných bílkovin.

Mnoho lidí trpí alergií na bílkovinu obsaženou v kravském mléce. Alergie na bílkovinu kravského mléka (ABKM) je chápána jako imunologicky podmíněná reakce na některou z bílkovin kravského mléka, která je reprodukovatelná při opakovaném kontaktu s alergenem (Frühauf, 2003). Významnou roli hraje složení bílkovin v mléce, zvláště poměr kaseinů a syrovátkových bílkovin. Je prokázáno, že mléko různých druhů má různou míru citlivosti, i když zdroj jejich bílkovin je naprosto stejný. Nejlepší výživou novorozeňat je mléko matky. Obsahuje totiž mnoho látek, které chrání novorozeně před projitím antigenů skrz střevo, a bílkoviny obsažené v mateřském mléce nejsou alergenní. Proteiny v kravském mléce jsou rozpoznány imunitním systémem některých novorozeňat jako cizí proteiny a tím způsobují alergickou reakci. Není zcela jasné, které bílkoviny kravského mléka jsou hlavními alergeny, ale mnoho studií ukazuje, že se jedná o alfa-kasein a beta-laktoglobulin (Lara-Villoslada, Olivares *et al.*, 2005).

Přibližně 95 % celkového proteinu kravského mléka tvoří 6 tkáňově specifických proteinů, které jsou syntetizovány a sekretovány sekrečním epitelem mléčné žlázy během laktace. Tyto proteiny mohou být rozděleny do dvou skupin: kaseiny (alfaS1-kasein, alfaS2-kasein, beta-kasein a kappa-kasein) a syrovátkové bílkoviny (beta-laktoglobulin a alfa-laktalbumin) (Rincón, Medrano, 2003). Kaseiny a syrovátkové bílkoviny se v některých vlastnostech liší (Tab. 1). Kaseiny tvoří převážný podíl mléčných bílkovin (78-82 %), zbývající část připadá na syrovátkové bílkoviny (18-22 %) (Kučerová *et al.*, 2004). Na všech těchto proteinech byl ukázán genetický polymorfismus způsobený delecí nebo substitucí jedné nebo více bazí v nukleotidové sekvenci genu (Rincón, Medrano, 2003). Množství bílkovin v kravském mléce je během laktace nestálé. Nejstabilnější je obsah kaseinů (alfa, beta, kappa) (Jelínek *et al.*, 2003).

Tab. 1 Srovnání vybraných vlastností kaseinu a syrovátkových bílkovin (Futerová, 1997)

Kasein	Syrovátkové bílkoviny
<ul style="list-style-type: none"><li>• obsahuje převážně hydrofobní oblasti</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• rovnováha mezi hydrofilními a hydrofobními zbytky</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• obsahuje málo cysteinu</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• obsahují cystein a cystin</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• v sekundárním uspořádání převažuje náhodná spirálovitá struktura</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• globulární struktura, převážně helikálního uspořádání</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• je teplotně stabilní</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• snadná tepelná denaturace</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• nestabilní za kyselých podmínek</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• stabilní za mírných kyselých podmínek</li></ul>

Beta-kasein je druhý nejvíce zastoupený protein v mléce po  $\alpha$ -kaseinu. Molekula  $\beta$ -kaseinu se skládá celkem z 209 aminokyselin. Doposud bylo objeveno 12 různých polymorfních variant genu  $\beta$ -kaseinu – *A1, A2, A3, A5, B, C, D, E, F, G, H, I* (Manga, 2007). Pouze čtyři z těchto variant *A1, A2, A3* a *B* se vyskytují v téměř celé populaci chovaných plemen skotu. Nejběžnějšími variantami  $\beta$ -kaseinu jsou alely *A1* a *A2*. Hlavní rozdíl mezi variantami *A1* a *A2* spočívá v rozdílné konformaci bílkovin v aminokyselinovém řetězci. Na 67. místě primárního řetězce proteinu se u varianty *A1* vyskytuje prolin, varianta *A2* obsahuje histidin. Rozdíl je pouze v jedné bázi, v bodové mutaci. U prolinu je složení tripletu v DNA CAT, kdežto u histidinu CCT (Barroso *et al.*, 1999). Původní alelou je alela *A2*. Gen  $\beta$ -kasein (*CSN2*) je lokalizován na 6. chromozómu a má délku 8,5 kb. Lidské, ovčí a kozi mléko a mléko z mimoevropských plemen skotu neobsahuje *beta-kasein A1* (Šlejtr, 2005).

Přítomnost nebo absence alely *A1* je spojována s poměrem nasycených a nenasycených mastných kyselin v mléce. Je známo, že vysoký příjem nasycených mastných kyselin v potravě, je hlavním rizikovým faktorem pro vznik srdečních onemocnění u lidí, zejména v zemích, kde má populace dostatečný příjem potravy. Spojení tuku a mléčného proteinu obsahujícího variantu *beta-kaseinu A1* představuje rizikový zdravotní faktor. V mnoha studiích je popsáno, že konzumace *beta-kaseinu A1* lidmi je spojována s vyšším výskytem určitých onemocnění, jako je například cukrovka (Morris, Tate, 2004). Srovnání varianty *A1* a *A2* uvádí Tab. 2.

Tab. 2 Srovnání *A1* a *A2* varianty *beta-kaseinu*

<b>A1 varianta</b>	<b>A2 varianta</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Je rizikovým faktorem pro diabetes I. typu (dětský)</li> <li>• Ovlivňuje vznik neurologických nebo mentálních onemocnění</li> <li>• Je v asociaci s výskytem koronárních srdečních onemocnění</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Redukuje sérový cholesterol</li> <li>• Snižuje koncentraci lipidů (LDL)</li> <li>• Je vhodná pro prevenci různých cévních onemocnění</li> </ul>

Při trávení  $\beta$ -kaseinu *A1* dochází k odštěpení  $\beta$  - Casomorphinu 7. Jedná se o peptid složený ze sedmi aminokyselin, který se tvoří jen z variant *beta-kaseinu A1, B* a *C*.  $\beta$  - Casomorphin 7 způsobuje ukládání LDL (low density lipoproteins, „špatný“ cholesterol) v cévách a tím zapříčiňuje vznik nebezpečných srdečních onemocnění. Oproti tomu z varianty mléčného proteinu  $\beta$ -kaseinu *A2* nemůže vzniknout  $\beta$  - Casomorphin 7, a proto je zdraví prospěšná, snižuje riziko výskytu chorob spojených s vysokým příjmem LDL (Šrubařová, Stehlík, 2004).  $\beta$  - Casomorphin 7 je biologicky aktivní a může se projevovat jako opiát, narkotikum. Výzkumy na krysách prokázaly, že krysy injektované  $\beta$  - Casomorphinem 7 vykazovaly příznaky podobné schizofrenii.  $\beta$  - Casomorphin 7 také ovlivňuje faktory spojené se srdečním onemocněním, jako například agregaci krevních destiček a LDL oxidaci.

Společnost A2 Corporation Limited byla založena roku 2000 na Novém Zélandě. Důvodem založení byla snaha o komercializaci významného objevu týkajícího se podpory realizace výhod spojených s konzumací mléka. a2 milk™ (A2 mléko) je mléko s přirozeným

obsahem maximálního množství *A2 beta-kaseinu*, který je mnoha studii spojován s příznivým účinkem na zdraví lidí. Od roku 2003 A2 Corporation Limited prodává a2 milk™ na Novém Zélandě a v Austrálii jako zdravější variantu standardního mléka. Ohlasy zákazníků byly velmi pozitivní a nová značka mléka rostla na popularitě tím víc, čím víc farmáři a zpracovatelé produkují tuto variantu zdravého mléka. Společnost v současné době vyvážá zdravé A2 mléko i do Asie a USA a vyjednává kontrakt s Evropou.

Normanské plemeno bylo přivezeno Vikingy do Normandie v 9. a 10. století. Plemenná kniha byla založena ve Francii roku 1883. V současné době je Normanské plemeno ve Francii využíváno pro svou výbornou jatečnou kvalitu a pro produkci mléka na výrobu kvalitních sýrů. Jedná se o velmi přizpůsobivé plemeno. Je schopno přežít v tropech, na zelených pastvinách i v suchých oblastech. Mléko obsahuje 4,4 % tuku a 3,6 % bílkovin a používá se na výrobu proslulých francouzských sýrů, jako je Camembert nebo Pont-Lévêque. V roce 2002 byl v České republice založen Svaz chovatelů Normanského skotu, který koordinuje šlechtění Normanského skotu po odborné stránce v ČR a zabezpečuje vedení plemenné knihy.

Holštýnský skot nebo také někdy holštýnsko-fríský skot patří dnes mezi nerozšířenější a nejprošlechtěnější plemena skotu na světě. Toto plemeno je v celku přizpůsobivé, ale musí se klást velký důraz na zajištění kvalitní potravy. Selekcce se zaměřuje nejen na vysokou mléčnou užitkovost, ale také na dobrou plodnost, pravidelné zabřezávání, produkci životaschopných telat, dobré zdraví a odolnost proti mastitidám a na dobré utváření zevnějšku, zejména vemene a končetin. Mléko obsahuje 4 % tuku a 3,3 % bílkovin. V rámci České republiky je zřízena a vedena jedna společná Plemenná kniha Holštýnského skotu. Jejím nositelem je Svaz chovatelů Holštýnského skotu jako uznané chovatelské sdružení.

## **MATERIÁL A METODIKA**

Biologické vzorky plemene Normande pro genetickou analýzu byly odebírány z 8 chovů v České republice. Soubor vybraných jedinců obsahuje 4 býky a 65 krav. Soubor testovaných zvířat Holštýnského plemene byl náhodně vybrán z databáze Laboratoře Aplikované Molekulární Genetiky (LAMGen), pracoviště genetiky, ústav Morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, skládá se z 68 býků a 1 krávy.

Genomová DNA byla izolována u části vzorků z krve, u části z mléka pomocí kitu JETquick Blood & Cell Culture DNA Spin Kit společnosti GENOMED kolonkovou metodou. Při prvních pokusech o sestavení reakční směsi pro reakci PCR (polymerázová řetězová reakce) bylo vycházeno z práce MEDRANO, J. F.; SHARROW, L., 1991: Genotyping of bovine *beta-casein* loci by restriction site modification of polymerase chain reaction (PCR) amplified genomic DNA. *J. Dairy Sci.* 74: 282. Amplifikace genomové DNA probíhala v podmínkách *in vitro* v automatickém programovatelném termocykleru PTC-100™ firmy MJ Research, Inc., USA, a to ve sterilních zkumavkách o objemu 0,2 ml. Dalším krokem je RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů. V případě genu *beta-casein* se přidává enzym *DdeI*. Naštěpené vzorky se nanáší na 3% agarózový gel.

U jednotlivých souborů zvířat byla provedena kalkulace alelických a genotypových frekvencí podle genotypů identifikovaných metodami ELFO a PCR-RFLP pro sledovanou bílkovinu *beta-kasein* a porovnána mezi vybranými plemeny a s dostupnými literárními údaji.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Frekvence alel genu *beta-kasein* u Normandského skotu byla 0,4493 v případě alely *A1* a 0,5507 u alely *A2*. U Holštýnského skotu byly vypočtené frekvence podobné. Frekvence alely *A1* měla hodnotu 0,4348 a frekvence alely *A2* 0,5652. Při porovnání frekvencí jednotlivých alel u vybraných souborů zvířat se výsledky téměř shodují. Znamená to, že existuje jen minimální rozdíl mezi frekvencemi alel genu *beta-kasein* mezi Normandským a Holštýnským plemenem sledovaných souborů. Rozdíly mezi frekvencemi jednotlivých alel jsou ale výraznější. Více je zastoupena alela *A2*, která není při trávení štěpena na rozdíl od alely *A1*, při jejímž štěpení se uvolňuje  $\beta$  - Casomorphinu 7. Ten má za následek ukládání LDL v cévách a tím zapříčiňuje vznik nebezpečných srdečních onemocnění.

U plemene Normand byly vypočtené frekvence genotypů genu *beta-kasein* *A1A1* 0,2029, *A1A2* 0,4928 a *A2A2* 0,3043. Holštýnské plemeno mělo frekvence genotypů *A1A1* 0,1594, *A1A2* 0,5507 a *A2A2* 0,2899. Poměr genotypů mezi vybranými plemeny je téměř totožný. Rozložení genotypů v populacích odpovídá normálu. Z pohledu vlivu mléka na zdraví člověka by mělo být snahou šlechtitelů i chovatelů rozšířit do populací chovaného mléčného skotu alelu *A2*, která má za následek produkci „zdravého“ *A2* mléka a tím i snížení výskytu chorob spojených s konzumací *A1* mléka. Problémem při této snaze by mohlo být narušení genetické variability. Alela *A1* by mohla být úplně nebo částečně v populaci mléčného skotu potlačena tím by byla narušena rovnováha populace, což je nežádoucí.

Možným řešením by mohlo být vyselektování několika stád mléčného skotu, v nichž by převládal genotyp *A2A2*. Mléko těchto krav a mléčné výrobky by byly určeny pro osoby, které trpí alergií nebo mají problémy s trávením mléčných bílkovin. Ve zbylých stádech by byla zastoupena převážně alela *A1* a mléko těchto dojnic by mohlo být konzumováno jedinci, jimž trávení *beta-kaseinu* *A1* nečiní zdravotní problémy.

Uvedené výsledky jsou srovnatelné s literaturou. Alela *A2* je spojována s pozitivním vlivem na zdraví člověka, proto se již v některých zemích uplatňuje selekce plemenných býků podle genotypu *CSN2*, kdy jsou upřednostňováni jedinci nesoucí tuto alelu, popřípadě genotyp *A2A2*. V České republice není zatím tato selekce rozšířena. Není jisté, zda by chovatelé uvítali ve stádě chovaného dobytka právě výskyt příznivé alely *A2*. Nastaly by totiž problémy s dojením mléka, které by se nesmělo míchat s mlékem krav s nepříznivým genotypem. Zkomplikoval by se svoz a výkup mléka a tím by se také navýšila jeho cena. Pokud by ovšem bylo vyselektováno stádo pouze s výskytem alely *A2*, tj. s genotypem *A2A2*, bylo by vše jednodušší. Pak by ale nastal problém se zpracováním mléka. Mléko by nesmělo být v mlékárně nebo sýrárně smícháno s jiným mlékem, jinak by byl jeho příznivý účinek znehodnocen. To znamená, že by musela být postavena mlékárna, popř. sýrárna, která by zpracovávala pouze tzv. *A2* mléko. Vše je ale finančně velmi náročné a v našich podmínkách podle mého názoru těžko realizovatelné.

## ZÁVĚR

V posledních letech se do popředí zájmu šlechtitelů a chovatelů hospodářských zvířat dostává studium genetických markerů a možnosti jejich uplatnění v selekci a šlechtění. To vše se uskutečňuje s využitím molekulárně-genetických metod, jejichž předmětem zájmu je mimo jiné mapování genomu, studium polymorfismu na úrovni DNA, studium dědičně podmíněných chorob aj.

Cílem této práce bylo stanovit a porovnat frekvence alel a genotypů mezi dvěma soubory skotu s využitím molekulárně-genetických a statistických metod. Jeden soubor tvořili jedinci plemene Normande, původního francouzského plemene, jejich chov se v našich podmínkách moc nedaří, ale jehož genetické ukazatele jsou na výborné úrovni. Dalším souborem byli jedinci plemene Holštýn, jehož chov je v naší zemi velmi rozšířen. Na základě studia literatury byl vybrán genetický marker, *beta-kasein*, který má vliv na zdraví člověka. Pro stanovení genotypů byla využívána metoda PCR-RFLP.

V lokusu *CSN2* byly u obou populací zjišťovány alely *A1* a *A2*. U testovaných populací je v tomto lokusu patrná převaha alely *A2*, avšak s malým rozdílem, což je v souladu s výsledky publikovanými v literatuře. Frekvence genotypů genu *beta-kasein* byly mezi vybranými soubory zvířat téměř srovnatelné. Uvedené výsledky jsou srovnatelné s literaturou. Alela *A2* je spojována s pozitivním vlivem na zdraví člověka, proto by mělo být snahou chovatelů a šlechtitelů rozšířit ji do populace u nás chovaného dojeného skotu.

U vybraného genetického markeru musíme dbát na zachování rovnováhy v populaci. Při vymizení, úplném nebo částečném potlačení některé z alel by mohlo dojít ke ztrátě některých vyznaných znaků populace, což by narušilo diverzitu. Proto je podle mého názoru lepší snažit se vybírat jedince s příznivým genotypem a ty nežádoucí se nesnažit eliminovat z populace úplně.

Výsledky této práce se často shodují s daty publikovanými v literatuře. Dokazují, že obě plemena mají v daném lokusu specifickou variabilitu. Zajímavé je ale srovnání těchto plemen. Holštýnské plemeno vykazuje poměrně dobré výsledky, ale Normandi chovaní u nás jsou v mnohých ukazatelích lepší. Proto by mělo být snahou rozšířit chov tohoto francouzského plemene i u nás.

## LITERATURA

Barroso A., Dunner S., Canón J. (1999): Use of PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism. *J. Anim. Sci.*, 77: 2629-2632.

Frühauf P. (2003): Prevence, diagnostika a terapie alergie na bílkovinu kravského mléka [online]. [cit. 2007-03-24]. Dostupný z WWW: <<http://www.pediatriepropraxi.cz/artkey/ped-200304-0007.php>>.

Futerová J. (1997): Genetický polymorfismus kappa-kaseinu a beta-laktoglobulinu ve vztahu k užitkovým vlastnostem skotu. Praha. 140 s. Dizertační práce.

Jelínek P., et al. (2003): Fyziologie hospodářských zvířat. 1. vyd. Brno : MZLU v Brně. 414 s. ISBN 80-7157-644-1.

Kučerová J., et al. (2004): Genetický marker *CSN3* a ukazatele mléčné užitkovosti. *Náš chov*, 12: 30-31.

Lara-Villoslada F, Olivares M, Xaus J. (2005): The balance between caseins and whey proteins in cow's milk determines its allergenicity. *J.Dairy Science*, 88(5): 1654-1660.

Manga I. (2007): Polymorfizmus  $\beta$ -kazeínu u skotu - selekcie na A2 alelu. *Náš chov*, 4:50-51.

Morris Ch.A., Tate M.L. (2004): Method for altering fatty acid composition of milk. A2 CORPORATION LIMITED.WO 2004/004450. PCT/NZ2003/000140. A01K 67/00. 15.1.2004.

Rincón G, Medrano J.F. (2003): Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR. *J.Anim.Breed.Genet.*,120: 331-337.

Šlejtr J. (2005): Šlechtíme na genetický typ pro mléčný beta kasein II [online]. [cit. 2007-03-24]. Dostupný z WWW:<[http://old.naturalgenetics.cz/Soubory/kasein/Beta%20kasein\\_genotyp.pdf](http://old.naturalgenetics.cz/Soubory/kasein/Beta%20kasein_genotyp.pdf)>.

Šrubařová P., Stehlík L. (2004): Produkce "zdravého" mléka s využitím genetických markerů u plemene Normandského skotu. In X. mezinárodní vědecká konference studentů a doktorandů. s. 39-40. ISBN 80-8069-352-8.