

## OŽKŲ KAPA KAZEINO GENO POLIMORFIZMAS

Lina Baltrėnaitė, Janina Kriauzienė, Ilona Miceikienė

Lietuvos veterinarijos akademija, Gyvūnų veisimo ir genetikos katedra,

K. Janušausko gyvūnų genetikos laboratorija, Tilžės g. 18, Kaunas, LT- 47181; el. paštas: genetikalab@lva.lt

**Santrauka.** Ožkų kazeinų genetinis polimorfizmas kelia didelį mokslininkų susidomėjimą dėl ryšio su pieno sudėties ir technologinėmis savybėmis, svarbiomis sūrių gamybai. Ožkų pienas taip pat yra svarbus žmogaus mityboje dėl kitokios nei galvijų pienas sudėties. Šio darbo tikslas buvo ištirti pieno baltymo kapa kazeino genetinių variantų paplitimą PGR-RFLP metodu Lietuvoje veisiamose pieninių ožkų veislėse – Lietuvos vietinėje, Zaneno, Čekijos baltojoje, Vokietijos baltojoje. 459 bazių porų kapa kazeino fragmento sukarpymas fermentais suformavo A ir B aleliams 54 bp, 51 bp ir 354 bp fragmentus, C aleliui – 54 bp ir 405 bp fragmentus. A ir B aleliai vyravo visose tirtose veislėse, įvairavo nuo 0,83 iki 1 dažniu, tuo tarpu C alelis žemu dažniu su didžiausia verte rastas Lietuvos vietinėje veislėje – 1,7 proc., bet visai nerasta Vokietijos baltojoje veislėje.

**Raktažodžiai:** polimorfizmas, kapa kazeino genas, pienas, ožka, PGR-RFIP.

## GOAT KAPPA CASEIN GENE POLYMORPHISM

Lina Baltrėnaitė, Janina Kriauzienė, Ilona Miceikienė

Lithuanian Veterinary Academy, Department of Animal Breeding and Genetics, K. Janušauskas Laboratory of Animal Genetics, Tilžės 18, Kaunas LT-47181, Lithuania, e-mail: genetikalab@lva.lt

**Summary.** The genetic polymorphism of goat caseins has raised a considerable research interest due to its relationship with milk composition and technological characteristics important for cheese making. The goat milk also is important in human dietary as it quite different in composition from bovine milk. The aim of this study was to identify milk protein kappa casein gene polymorphism by PCR-RFLP method in goat populations bred in Lithuania- Lithuanian native, Saanen, German White and Czek White. Digestion of 459 bp kappa casein gene region produced three fragments of 54, 51 and 354 bp for alleles A and B while allele C generated only two fragments 54 and 405 bp. The A and B alleles were predominant in all studied populations ranging from 0.83 to 1 while C allele was present at a low frequency with highest value in Lithuanian native – 1.7%, and not found in German White breed.

**Key words:** polymorphism, kappa casein gene, milk, goat, PCR-RFLP.

**Įvadas.** Atrajotojų piene randami 6 pagrindiniai baltymai, skiriami į dvi grupes: kazeinus ( $\alpha$ s1,  $\alpha$ s2, beta ir kapa) ir išrūgų baltymus (betalaktoglobulinas ir alfalaktoalbuminas). Keturi kazeinai sudaro pieno baltymų pagrindą t. y. 76–86 proc. bendro baltymų kiekio (Swaisgood, 1992). Literatūroje minimas alfa s1, alfa s2, beta ir kapa kazeinus koduojančių genų polimorfizmas (Glosclaude et al., 1994). Kapa kazeinas yra labai svarbus micelių formavimuisi ir stabilizavimuisi ir veikia pieno perdirbamasias savybes. Sūrių gamyba paremta kapa kazeino Phe105-Met106 peptidinių jungčių ardymu, veikiant fermentais ar karščiu. Taip išlaisvinamas polinis domenai, ir micelė gali koaguluoti. Kapa kazeinas, kuris labai polimorfiškas tarp galvijų, yra pakankamai monomorfiškas avyse (Kaminski, 1996; Baltrėnaitė, 2003; Miceikienė et al., 2005; Miceikienė et al., 2006; Pečiulaitienė et al., 2006). Literatūroje minima, kad kapa kazeino B variantas susijęs su didesniu bendru kazeino kiekiu ir didesne kazeino santykine dalimi nei su išrūgų baltymais. Susijimas tiesiogiai veikia pieno perdirbamasias savybes ir duoda didesnę sūrių išėigą (Ng-Kwai-Hang, 1998).

Ožkų kapa kazeiną pirmieji išskyrė C. A. Zittle ir J. H. Custer 1966-aisiais, o 1973 m. mokslininkas B. C. Richardson nustatė šio baltymo aminorūgščių seką. Ožkų kapa kazeino geno nukleotidų seka buvo ištirta 1993 metais (Coll et al., 1993). Kapa kazeino geną sudaro penki egzoniai, iš kurių daugiau nei 90 proc. subrendusį baltymą

koduojančios srities yra randama priešpaskutiniame egzone. Žinant kapa kazeino svarbą pieno technologinėms savybėms, kapa kazeino geno polimorfizmas daugelio mokslininkų intensyviai tiriama įvairiose gyvūnų rūšyse, taip pat ir ožkų (Di Luccia et al., 1990; Jaubert, Martin, 1992; Law, Tziboula, 1993; Angulo et al., 1994; Recio et al., 1997).

**Darbo tikslas** – ištirti pieno baltymo kapa kazeino genetinių variantų paplitimą Lietuvoje veisiamų pieninių ožkų veislėse.

**Medžiagos ir metodai.** Pieno baltymo kapa kazeino genetiniams variantams tirti mėginiai paimti iš Lietuvos vietinių, Zaneno, Čekijos baltųjų, Vokietijos baltųjų veislių ožkų.

Plaukai, išpešti su svogūnėliais, pieno baltymo kapa kazeino genui ištirti imti į vienkartinius maišelius. DNR iš plaukų išskirta greituoju metodu su „Chelex“. Ožkų pieno baltymo kapa kazeino genai identifikuoti PGR–RFIP (polimerazės grandinės reakcija, restrikcinių fragmentų ilgio polimorfizmas) metodu (Coll et al., 1993).

Kapa kazeino geno variantams nustatyti PGR reakcijai panaudoti šie pradmenys: tiesioginis 5'-TGT-GCT-GAG-TAG-GTA-TCC-TAG-TTA-TGG -3' ir atvirkštinis 3'-GAT-TCC-TCT-GTA-GTT-TCT-CCT-GTT-GCG-5'. PGR reakcija atlikta panaudojus šiuos reagentus: ddH<sub>2</sub>O, 10xPCR buferis, 200 μM dNTP, 1,5 μM MgCl<sub>2</sub>, 0,6 v. v. Taq polimerazės (MBI „Fermentas“), 0,4 μM kiekvieno

pradmens, 100 ng tiramų ožkų DNR. PGR reakcija atlikta amplifikatoriuje (AppliedBiosystem; GeneAmp PCR System 2700) tokiu režimu: 95°C temperatūroje 5 min.; 10 ciklą (97°C temperatūroje 15 sek., 63°C temperatūroje 1 min., 72°C temperatūroje 1 min. 30 sek.); 25 ciklai (95°C temperatūroje 30 sek., 63°C temperatūroje 1 min., 72°C temperatūroje 1 min. 30 sek.); 72°C temperatūroje 5 min. Amplifikuotas PGR produktas (459 bp dydžio) karpytas panaudojant 10 v. v. *Alw44I* restrikcinio fermento 37°C temperatūroje per naktį ir fermentu *BseNI* 10 v. v. 65°C temperatūroje 6 val. Karpytas PGR produktas elektroforezės būdu frakcionuotas 2 proc. agarozės gelyje, 100 V, 35 min. Gelis dažomas etidžio bromidu 15–20 min. ir analizuojamas UV šviesoje (bangos ilgis 300 nm).

**Statistinė duomenų analizė.** Geno dažnumas kiekvienoje veislėje ir visoje populiacijoje buvo apskaičiuotas tiesioginiu genų skaičiavimo metodu. Skaičiavimai atlikti statistiniu R paketu (Gentlemen, Ihaka., 1997). Nukrypimas nuo Hardy-Weinbergo dėsnio buvo patikrintas  $F_{is}$  fiksacijos indeksu (Nei, 1987) taikant formulę  $(h_e - h_o)/h_e$ .

**Tyrimų rezultatai.** Tyrėme penkiose ožkų veislėse kapa kazeino geno polimorfizmą. Ištirtos 82 ožkos: Lietu-

vos vietinių – 23, Zaneno – 21, Čekijos baltųjų – 20, Vokietijos baltųjų – 18. Tyrimo metu gautas 459 bp polimerazinės grandininės reakcijos produktas. Agarozės gelyje frakcionuotų DNR fragmentų dydžiai priklausė nuo kapa kazeino geno alelių dydžių – A+B aleliai duoda 54 bp, 51 bp ir 354 bp fragmentus; C alelis – 54 bp ir 405 bp fragmentus.

Kapa kazeino geno polimorfinių nukleotidų vietos yra 309 ir 591 bazių porose ir atitinkamai 65 ir 159 aminorūgščių baltymo molekulėje vietose. Esant kapa kazeino A aleliui geno 309 bazių poroje randamas guanino nukleotidas, esant B aleliui – taip pat guanino nukleotidas, o esant C aleliui – adenino nukleotidas. Esant kapa kazeino A aleliui geno 591 bazių poroje randamas timino nukleotidas, esant B aleliui – taip pat timino nukleotidas, o esant C aleliui – citozino nukleotidas. Baltymo molekulės 65 aminorūgščių vietoje esant A tiek B aleliui yra valino aminorūgštis, o esant C aleliui – izoleucino aminorūgštis. Baltymo molekulės 159 aminorūgščių vietoje esant ir A, ir B aleliui yra serino aminorūgštis, o esant C aleliui – prolino aminorūgštis (1 lentelė).

1 lentelė. Ožkų kapa kazeino geno variantai

Nukleotido vieta*	Aminorūgšties vieta*	Ožkų alelių variantai**			Genotipavimas***
		A	B	C	
309	65	G (Val)	G (Val)	A (Ile)	<i>BseNI</i>
591	159	T (Ser)	T (Ser)	C (Pro)	<i>Alw44I</i>

\* Kapa kazeino geno polimorfinių nukleotidų ir atitinkamų aminorūgščių baltymo molekulėje vieta

\*\* Nukleotidai, esantys kiekvieno alelio polimorfinėje vietoje. Pakitusi aminorūgštis pažymėta skliausteliuose

\*\*\* Restrikciniai fermentai panaudoti PGR-RFIP genotipuoti

2 lentelė. Kapa kazeino alelių dažniai Lietuvoje veisiamų ožkų veislėse

Veislė	Gyvulių skaičius	A+B alelių dažnis*	C alelio dažnis*
Lietuvos vietinė	23	0,83	0,17
Zaneno	21	0,86	0,14
Čekijos baltoji	20	0,92	0,08
Vokietijos baltoji	18	1,00	0
Iš viso tarp tirtų ožkų:	82	0,89	0,11

\*Alelių dažniai buvo genotipuoti su *BseNI* ir *Alw44I* restriktažėmis. A ir B aleliai rodo guaniną ir timiną atitinkamai 309 ir 591 pozicijose, tuo tarpu C alelis rodo adenino ir citozino nukleotidą tose pačiose pozicijose.

3 lentelė. Kapa kazeino genotipų dažniai Lietuvoje veisiamų ožkų veislėse

Veislė	Gyvulių skaičius	A+B/A+B genotipas	A+B/C genotipas	C/C genotipas
Lietuvos vietinė	23	0,74	0,17	0,09
Zaneno	21	0,80	0,10	0,10
Čekijos baltoji	20	0,85	0,15	0
Vokietijos baltoji	18	1,0	0	0
Iš viso tarp tirtų ožkų:	82	0,84	0,11	0,05

Kapa kazeino geno C alelis didžiausiu dažniu (0,17) rastas Lietuvos vietinių ožkų veislėje, gana dideliu dažniu (0,14) – Zaneno ožkų veislėje ir visai nerastas Vokietijos

baltųjų ožkų veislėje. Visoje tirtoje grupėje C alelį turėjo tik 11 proc. ožkų (2 lentelė).

Kapa kazeino geno A+B/A+B genotipas buvo daž-

niausiai pasitaikantis visose ištirtose veislėse (0,74–1,00). Mažiausiai pasikartojantis buvo C/C genotipas (0,00–0,09). Dviejose veislėse, t. y. Čekijos baltojoje ir Vokietijos baltojoje, C/C genotipo visai nerasta. 84 proc. tirtos grupės turėjo A+B/A+B genotipą, 11 proc. – A+B/C genotipą ir 5 proc. – C/C genotipą (3 lentelė).

Įvertinus kapa kazeino geno lokuso heterozigotiškumą visoje tirtoje grupėje buvo rastas nežymus jo trūkumas. Vidutinė rasta ožkų kapa kazeino geno heterozigotiškumo

reikšmė ( $H_0=0,19$ ) buvo truputį mažesnė už numatomą ( $H_e=0,26$ ), bet nerasta nukrypimo nuo Hardi-Weinbergo dėsnio.

**Aptarimas ir išvados.** Kapa kazeino genas tirtas Italijos, Ispanijos, Vokietijos, Prancūzijos, Vengrijos ožkų veislėse (Caroli et al., 2001; Sachi et al., 2001; Senese et al., 2001; Yahyaoui et al., 2001; Feligni et al., 2002; Veress et al., 2004; Chiatti et al., 2005). Mūsų tyrimų rezultatai koreliuoja su kitų mokslininkų rezultatais (4 lentelė).

4 lentelė. Kapa kazeino geno A+B ir C alelių dažniai Vengrijoje, Ispanijoje ir Prancūzijoje veisiamų ožkų veislėse

Veislė (skaičius)	A+B aleliai	C alelis	Nuoroda į šaltinį
Malagvena (17)	1	0	Yahyaoui et al. (2001)
Pajoja (11)	1	0	Yahyaoui et al. (2001)
Kanarija (48)	0,99	0,01	Yahyaoui et al. (2001)
Murcijano-Granadina (38)	0,99	0,01	Yahyaoui et al. (2001)
Zaneno (33)	0,89	0,11	Yahyaoui et al. (2001)
Vengrų melžiama (109)	0,85	0,15	Veress et al. (2004)

Kapa kazeino C alelio dažnis įvairavo tarp mūsų šalyje veisiamų ožkų veislių nuo 0 Vokietijos baltosios veislėje iki 0,17 Lietuvos vietinėje, panašiai kaip ir Vengrijoje, Ispanijoje ir Prancūzijoje veisiamose ožkų veislėse – nuo 0 iki 0,15. Kapa kazeino A+B alelių dažnis tarp Lietuvoje veisiamų ožkų veislių įvairavo nuo 0,83 iki 1, o Vengrijoje, Ispanijoje ir Prancūzijoje veisiamų ožkų veislėse – nuo 0,85 iki 1. Zaneno ožkų veislės Prancūzijoje C alelio dažnis buvo panašus kaip ir Zaneno veislės Lietuvoje, atitinkamai 0,11 ir 0,14 (Yahyaoui et al., 2001; Veress et al., 2004). Apibendrinę tyrimų rezultatus galime pateikti tokias išvadas:

- Pirmą kartą kapa kazeino geno polimorfizmas buvo tirtas Lietuvoje auginamų ožkų veislėse.

- Kapa kazeino geno C alelis didžiausiu dažniu (0,17) rastas Lietuvos vietinių ožkų veislėje ir visai nerastas Vokiečių baltųjų ožkų veislėje. Visoje tirtoje grupėje C alelį turėjo tik 11 proc. ožkų.

- Kapa kazeino geno A+B/A+B genotipas buvo dažniausiai pasitaikantis Vokiečių baltojoje veislėje, o C/C genotipas – Zaneno veislėje. Dviejose veislėse, t. y. Čekijos baltojoje ir Vokietijos baltojoje C/C genotipo visai nerastas.

- Kapa kazeino geno lokuso mažesnis nei prognozuojamas heterozigotiškumas rodo nežymiai sumažėjusią viduveislinę genetinę įvairovę.

Šiuolaikiniai molekulinės genetikos metodai sudaro galimybę identifikuoti ožkų genotipe esančius ir pieno baltymų įvairovę apsprendžiančius genus. Nuo pieno esančių baltymų tipo, kartu ir nuo genotipe esančių juos apsprendžiančių genų priklauso ne tik pieno kokybė, bet ir jo perdirbimo galimybės bei tinkamumas vienų ar kitų pieno produktų gamybai. Ožkų veislių charakteristika pagal kapa kazeino geno įvairovę gali būti pritaikyta kuriant selekcines programas, sudarant kryžminimo schemas, identifikuojant gyvulius, bioįvairovės ir filogenetinės analizės tikslais.

#### Literatūra

1. Angulo C., Diaz-Carillo E., Munoz A., Alonso A., Jimenez I., Serradilla J. M. Effect of electrophoretic goat's  $\kappa$ -casein polymorphism on milk yield and main components yield. V World Congress on Genetic Applied to Livestock Production Guelph. 1994. T. 19. P. 333–336.
2. Baltrėnaitė L. Pieno baltymų polimorfizmas: Genetinių variantų aptikimas ir išplitimas Lietuvos galvijų veislėse. Magistrantūros baigiamasis darbas. 2003.
3. Caroli A., Jonn O., Budelli E., Bolla P., Jager S., Erhardt G. Genetic polymorphism of  $\kappa$ -casein in Italian and German goat breeds. Animal Genetics. EAAP-52nd Annual Meeting, Budapest, Hungary. 2001. P. 17.
4. Coll A., Folch J. M., Sanchez A. Nucleotide sequence of the goat  $\kappa$ -casein cDNA. Journal of Animal Science. 1993. (78). P. 973–977.
5. Chiatti F., Caroli A., Chessa S., Bolla P., Pagnacco G. Relationships between goat  $\kappa$ -casein (CSN3) polymorphism and milk composition. The role of Biotechnology Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March. 2005. P. 163–164.
6. Di Luccia A., Mauriello R., Chianese L., Moio L., Addeo F. Kappa casein polymorphism in caprine milk. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia. 1990. (41). P. 305–314.
7. Feligni M., Cubric-Curik V., Parma P., Curik I., Greppi G. F., Enne G. Polymorphism of Casein in Italian Goat Breeds: A New ACRS-PCR Designed DNA Test for Discrimination of A and B Alleles. Food Technol. Biotechnol. 2002. T. 40. (4). P. 293–298.
8. Gentlemen R., Ihaka R. Notes on R: A programming environment for data analysis and graphics. Department of statistics University of Auckland. 1997.
9. Grosclaude F., Ricordeau G., Martin P., Remeuf F., Vassal L., Bouillon J. (From gene to cheese: the polymorphism of the caprin  $\alpha$ s1-casein, its effects and evolution) INRA Productions Animales. 1994. (7). P. 3–19.
10. Jaubert A., Martin P. Reverse phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of  $\alpha$ s1 and  $\alpha$ s2 genetic variants. Lait. 1992. (72). P. 235–247.
11. Kaminski S. Bovine  $\kappa$ -casein gene: molecular nature and application in dairy cattle breeding. Journal of Applied Genetics. 1996. (37). P. 179–196.

12. Law A. J. R., Tziboul, A. Fractionation of caprine  $\kappa$ -casein and examination of polymorphism by FPLC. *Milchwissenschaft*. 1993. (48). P. 68–71.
13. Miceikienė I., Pečiulaitienė N., Baltrėnaitė L., Skinkytė R., Indriulytė R. Association of cattle genetic markers with performance traits. *Biologija*. ISSN 1392-0146. 2006. Nr.1. P.24–29.
14. Miceikienė I., Pečiulaitienė N., Petraškienė R. Milk protein genotypes and their association with milk composition traits in the Lithuanian dairy cattle. *Medycyna Weterinarnyjna*. Lublin. ISSN 0025–8628. 2005. Nr.61 (4) P. 394–397.
15. Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA. 1987.
16. Ng-Kwai-Hang K. F. Genetic polymorphism of milk proteins: relationships with production traits, milk composition and technological properties. *Canadian Journal of Animal Science*. 1998. (78). P. 131–147.
17. Pečiulaitienė N., Miceikienė I., Mišeikienė R. Pieno baltymų alfa s1-kapa kazeinų genotipų derinių paplitimas ir ryšys su Lietuvos pieninių galvijų veislių produktyvumu. *Veterinarija ir Zootechnika*. ISSN 1392-2130. 2006. T. 34 (56). P. 56–61.
18. Recio I., Perez-Rodriguez M. L., Amigo L., Ramos M. Study of the polymorphism of caprine milk caseins by capillary electrophoresis. *Journal of Dairy Research*. 1997. (64). P. 515–523.
19. Richardson B.C., Creamer L. K., Pearce K. M. Comparative micelle structure. I. The isolation and chemical characterization of caprine  $\kappa$ -casein. *Biochimica Biophysica Acta*. 1992. T. 70. P. 709–712.
20. Sachi P., Budelli E., Ceriotti G., Chessa S., Maione S., Sartore S., Caroli A., Cauvin E. Casein genetic variability in five Italian goat breeds. *Animal Genetics*. EAAP-52nd Annual Meeting, Budapest, Hungary. 2001. P. 11.
21. Senese C., Blasi M., Lanza A., Rosati A., Urciuoli M., Di Gregorio P., Rando A., Masina P. Genetic characterization at the CSN1S1 locus of a goat population reared in Basilicata (Italy). *Animal Genetics*. EAAP-52nd Annual Meeting, Budapest, Hungary. 2001. P. 11.
22. Swaisgood H. E. Chemistry of the caseins. In *Advanced Dairy Chemistry- 1. Proteins*, (Ed. P. F. Fox). London: Elsevier Applied Science. 1992. P. 63–110
23. Yahyaoui M. H., Coll A., Sanchez A., Folch J. M. Genetic Polymorphism of the caprine kappa casein gene. *J. Dairy Res*. 2001. (68). P. 209–216.
24. Veress Gy., Kusza Z S., Bosze S., Kukovics S., Javor A. Polymorphism of the  $\alpha$ s1-casein and  $\beta$ -lactoglobulin genes in the Hungarian Milk Goat. *South African Journal of Animal Science*. 2004. (34). P. 20–23.
25. Zittle C. A., Custer J. H. Identification of the  $\kappa$ -casein among the components of whole goat casein. *Journal of Dairy Science*. T. 40. P. 788–791.