

**β -kazeīna (CSN2) alēlās formas A2 izlases iespējas
Latvijas brūnās (LB) un Latvijas zilās (LZ) šķirnes populācijās
Improved Selection Opportunities for the Desirable β -Casein (CSN2)
Allele A2 in Latvian Brown (LB) and Latvian Blue (LZ) Cattle Breeds**

Dace Smiltiņa¹, Andris Bāliņš¹, Ziedonis Grīslis²

Latvijas Lauksaimniecības universitāte, Lauksaimniecības Fakultāte

¹Molekulārās ģenētikas pētījumu laboratorija,

²Agrobiotehnoloģijas institūts

Abstract. The aim of this study was to perform an initial characterization of milk quality at the protein level of β -casein (CSN2) alleles A1 (CSN2A1) and A2 (CSN2A2) in two different Latvian cattle breeds (Latvian Brown and Latvian Blue) in the Molecular genetics research Laboratory in Latvia University of Agriculture. Frequencies of CSN2 gene alleles were determined in 191 animals from the Latvian Brown (LB) and Latvian Blue (LZ) breeds by means of PCR-RFLP analysis. The genotyping of CSN2 alleles (A1 and A2) is of the practical importance since the CSN2A1 maybe associated with the liberation of β -casomorphin-7 and other bioactive peptides with the opioid nature and cause of human non-communicable diseases. The results obtained are as follows: the LB breed (n = 96) allele's frequency of CSN2A1 is 0.703, the LZ breed (n = 95) allele's frequency of CSN2A1 is 0.811. The relatively high incidence of the CSN2 allele A2 is also characterisation for the Latvian cows breed populations and this special allele distribution could be used to develop selection strategies to breed specialised lines of Latvian local breeds.

Key words: cattle, β -casein, genetic polymorphism of β -casein, BCM-7, gene assisted selection (GAS).

Ievads

Piena šķirņu dzīvniekiem visbiežāk sastopamās CSN2 alēlās formas ir A1(CSN2A1) un A2 (CSN2A2), kuras atšķiras ar 67. pozīciju: alēlei A1 ir histidīns, alēlei A2 – prolīns (Eigel et al., 1984). CSN2A1 visplašāk izplatīts Holšteinas šķirnē, bet CSN2A2 – Džersijas šķirnes govīm. Zinātniskajā literatūrā atrodam norādes par riskantām govju proteīnu formām, kas var būt nelabvēlīgas lietošanai cilvēku uzturā. Daži piena proteīni ir aktīvu peptīdu – opioīdu avots (Kostyra et al., 2004). 1990.-to gadu nogalē parādījās ziņojumi par CSN2A1 kā riska faktoru 1. tipa diabēta *mellitus* (Elliot et al., 1999) un išēmiskās sirds slimības izraisīšanā (McLachlan, 2001). Kā peptīdu ar morfinam līdzīgu aktivitāti 1979. gadā pirmo reizi no CSN2A1 izolēja beta-kazamorfīnu-7 (BCM-7) (Brantl et al., 1979) ar izteiktu opioīdu aktivitāti (Kurek et al., 1992). Hidrolizēta CSN2A1 varianta pienā BCM-7 līmenis ir četrkārt augstāks kā CSN2A2 piena gadījumā (vidēji 11.59 un 2.87 $\mu\text{g mg}^{-1}$). Svaigā pienā novēroja BCM-7 minimālas atliekas (Cieslinska et al., 2007). Parādījās norādes, ka bovīnais BCM-7 ir riska faktors cilvēku išēmiskajai sirds saslimšanai (IHD), aterosklerozei, 1. tipa diabētam un mazuļu pēkšņas nāves sindromam (McLachlan, 2001; Laugesen and Elliott, 2003). Augsts CSN2A1 piena patēriņš ir IHD riska faktors (McLachlan, 2001). Novērots 1. tipa *mellitus* diabēta (DM-1) sastopamības pieaugums globāli par 3% gadā. Islandē, kur govīm pārsvarā ir CSN2A2, diabēta un sirds slimību gadījumu skaits ir zems. Ticamu asociāciju starp CSN2A1 (bet ne CSN2A2) piena

patēriņu un DM-1 gadījumiem uzrāda epidemioloģiskie rādītāji, CSN2A1 saturoša piena patēriņš augsti korelē ($r=0.75$) ar līdz 15 gadus vecu bērnu DM-1 saslimstību 16 pasaules valstīs (McLachlan, 2001; Laugesen, Elliott, 2003).

Jaunzēlandē 2000. gadā nodibināja A2 Corporation Ltd., kura testē govīs un realizē tikai CSN2A2 pienu. Kopš 2003. gada korporācija CSN2A2 pienu realizē Jaunzēlandē, Austrālijā ar marku Premium Brand A2, kā arī ASV, Āzijā (A2 Corporation, 2006).

Materiāls un metodika

Pētījumus veicām LLU LF Molekulāri ģenētisko pētījumu laboratorijā Jelgavā laikā no 2009. gada septembra mēneša. Pētījumā analizējām no 62 ganāmpulkiem iegūtu 191 LB un LZ šķirnes govju biomateriālu (asinis). Analizējamie 96 paraugi iegūti LB šķirnei no 38 ganāmpulkiem. Lielākā LB paraugu kopa iegūta no MPS „Vecauce” ganāmpulka - 36 paraugi. LZ šķirnes 95 paraugi iegūti 24 ganāmpulkos. Paraugi tika ņemti sterilos vakutaineros ar K3-EDTA un uzglabāti pie $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. DNS ekstrakts, lietojot QIAGEN DNeasy Blood @ Tissue kit (ASV) uz jaunākās tehnoloģijas iekārtas QIA cube no QIAGEN (ASV).

CSN2A1 un CSN2A2 identificēti, pielietojot PCR-RFLP metodiku (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) pēc J. F. Medrano un L. Šarova (Medrano, Sharrow, 1991) un C. N. Maklahlana (McLachlan, 2006), veicot modifikācijas. Amplifikācija veikta ar Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Medrano, Sharrow, 1991). DNS Praimeri PCR amplifikācijai veidoti pēc C. N. Maklahlana (McLachlan, 2006). PCR apstrādāti ar *DdeI* endonucleāzi (New England BioLabs, the USA). DNS fragmentu vizualizācijai elektroforēze veikta 3% agarozes gēlā, lietojot Cleaver Scientific Ltd Multi SUB midi elektroforēzes iekārtu, iegūtie rezultāti nolasīti pie UV starojuma transiluminatorā.

Alēļu frekvences kalkulētas, lietojot atbilstošu dialēlo lokusu ekspresiju, kā arī izmantota Microsoft Office Excel 2007 standarta programma.

Rezultāti un diskusija

Turpinot mūsu agrāk veiktos LB un LZ šķirnes govju CSN2 ģenētiskā polimorfisma pētījumus (Smiltiņa et al., 2010), palielinājām analizējamo paraugkopu apjomus. Materiāla analīze apstiprināja agrāk iegūto rezultātu, ka audzētajās Latvijas šķirnēs nevēlamā forma CSN2A1 ir pārsvarā (1. tab.): LB šķirnē CSN2A1 biežums ir 0.703, LZ šķirnē – 0.811.

1.tabula

Govju CSN2A1 un CSN2A2 biežumu rezultāti Latvijas brūnās (LB) un Latvijas zilās (LZ) šķirnes populācijās, 2010. g.

Genotipi un alēles	Latvijas brūnā				Latvijas zilā			
	n	Genotipu un alēļu biežumi			n	Genotipu un alēļu biežumi		
		Faktiski	HW	+/-		Faktiski	HW	+/-
A1A1	41	0.427	0.494	-0.067	61	0.642	0.658	-0.016
A1A2	53	0.552	0.418	0.135	32	0.337	0.307	0.030
A2A2	2	0.021	0.088	-0.067	2	0.021	0.036	-0.015
Kopā	96	1.000	1.000	-	95	1.000	1.000	-
A1(p)	-	0.703	-	-	-	0.811	-	-
A2 (q)	-	0.297	-	-	-	0.189	-	-

Paskaidrojumi: n = gadījumu skaits; p = CSN2 alēles A1 biežums; q = CSN2 alēles A2 biežums, HW = Hardy – Veinberga ģenētiskā līdzsvara vērtējums.

CSN2A1 biežumu atšķirības, ko mūsu materiālā (1. tab.) novērojam starp analizējamajām šķirnēm ($0.811 - 0.703 = 0.108$), nav statistiski nozīmīgas, un faktiskie genotipu biežumi abās šķirnēs statistiski būtiski neatšķiras no teorētiski aprēķinātajiem Hardi-Veinberga ģenētiskā līdzsvara biežumiem.

Interesantus rezultātus ieguvām LLU mācību un pētījumu saimniecībā „Vecauce” par LB šķirni ganāmpulkā, kur CSN2A1 biežums 36 govju paraugā ir 0.694 (2. tab.), kas, salīdzinot ar mūsu analizējamo kopējo LB šķirnes populāciju, ir šķietami zemāks, bet arī šī starpība nav statistiski nozīmīga.

2.tabula

Latvijas brūnās šķirnes govju β -kazeīna (CSN2) genotipi MPS „Vecauce”, 2010.g.

Genotipi un alēles	Latvijas brūnā „Vecauce”			
	n	Biežumi		
		Faktiski	HW	+/-
A1A1	16	0.444	0.482	-0.037
A1A2	18	0.500	0.425	0.075
A2A2	2	0.056	0.094	-0.038
Kopā	36	1.000	1.000	-
A1(p)	-	0.694	-	-
A2(q)	-	0.306	-	-

Paskaidrojumi: n - gadījumu skaits; p - CSN2A1 biežums; q - CSN2A2 biežums, HW - Hardi-Veinberga ģenētiskā līdzsvara vērtējums.

Šajā ganāmpulkā konstatējām pirmās divas LB šķirnes govīs-homozigotas attiecībā uz CSN2A2, proti, ar CSN2 genotipu A2A2. Ja mūsu rīcībā būtu šādi homozigoti vaislas buļļi, tad varētu iegūt homozigotus dzīvniekus ar CSN2A2 jau pirmajā pēcteču paaudzē. Mazāk noderīgi būtu vaislinieki ar genotipu A1A2, kura pēcteči no govīm Ukraina vai Carita (abas ir ar CSN2 genotipu A2A2) būtu sagaidāmi heterozigoti, bet iespējami ar CSN2 genotipu A2A2.

Tas, ka genotipu biežumi abās populācijās praktiski neatšķiras no HW teorētiski sagaidāmā ģenētiskā līdzsvara un abas populācijas ir ģenētiskā līdzsvarā, apstiprina faktu, ka populācijās nav selekcijas spiediena uz kādu no šiem gēniem, notiek tikai gēnu dreifs, kas mums pagaidām vēl nezināmu iemeslu dēļ ir labvēlīgs CSN2 alēlei A1.

Kā atzīmē poļu autori (Kaminski et al., 2007), patērētāji var vēlēties samazināt vai pilnībā izslēgt no sava uztura CSN2A1 saturošus piena produktus. Ganāmpulkos selekcijas ceļā tas nav izdarāms īsā laika posmā. Tāpēc pirms 7 gadiem Polijā sāka Polijas Frīzijas-Holšteinas šķirnes buļļu un daļēji arī govju beta-kazeīna sistemātisku monitoringu, nosakot alēļu biežumus un to dinamiku laikā. To pašu ieteicams darīt arī pie mums Latvijā. Vienkāršākais ceļš vēlamo CSN2A2 genotipu pavairošanai ir selektīva buļļu spermas sadale. Tas dod iespēju izkopt govju ganāmpulkus, kuri producē tikai CSN2A2 varianta pienu.

Secinājumi

1. Paplašinot analizējamo paraugkopu apjomu līdz 95 - 96 paraugiem katrā, materiāla analīze apstiprināja agrāk iegūto rezultātu, ka abās Latvijas audzētajās šķirnēs nevēlamā CSN2A1 forma ir vairākumā: LB šķirnē CSN2A1 biežums ir 0.703, LZ šķirnē – 0.811.

2. Lai ar selekcijas metodēm samazinātu *CSN2A1* biežumu, ir jāveic vaislas buļļu genotipēšana un jāsekme *CSN2* genotipa A2A2 buļļu izmantošana, īpaši vaisliniecēm ar šādu genotipu.

Pateicības

- Pētījumi un publikācijas tiek atbalstīti ar projekta palīdzību „Support for doctoral studies in LUA” No. / 2009/0180/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/017/ līguma Nr. 04.4-08/EF2. D1.13².
- Pētījumi tiek atbalstīti arī ar Latvijas Zinātņu padomes projekta Nr. 09.1461 palīdzību.

Literatūra

1. A2 Corporation Limited: Minutes of Annual Meeting of Shareholders (2009) Pieejams: <http://www.a2corporation.com/AGM Minutes 15.10.09.pdf>, 11/01/2010
2. Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A., Lottspeich, F. (1979) Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). *Hoppe Seylers Zhurnal of Physiology and Chemistry*, 360, pp. 1211-1216.
3. Cieslinska, A., Kaminski, S., Kostyra, E., Sienkiewicz-Szapka, E. (2007) Beta-casomorphin-7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative-casein genotypes. *Milchwissenschaft*, 62, pp. 125-127.
4. Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell H.M., Harwalkar, V.R., Jennes, R., Whitney, R.McL. (1984) Nomenclature of proteins of cow's milk. *Journal of Dairy Sciences*, 67, pp. 1599-1631.
5. Elliott, R. B., Harris, D. P., Hill, J. P., Bibby, N. J., Wasmuth, H. E. (1999) Type I (insulin dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia*, 42, pp. 292-296.
6. Kaminski, S., Cieslinska, A., Kostyra, E. (2007) Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics*, 48(3), pp.189-198.
7. Kostyra, E., Sienkiewicz-Slapka, E., Jarmolowska, B., Krawczuk, S., Kostyra, H. (2004) Opioid peptides derived from milk proteins. *Polish Journal of Nutrition Sciences*, 13/54, pp. 25-35.
8. Kurek, M., Przybilla, B., Herman, K., Ring, J. (1992) A naturally occurring opioid peptide from cow's milk, beta-casomorphine-7, is direct histamine releaser in man. *International Archives of Allergy and Immunology*, 97, pp. 115-120.
9. Laugesen, M., Elliott, R. (2003) Ischemic heart disease, type 1 diabetes, and cow milk A1 beta-casein. *The New Zealand Medical Journal*, 116, pp. 1-19.
10. McLachlan, C. N. (2001) Beta-casein A1, ischemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses*, 56, pp. 262-272.
11. McLachlan, C. N. (2006) Breeding and milking cows for milk free of β -casein A1. *United States Patent 7094949*.
12. Medrano, J. F., Sharrow, L. (1991) Genotyping of bovine beta- casein loci by restriction site modification of polymerase chain reaction (PCR) amplified genomic DNA. *Journal of Dairy Sciences*, 74(1), pp. 282.
13. Smiltiņa, D., Grīslis, Z., Bāliņš, A. (2010) Incidence of β -casein alleles A1 and A2 in Latvian dairy cattle populations. In: *Proceedings of Baltic Animal Breeding XV Conference*, Riga, pp.17-20.