

ALFA – LAKTOALBUMĪNA (α -LA) GĒNA VARIĀCIJU IDENTIFICĒŠANA UN TĀ ANALĪZE LATVIJAS GOVJU POPULĀCIJĀ

IDENTIFICATION OF VARIATIONS IN THE ALFA – LACTOALBUMIN GENE IN COWS POPULATION OF LATVIA

Dace Smiltina¹, Andris Bāliņš¹, Ziedonis Grīslis²

¹LLU LF Molekulārās ģenētikas pētījumu laboratorija, Latvija

²LLU LF Agrobiotehnoloģijas institūts, Latvija

¹LUA, Laboratory of Molecular Genetic Researches, Faculty of Agriculture, Latvia

²LUA, Faculty of Agriculture, Latvia

dace.smiltina@llu.lv

ABSTRACT

The aim of this study in Laboratory of Molecular Genetic Research of Faculty of Agriculture in LUA was oriented to the identification of α - lactoalbumin gene (α -LA) polymorphism and to analysis of genotype structure in population of the dairy cattle in Latvia. As a research material of 123 blood and 70 sperma cells samples from 7 breeds were used. The PCR products were digested with the restriction enzyme *Mnl*I. Alleles A and B of α -LA were distinguished by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR – RFLP) analysis. Frequency of α -LA allele B is from 0.7073 to 0.9667. This research is a novelty in Latvia.

KEY WORDS: cows, alfa – lactoalbumin, polymorphism, PCR.

IEVADS

Cilvēku un liellopu piens atšķiras sūkalu un kazeīna proporcijās (aptuveni 60 : 40 cilvēku pienā un vidēji 20:80 liellopu pienā) un specifisko proteīnu proporcijās (Lien, 2003). Viens sūkalu proteīniem ir α –laktoalbumīns (α -LA), kas ir monomērisks kalciju saistošs proteīns, sastāda 25% no sūkalu proteīnu kopējā daudzuma. α -LA darbojas kā regulējošs komponents enzimatiskajā sistēmā, tas atbild par laktozes biosintēzi piena dziedzerā šūnās (Larson, 1979). Slaucamās govīs producē vidēji 1.2 mg/ml α -LA un 5% laktozes. α -LA ir divi ģenētiskie varianti A un B. α -LA un tā hidrolizētā ir fizioloģiskas funkcijas – stresa samazināšana, antimikrobiāla ietekme. Ir pētījumi par iespējamu α -LA līdzdalību BVL infekcijas patogēnes mehānismos (Bojarojc-Nosowicz et al., 2008).

Šī pētījuma mērķis – ar PCR - RFLP metodi izpētīt sūkalu proteīna α -LA molekulāri ģenētisko polimorfismu un analizēt genotipu struktūru Latvijas govju populācijās. Šāds pētījums veikts pirmo reizi Latvijā. Darbs tapis pateicoties projekta Eiropas Sociālā fonda (ESF) projekta “Atbalsts LLU doktora studiju īstenošanai”, Vienošanās Nr. 04.4-08/EF2.D1.13”.

MATERIĀLS UN METODIKA

Pētījumā izmantoti Latvijas brūnās (LB) un Latvijas zilās (LZ) šķirnes ģenētisko resursu programmā iekļauto govju asins paraugi, kā arī Latvijā audzēto Holšteinas melnraibās (HM), Holšteinas sarkanraibās (HSr), un Dānijas sarkanās (DS) govju 123 asins paraugi. Sadarbojoties ar Siguldas MAS, pētījumam izmantojām 70 vaislas buļļu spermas šūnu paraugus no LB, HM, HSr, DS, Zviedru sarkanraibās (ZSr), un Vācijas sarkanās (VS) šķirnes

dzīvniekiem. Dzīvnieki pētījumam izvēlēti randomi. DNS izdalīšana veicām LLU LF Molekulārās ģenētikas pētījumu laboratorijā (MGPL). DNS amplifikācija veicām, izmantojot PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism). DNS praimeru veidoti pēc Mao metodikas (1994).

Gēna ģenētisko daudzveidību analizējam kā dialēla lokusa alēļu A un B sastopamību Latvijā audzējamo piena šķirņu govju populācijās. Analizējam šo alēļu iekšpopulāciju un starppopulāciju mainību raksturojošos populāciju ģenētiskos parametrus, kā genotipu un gēnu biežumus, heterozigotātes raksturojumus, noteicām novēroto heterozigotāti (H_{nov}) un sagaidāmo heterozigotāti (H_{sag}) un izmantojam šos datus iespējamā inbrīdīngā raksturojuma (F) novērtēšanai, kā

$$F = (H_{sag} - H_{nov}) / H_{sag}.$$

Analizējot iegūtos genotipu datus, noteicām ģenētiskās daudzveidības rādītājus ar TFPGA programmas paketi (Tools for Population Genetic Analyses, Version 1.3 (Miller, 1997)).

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

α - LA gēna ģenētisko variantu jeb alēļu formu A un B sastopamības analīzei izmantojam 6 šķirņu 189 dzīvnieku analīžu rezultātus (1.tab.). Hardī- Veinberga ģenētiskā līdzsvara analīze uzrādīja vairākumā šķirņu populāciju labu sakritību starp novēroto un pēc Hardī - Veinberga algoritma prognozēto genotipu proporcijām. Zemāka ticamība konstatēta Holšteinas melnraibo govju populācijā.

1. tabula / Table 1

Latvijas govju populāciju Hardī-Veinberga līdzsvara testa rezultāti 2012. gadā
The results of Hardy – Weinberg Equilibrium of cattle populations in Latvia in 2012

Šķirne Breed	Dzīvnieku skaits Number of animals	Genotips / Genotype						Ticamība Exact Probability (Haldane, 1954)
		BB		AB		AA		
		N	P	N	P	N	P	
LB	95	81	81.5158	14	12.9684	0	0.5158	1.0000
LZ	23	21	21.0435	2	1.9130	0	0.0435	1.0000
HM	41	18	20.5122	22	16.9756	1	3.5122	0.1251
HSr	11	9	9.0909	2	1.8182	0	0.0909	1.0000
ZSr	4	3	3.0625	1	0.8750	0	0.0625	1.0000
DS	15	14	14.0167	1	0.9667	0	0.0167	1.0000
Kopā	189	146	x	42	X	1	x	x

Paskaidrojumi: LB- Latvijas brūnā; LZ- Latvijas zilā; HM- Holšteinas melnraibā; HSr- Holšteinas sarkanraibā; ZSr - Zviedrijas sarkanraibā; DS - Dānijas sarkanā; N-novērots; P – prognoze. Explanations: LB - Latvian Brown; LZ- Latvian Blue; HM - Hosten Black and White; HSr - Holstein Red and White; ZSr - Swedish Red and White; DS - Danish Red.; N – observed; P – expected.

Kā redzam (1., 2. tab.), α - laktoalbumīna (α -LA) gēna alēļu A un B biežumos konstatējam alēles B izteiktu pārsvaru pār alēli A visās analizētajās govju šķirņu populācijās. To nevar uzskatīt par tiešas selekcijas efektu, jo nav zināms, ka kāda audzētāju organizācija veiktu tiešu α -LA alēles B izlasi, bet netieša izlase, kopā ar gēnu dreifu neapšaubāmi ir notikusi. Vienlaikus varam atzīmēt, ka redzamas izteiktas atšķirības starp šķirņu populācijām. Genotipa BB biežumi piecās analizētajās populācijās (2.tab.) ir robežās no 0.75 līdz 0.93, Holšteinas melnraibās šķirnes populācijā tas ir tikai 0.44.

α -LA genotipu analīzes rezultāti Latvijas govju populācijās 2012. gadā
The results of α -LA genotypes in Latvia cattle populations in 2012

Šķirne Breed	Dzīvnieku skaits Number of animals	Genotipu biežumi Frequency of Genotypes		
		BB	AB	AA
Latvijas brūnā / Latvian Brown (LB)	95	0,85	0,15	0
Latvijas zilā / Latvian Blue (LZ)	23	0,91	0,09	0
Holšteinas melnraibā / Hostein Black and White (HM)	41	0,44	0,54	0,02
Holšteinas sarkanraibā / Holstein Red and White (HS)	11	0,82	0,18	0
Zviedrijas sarkanraibā / Swedish Red and White (ZS)	4	0,75	0,25	0
Dānijas sarkanā / Danish Red (DS)	15	0,93	0,07	0

Izteiktākas biežumu atšķirības novērojām heterozigotā genotipa AB gadījumā: piecās šķirnēs heterozigotā genotipa biežums - robežās no 0.07 līdz 0.25, bet HM šķirnē heterozigotā genotipa biežums - 0.54. Iemesli mums šobrīd nav zināmi. Piecās analizēto šķirņu populācijās α -LA gēna alēles A biežums (3.tab.) ir robežās no 0.0333 līdz 0.125, bet HM šķirnes populācijā - 0.2927, jeb divas reizes augstāks kā minētajās piecās populācijās. HM šķirnes populācijā alēlei A ir heterozigotu īpatņu augstais līmenis.

α -LA gēna alēļu biežumu analīze Latvijas govju (n = 189) populācijās 2012. gadā
Analysis of α -LA polymorphism in cattle (n = 189) populations of Latvia in 2012

Šķirne/ Breed	LB	LZ	HM	HS	ZS	DS
Dzīvnieku skaits / Number of animals	95	23	41	11	4	15
Alēles A biežums / Frequency of allele A	0.0737	0.0435	0.2927	0.0909	0.1250	0.0333
Alēles B biežums / Frequency of allele B	0.9263	0.9565	0.7073	0.9091	0.8750	0.9667
Heterozigotu biežums / Frequency of heterozygot	0.1474	0.0870	0.5366	0.1818	0.2500	0.0667

Analīzes rezultāti parāda (3.; 4. tab.), ka ir nezināmi iemesli, kas sekmējuši α -LA alēles B biežumu palielināšanos un alēles A biežuma samazināšanos Latvijā audzētajās piena govju šķirņu populācijās. Redzam alēles B zemāku un alēles A augstāku līmeni Holšteinas melnraibās šķirnes populācijā. Par minēto faktu uzzinājām no mūsu pētījumu rezultātiem un, tā kā līdz šim tamlīdzīgi pētījumi Latvijā nav veikti, tad nevaram pateikt par procesa līdzšinējo dinamiku laikā. Heterozigotātes analīze (4. tab.) dod informāciju par analizējamo populāciju ģenētisko struktūru. Uz novērotās un sagaidāmās heterozigotātes rādītājiem balstītā inbrīdinga pakāpes rādītāja (F) lielumi visās analizētajās populācijās ir ar mīnus zīmi, ko var skaidrot ar inbrīdingam (homozigotācijai) pretēju izpausmi, proti, autbrīdingu. Par šo hipotēzi

iespējams pārlicināties, veicot analizēto populāciju padziļinātu ģenealoģisko analīzi, kas nebija paredzēts patreizējā pētījuma uzdevumos.

4. tabula / Table 4

α -LA gēna biežumi heterozigotātes analīzei Latvijas govju populācijās (n = 189)
Analysis of α -LA gene polymorphism and heterozygosity in cattle populations of Latvia (n=189)

Šķirne Breed	Alēļu biežums Frequency of alleles		Heterozigotāte Heterozygosity		F
	B	A	Hnov	Hsag	
Latvijas brūnā (LB)	0,9263	0,0737	0,1474	0,1365	-0,0795
Latvijas zilā (LZ)	0,9565	0,0435	0,0870	0,0832	-0,0455
Holšteinas melnraibā (HM)	0,7073	0,2927	0,5366	0,4140	-0,2960
Holšteinas sarkanraibā (HS)	0,9091	0,0909	0,1818	0,1653	-0,1000
Zviedrijas sarkanraibā (ZS)	0,8750	0,1250	0,2500	0,2188	-0,1429
Dānijas sarkanā (DS)	0,9667	0,0333	0,0667	0,0644	-0,0345

Paskaidrojumi: Hnov – novērotā heterozigotāte; Hsag – sagaidāmā heterozigotāte (saskaņā ar Hardī-veinberga ģenētisko līdzsvaru); F- inbrīdīngs raksturojums (ar mīnus zīmi tas faktiski raksturo autbrīdīngu).

Analizējot inbrīdīngs raksturojumus atsevišķi ņemtās analizēto šķirņu buļļu kopās (5.tab.) konstatējām, ka LB un HSr šķirņu buļļiem F vērtējumi ir ar mīnus zīmi (autbrīdīngs), bet HM šķirnes buļļiem F = 0.32 norāda uz šo buļļu augstu radniecības pakāpi.

5. tabula / Table 5

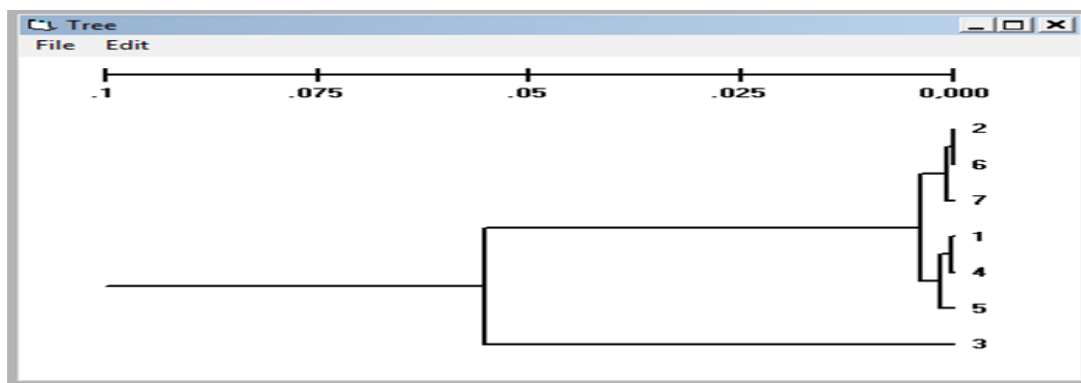
α -LA gēna biežumu izmantojums vaislas buļļu heterozigotātes analīzei Latvijā
Analysis of α -LA gene polymorphism and heterozygosity of breeding bulls in Latvia

Šķirne Breed	Buļļu Skaits Number of bulls	Alēļu biežumi Frequency of alleles		Heterozigotāte Heterozygosity		F
		B	A	Hnov	Hsag	
Latvijas brūnā (LB)	19	0,9737	0,0263	0,0526	0,0512	-0,0273
Holšteinas melnraibā (HM)	26	0,7308	0,2692	0,4615	0,6745	0,3158
Holšteinas sarkanraibā (HSr)	9	0,8889	0,1111	0,2222	0,1975	- 0,1251

Paskaidrojumi /Explanation: skatīt zem 4. tabulas / under Table 4

Analizētā α -LA gēna ģenētiskais polimorfisms (alēļu A un B biežumi) govju šķirņu populācijās deva iespēju novērtēt aplūkoto govju populāciju ģenētiskos attālumus (1.att.) (pēc Nei, 1972). Uz konstatēto ģenētisko attālumu pamata izdalījām trīs šķirņu grupas: (1) LZ, DS un VS (Angelnas sarkanā); (2) LB, HSr un ZSr un (3) HM. Pirmajā grupā esošā LZ šķirne saglabājusi ģenētiskos sakarus ar LB (pastarpināti arī LZ) izveidošanā sākotnēji lietotajām divām galvenajām uzlabotājšķirnēm: DS un Angelnas sarkano (tagad VS) šķirni.

Otrās grupas šķirne LB pastiprinājusi ģenētiskos sakarus ar HSr un ZSr šķirni. Trešo grupu pārstāv tikai HM šķirne, kas Latvijā gūst aizvien lielāku izplatību un, kas arī pēc α - LA ģenētiskā satura atšķiras no Latvijā tradicionāli audzētajām piena ražošanas virziena govju šķirnēm.



1.attēls. Latvijas govju (n=193) šķirņu ģenētiskie attālumi pēc α - LA polimorfisma (2012)

Figure 1. Genetic distances of dairy cattle (n=193) breeds in Latvia, a polymorphism of α LA

Paskaidrojumi / Explanations: 1. LB; 2. LZ; 3. HM; 4. HSr; 5. ZSr; 6. DS; 7. VS.

SECINĀJUMI

1. Latvijā audzējamo govju šķirņu populācijās α - laktoalbumīna (α - LA) gēna biežāk sastopama ir alēle B, kuras biežums konstatēts robežās no 0.7073 līdz 0.9667.
2. Piecās Latvijā audzēto govju šķirņu populācijās alēles A biežums ir robežās no 0.0333 līdz 0.125, Holšteinas melnraibās šķirnes populācijā 0.2927.
3. Analizētajās populācijās konstatējām novērotās heterozigotātes (Hnov) pārākumu pār prognozēto heterozigotāti (Hsag) - norāde uz autbrīdingu populācijās. Izņēmums - Holšteinas melnraibās šķirnes bulļi ar $F = 0.32$, kas norāda uz bulļu augstu ģenētiskās līdzības pakāpi.
4. Septiņās govju šķirņu populācijās (n =193), novērtējot govju populāciju ģenētiskos attālumus pēc α -LA gēna ģenētiskā polimorfisma (alēļu A un B biežumi), izdalījās trīs šķirņu grupas: (1) LZ, DS un VS (Angelnas sarkanā); (2) LB, HSr un ZSr un (3) HM.

LITERATŪRA

1. Bojarojc-Nosowicz, B., Kaczmarczyk, E., Duzowski, M. Relationship between polymorphism of the α -lactoalbumin gene and susceptibility of lymphocytes to infections with bovine leukaemia virus and to apoptosis in naturally infected cows. Bull Vet Inst Pulawy. 2008; 52:195 - 203.
2. Haldane, J.B.S. An exact test for randomness of mating. Journal of Genetics.1954; 52:631-635.
3. Larson, B. L. Biosynthesis and secretion of milk proteins: a Review. Journal of Dairy Researches. 1979; 46: 161 – 174.
4. Lien, E.L. Infant formulas with increased concentrations of alpha-lactalbumin. The American Journal of Clinical Nutrition. 2003; 77(6):1555S -8S.
5. Mao, F.C. Rapid communication: A Bovine α - lactoalbumin gene *Mnl1* restriction fragment length polymorphism. Journal of Animal Science. 1994; 72:529.
6. Miller, M.P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) version 3.1: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997.
7. Nei, M. Genetic distance between populations. American Naturalist. 1972; 106(949): 283-292.