

**$\beta$  – laktoglobulīna (LGB) alēļu A un B polimorfisms  
Latvijas govju populācijā  
Polymorphism of the  $\beta$  – Lactoglobulin (LGB) Alleles A and B  
in the Dairy Cattle Population in Latvia**

***Dace Smiltiņa*<sup>1,2</sup>, *Ziedonis Grīslis*<sup>2</sup>, *Andris Bāliņš*<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>LLU LF Molekulārās ģenētikas pētījumu laboratorijā

<sup>2</sup>Latvijas Lauksaimniecības universitātes Agrobiotehnoloģijas institūts

**Abstract.** The study was organized in Laboratory of Molecular Genetic Research of Faculty of Agriculture of Latvia University of Agriculture to identify  $\beta$ -lactoglobulin (LGB) gene alleles A and B, and to analyse the genotype structure in population of the dairy cattle in Latvia. LGB is a very important protein in the milk of cattle and it plays a role in the milk quality and also in coagulation, an important process for cheese and butter making. 292 samples of blood and 82 samples of semen were taken from living individuals of the different breeds and ages. For the digestion of PCR products the restriction enzyme *HaeIII* was used. Alleles A and B of  $\beta$ -lactoglobulin were genotyped by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR – RFLP) analysis for the cattle breeds of Latvia. The results obtained: frequency (n=374) of LGB allele A was 0.239, frequency of LGB allele B was 0.761.

**Key words:** milk, dairy cattle,  $\beta$  – lactoglobulin, polymorphism, PCR – RFLP.

### Ievads

Beta-laktoglobulīns (LGB) ir viens no lielākajiem vājpiena proteīniem, sastādot vairāk nekā 50% no kopējā vājpiena proteīnu daudzuma. LGB atrasts govju un citu atgremotāju dzīvnieku pienā, kā arī neatgremotājiem – cūkām, zirgiem, suņiem, delfīniem, vaļiem, bet LGB nav atrasts cilvēku un grauzēju pienā (Hambling et al., 1992). LGB ģenētiskie varianti ietekmē govju piena sastāvu, govju produktivitāti, piena produktu un siera ražošanu (FitzGerald, Hill, 1997; Kubarsepp et al., 2005). Pirmo reizi par LGB ģenētisko mainīgumu ziņots pirms 57 gadiem (Aschaffenburg and Drewry, 1955). LGB ceturtajā eksonā determinē divi alēlie varianti A un B. Kopumā pasaulē *Bos* ģintī izdalīti un aprakstīti 11 LGB ģenētiskie varianti (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W), apkopota to nomenklatūra (Farrell Jr. et al., 2004). LGB sekvenca sastāv no 162 aminoskābēm (Hambling et al., 1992) un galvenās alēles ir A un B, kuras pētītas pasaulē. Pētījumā izvēlējamies izpētīt LGB polimorfismu arī Latvijas govju populācijā. Šāds pētījums veikts pirmo reizi Latvijā.

### Materiāli un metodes

Pētījumu veicām LLU LF Molekulārās ģenētikas pētījumu laboratorijā Jelgavā laikā no 2010. gada septembra līdz 2011. gada martam. Pētījumam izmantojām (1. tab.) dažādu šķirņu 292 slaucamās govīs, tās izvēlējamies randomizēti, kā arī 82 vaislas buļļu spermas šūnu paraugus no Siguldas Valsts mākslīgās apsēklošanas stacijas (VMAS).

Asins paraugi no govju jugulārās vēnas ņemti sterilos vakutaineros ar K3-EDTA un uzglabāti pie -20 °C. Spermas šūnu paraugi – sterilās pajetēs, uzglabāti šķidrā slāpekļī. DNS

ekstraģēts, lietojot QIAGENE DNeasy Blood @ Tissue kit (ASV) uz jaunākās tehnoloģijas iekārtas QIAcube no QIAGEN (ASV). Beta-laktoglobulīna gēnu identificējam, pielietojot PCR-RFLP metodiku (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) pēc J.F. Medrano un E. Aguilar-Cordova (1990) un N. Strzalkovskas (Strzalkowska et al., 2002), veicot modifikācijas.

1. tabula

### Pētījumā izmeklēto piena liellopu šķirnes Latvijā (2011. g.)

Dzimums	Mērvienība	HM	HS	ZSR	DS	VS	LB	LZ	OB	Kopā
Bulļi	skaits	28	9	3	17	4	21	0	0	82
	%	34	11	4	21	5	26	0	0	100
Govis	skaits	33	3	0	30	0	216	1	9	292
	%	11	1	0	10	0	74	0	3	100

Piezīme: LB – Latvijas Brūnā; HM – Holšteinas Melnraibā; HS – Holšteinas Sarkanraibā; DS – Dānijas Sarkanā; LZ – Latvijas Zilā; VS – Vācijas Sarkanā; OB – Švīces; ZSR – Zviedrijas Sarkanraibā.

Amplifikācija veikta ar Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. DNS prameri PCR amplifikācijai veidoti pēc J.F. Medrano un E. Aguilar-Cordova (1990). PCR apstrādāti ar *HaeIII* endonukleāzi pēc ražotāja rekomendācijas protokola (Fermentas). DNS fragmentu vizualizācijai elektroforēze veikta 4% agarozes gēlā, lietojot Cleaver Scientific Ltd Multi SUB midi elektroforēzes iekārtu, iegūtie rezultāti nolasīti pie UV starojuma transluminatorā. Alēļu frekvences kalkulētas, lietojot dialēlo lokusu ekspresiju, kā arī izmantojām Microsoft Office Excel 2007 standarta programmu, bet precizitātes pārbaudei izmantojām M.P. Millera izstrādāto Windows® datorprogrammu allozīmu un molekulāro populāciju ģenētisko datu analizēm TFGPA (Tools for Population Genetic Analyses) programmas versiju 1.3 (Miller, 1997). Alēļu frekvences novērtējām, izmantojot vienkāršotu alēļu skaitīšanu pēc Hardi – Veinberga (HW) līdzsvara noteikšanas sistēmas (Falconer et al., 1996).

### Rezultāti un diskusija

Alēļu noteikšanā vadījāmies no tā, kā specifiskie prameri veido 247 bp DNS fragmentus. Restriktāze *HaeIII* šķeļ noteiktos posmos – ja ir alēle A, tad šķeļas 2 posmi: 99 bp un 148 bp; bet – ja ir alēle B, tad šķeļas 2 posmi: 74 bp un 99 bp.

Pētījuma laikā veicām LGB genotipu sadalījuma salīdzināšanu starp 82 Siguldas VMAS izmeklētājiem vaislas bulļiem un 292 Latvijā audzētām slaucamām govīm (2. tab.).

Vaislas bulļiem LGB genotipa AA frekvence ir par 0.11 augstāka (0.13 jeb 11 bulļiem, kas ir 13% no kopējā bulļu skaita) pēc HW līdzsvara, nekā tas ir govīm (0.03 jeb 7 govīm, kas ir 3% no kopējā govju skaita). Tāpat vaislas bulļiem arī LGB genotipa AB frekvence ir par 0.04 augstāka (0.41 jeb 34 bulļiem, kas ir 41% no kopējā bulļu skaita) pēc HW līdzsvara, nekā tas ir govīm (0.37 jeb 109 govīm, kas ir 37% no kopējā govju skaita).

2. tabula

**β-laktoglobulīna genotipu sadalījums piena šķirņu liellopu populācijās, 2011. g.**

Dzimums	Dzīvnieku skaits pēc genotipa			Kopā
	AA	AB	BB	
Buļļi (skaits)	11	34	37	82
Buļļi (%)	13	41	45	100
Govis (skaits)	7	109	176	292
Govis (%)	3	37	60	100
Kopā (skaits)	18	143	213	374

Piezīme: AA – LGB genotips AA; AB – LGB genotips AB; BB – LGB genotips BB.

Turpretī vaislas buļļiem LGB genotipa BB frekvence ir par 0.15 zemāka (0.45 jeb 37 buļļiem, kas ir 45% no kopējā buļļu skaita) pēc HW līdzsvara, nekā tas ir govīm (0.60 jeb 176 govīm, kas ir 60% no kopējā govju skaita). Analizējot kopējo izmeklēto dzīvnieku skaitu pēc LGB genotipu frekvencēm, izmantojot Hardi – Veinberga (HW) līdzsvara analīzi, ieguvām sekojošo (3. tab.): LGB AA genotipa frekvence – 0.05, LGB AB genotipa frekvence – 0.38, LGB BB genotipa frekvence – 0.57, bet alēļu frekvences: alēlei A ir 0.239, bet alēlei B – 0.761.

3. tabula

**β-laktoglobulīna (BLG) genotipu un alēļu biežumi Latvijā audzēto piena šķirnes liellopu populācijās, 2011. g.**

Genotipi un alēles	Rezultāti					
	n	Frekvenču biežumi			n	
	De facto	De facto	HW	+/-	pēc HW	
AA	18	0.05	0.06	-0.01	22	4
AB	143	0.38	0.36	0.02	136	-7
BB	213	0.57	0.58	-0.01	216	3
Kopā	374	1.00	1.00	-	374	-
A (p)	-	-	0.239	-	-	-
B (q)	-	-	0.761	-	-	-

Piezīme: n - gadījumu skaits; p – LGB. alēles A biežums; q – LGB alēles B biežums, HW – Hardi – Veinberga ģenētiskā līdzsvara vērtējums.

Novirzes no HW līdzsvara ir nelielas un tās nav statistiski būtiskas. Tāpat pētījumā salīdzinājām (4. tab.) savus analītiskos rezultātus par LGB alēlēm A un B ar Igaunijas zinātnieku publicētajiem pētījumu rezultātiem (Varv et al., 2009).

**LGB gēna alēļu frekvenču salīdzinājums Igaunijas (Varv et al., 2009)  
un Latvijas govju populācijās, 2011. g.**

Šķirne	Skaitis	LGB alēles un to frekvences	
		A	B
Igaunijas vietējā	40	0.188	0.813
Igaunijas sarkanā	40	0.138	0.863
Igaunijas Holšteinas	42	0.319	0.681
Latvijas Brūnā	237	0.183	0.817
Latvijā audzētā Holšteinas (HM)	61	0.444	0.556

Kā Latvijas, tā arī Igaunijas govju populācijas uzrādīja LGB alēles B dominējošu stāvokli, it īpaši vietējo šķirņu govīm (Latvijas brūnā - 0.817, Igaunijas vietējā - 0.813, Igaunijas Sarkanā - 0.863). Turpretī Holšteinas melnraibo govju populācijā LGB alēles B frekvence ir zemāka: Igaunijā audzētajā HM šķirnes populācijā (0.681) un arī Latvijā audzētajā HM šķirnes populācijā (0.556). Pēc pasaulē veiktajiem pētījumiem secinām, ka LGB alēle B dominē *Bos indicus* liellopiem vairāk nekā *Bos taurus* liellopiem.

### Secinājumi

1. Izmeklējot Latvijā audzēto govju populācijas DNS paraugus ( $n = 374$ ) konstatējām, ka LGB alēļu A un B frekvences ir 0.239 un 0.761.
2. Latvijā audzēto govju populācijas LGB genotipu AA, AB, and BB frekvences ( $n = 374$ , 0.06, 0.36, 0.58) atbilst Hardi – Veinberga līdzsvara proporcijām:  $(0.239 + 0.761)^2 = 0.06 + 0.36 + 0.58$ , un populācija ir ģenētiskā līdzsvarā.
3. Iemesli, kāpēc LGB alēle B dominē Latvijā audzēto govju populācijā, pašlaik nav zināmi, šāds pētījums veikts pirmo reizi Latvijā.

### Pateicības

Pētījumi un publikācijas tiek atbalstīti ar projekta palīdzību „Support for doctoral studies in LLU” No. / 2009/0180/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/017/ līguma Nr. 04.4-08/EF2.D1.13”. Pētījumus atbalsta arī Latvijas Zinātņu padomes projekts Nr. 09.1461.

### Literatūra

1. Aschaffenburg, R. and Drewry, J. (1955) Occurrence of different Genetics of the  $\beta$ -lactoglobulin in cow's milk. *Nature*, 176, pp. 218-219.
2. Farrell, Jr, 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., and Swaisgood, H.E. (2004) Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth edition. *Journal of Dairy Sciences*, 87, pp. 1641-1674.
3. Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. (1996) *Introduction to Quantitative genetics*. 4th Edition, Longmans Green, Harlow, Essex, UK, 438 p.

4. FitzGerald, R.J., Hill, J.P. (1997) The relationship between milk protein polymorphism and the manufacture and functionality of dairy product. In: *Milk Protein Polymorphism*. Bulletin IDF. IDF, Brussels, Belgium, pp. 355-371.
5. Hambling, S.G., McAlpine, A.S., Wyer, L. (1992) Betalactoglobulin. In: Fox, P.F. (ed.) *Advanced Dairy Chemistry*. Vol. I, Elsevier Applied Science, London, pp. 147-152.
6. Kubarsepp, I., Henno, M., Viinalass, H., Sabre, D. (2005) Effect of k-casein and  $\beta$ -lactoglobulin genotypes of the milk rennet coagulation properties. *Agr. Res.*, 1, pp. 55-64.
7. Medrano, J.F., Aguilar-Cordova, E. (1990) Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Biol. Technology*, 8, pp. 144-146.
8. Miller, M.P. (1997) *Tools for population genetic analyses (TFPGA) version 3.1: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data*: <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>. Resurss apraksts 01.06.2012.
9. Strzalkowska, N., Kvwzewski, J., Ryniewicz, Z. (2002) Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin polymorphism cows age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black and white cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 20, pp. 21-35.
10. Varv, S., Belousova, A., Sild, E., Viinalass, H. (2009) Genetic diversity in milk proteins among Estonian dairy cattle. *Veterinarija i Zootehnika*, 48(70), pp. 93-98.