

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 4

Issue 2

Különszám

Gödöllő
2008



BÉTA-LAKTOGLOBULIN GENETIKAI POLIMORFIZMUS-VIZSGÁLATOK HAZAI AWASSI ÉS RACKA JUHOKBAN

Kerekes Andrea¹, Baranyi Mária², Nagy Sándor³, Kovács Péter³, Bősze Zsuzsanna²

¹Szent István Egyetem, 2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.

²Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi A. u. 4.

³Bakonszegi Awassi Zrt., 4164 Bakonszeg, Hunyadi u. 83.

todi09@vnet.hu

Összefoglalás

Hazánkban, az európai viszonyokhoz hasonlóan, a tejelő juhállományok nagy része kettős hasznosítású. A bevételek egy része a vágó bányák értékesítéséből, másik része pedig a tej és a tejtermékekből származik. Mivel a kereslet megnövekedett a kecske- és juh-tejtermékek iránt, a gazdaságok egyik fő célja a minél nagyobb tejhozam elérése. A tej egyike a legkönnyebben hozzáférhető fehérje forrásoknak. A tejfehérjéket két nagy csoportba oszthatjuk, ezek a kazeinek (α_{S1} , α_{S2} , β , κ) és a savó fehérjék (α -laktalbumin, β -laktoglobulin). Ezen tejfehérjék genetikai polimorfizmust mutatnak, és a különböző alléltípusok a tej fizikai és kémiai tulajdonságain kívül befolyásolják a tejhozamot és a tej fehérje- és zsírtartalmát is. E munka keretében awassi és gyimesi racka juhok β -laktoglobulin genotípusát határoztuk meg tejmintából, amfolinok jelenlétében történő izoelektromos fókuszálással. Összesen 147 awassi és 203 racka egyed vizsgáltunk és meghatároztuk az adott populációra jellemző genotípus és gényakoriságokat. Az awassi fajtában a β -laktoglobulin AA genotípus 0,2313, az AB 0,4966, míg a BB 0,2721 gyakorisággal fordult elő. Rackában a gyakoriságok 0,3251 (AA), 0,5025 (AB) és 0,1724 (BB). Az A allél gyakorisága awassiban 0,4796, rackában 0,5764, a B allél pedig awassiban 0,5204, rackában 0,4236. A két fajta között szignifikánsan különbözik a BB genotípusok gyakorisága ($P=0,0343$), és az allélgyakoriságok is szignifikánsan eltérnek egymástól a két populációban ($P=0,0140$). A várt és tapasztalt genotípus gyakoriságok között nem találtunk szignifikáns különbséget, a Hardy-Weinberg törvénynek megfelelően mindkét populáció a genetikai egyensúlyhoz közelít.

Kulcsszavak: tejfehérje genetikai polimorfizmus, juh, béta-laktoglobulin, genotípus- és gényakoriságok, IEF

Beta-lactoglobulin genetic polymorphisms in Hungarian Awassi and Racka sheep

Abstract

In Hungary, similarly in other parts of Europe, the most of dairy sheep are dual purpose with incomes originating partly from meat and in about 65-75% from milk. Since there is an increase of demand for goat and sheep dairy products one of the main breeding goals is to increase milk yield. Milk is one of the main protein sources in human nutrition. The two main milk protein types are the caseins (α_{S1} , α_{S2} , β , κ) and the whey proteins (α -lactalbumin, β -lactoglobulin). These milk proteins show genetic polymorphisms, and the different genetic variants not only influence the physical and chemical properties of milk but also milk yield and protein and fat content. Within the framework of our research we studied the β -lactoglobulin genotypes of Hungarian Awassi and Gyimesi Racka sheep using individual milk samples and isoelectric focusing in the presence of carrier ampholytes. In total 147 Awassi and 203 Racka ewes were typed, and genotype and gene frequencies were calculated for both populations. In Awassi the genotype frequencies are 0.2313 (AA), 0.4966 (AB), and 0.2721 (BB), in the Gyimesi Racka breed 0.3251 (AA), 0.5025 (AB) and 0.1724 (BB). The frequency of allele A was 0.4796 in Awassi and 0.5764 in Racka, and allele B was 0.5204 and 0.4236, respectively. The β -lactoglobulin BB genotype frequencies ($P=0.0343$) and the allele frequencies ($P=0.0140$) showed significant differences between the two examined sheep populations. The observed and expected genotype frequencies showed no significant differences according to the Hardy-Weinberg law both populations approximate genetic equilibrium.

Keywords: milk protein genetic polymorphism, sheep, β -lactoglobulin, genotype and gene frequencies, IEF



Bevezetés

A világ juhállománya napjainkban lassú, de folyamatos emelkedésnek indult. A legjelentősebb juhtartó állam, Kína, mintegy 157 milliós állománnyal rendelkezik. Az európai juhtenyésztés sem elhanyagolható. A kontinens életében, különösen régen, nagy jelentőséggel bírt a juhászat. Jelenleg az európai juhállomány 137,7 millió gyedet számol. Az Európai Unió tagállamaiban összesen, mintegy 89 millió juhot tartanak számon. Az egy főre jutó juhhúsfogyasztás a Földön átlagosan 2 kg/év.

Magyarországon, az európai viszonyokhoz hasonlóan, a tejelő juhállományok rendkívül nagy hányadára a kettős hasznosítás a jellemző. A gazdaságok jövedelmének 65-75%-a a tej és a tejtermékekből, a többi pedig a vágó bárányok értékesítéséből származik. Napjaink egészség centrikus világnézetének köszönhetően, megnövekedett a kereslet a kecske- és juh tejtermékek iránt, a gazdaságok egyik fő célja ezért a minél nagyobb tejhozam elérése.

A tej egyike a legkönnyebben hozzáférhető fehérje forrásoknak. Éppen ezért igen fontos a humán táplálkozásban. A főbb tejfehérjék genetikai polimorfizmust mutatnak. A különböző alléltípusok a tej fizikai és kémiai tulajdonságain kívül befolyásolják a tejhozamot és a tej fehérje- és zsírtartalmát is. Tekintettel arra, hogy a tejfeldolgozás során a tejösszetétel is lényeges szerepet játszik, mind a tejhozamot, mind a tejösszetételt célszerű a tenyésztés során figyelembe venni.

Vizsgálataink során 147 awassi és 203 gyimesi racka egyed BLG genotípusát határoztuk meg tejmintából, amfolinok jelenlétében történő izoelektromos fókuszálással. E munka egy nagyobb kutatási program részét képezi, melynek célja, hogy a kis kérődzők kutatásában elért legújabb tudományos eredményeket adaptálja a hazai állományokra, és segítséget nyújtson egy hatékonyabb tenyésztési stratégia kidolgozásához a tejhozam növelése, illetve a tejösszetétel javítása érdekében.

Irodalmi áttekintés

A tejfehérjék mintegy 90%-át, a tejmirigy alveoláris sejtjeiben termelődő hat fehérje alkotja, melyek két fő csoportba sorolhatók: kazeinek (α_{S1} -, α_{S2} -, β -, κ -kazein [CN]) és savófehérjék (α -laktalbumin [α -LA], β -laktoglobulin [BLG]). A tejfehérjék heterogenitását tovább fokozza az úgynevezett genetikai variánsok (allélok) létezése. A tejfehérjék genetikai polimorfizmusát a fehérjeláncban bekövetkezett aminosav csere vagy néhány aminosav kiesése okozza, amely az adott fehérjét kódoló DNS szakaszban az evolúció során bekövetkezett pontmutációra, ritkábban delécióra vezethető vissza. Az általunk vizsgált BLG jelenleg ismert genetikai variánsait, mind fehérje, mind DNS szinten az 1. táblázat szemlélteti.



Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a különböző α_{S1} -CN genotípusok a juhtej kazein tartalmát, a fehérje/zsír arányt, a kazein micellák méretét és a tejalvadási tulajdonságokat (Pirisi és mtsai, 1999a), az α_{S2} -CN a zsírhozámot (Wessels és mtsai, 2004), a β -CN genotípusok pedig a zsírtartalmat (Wessels és mtsai, 2004) befolyásolják szignifikánsan. A BLG tejhozamra illetve tejösszetételre gyakorolt hatására ellentmondásos adatok jelentek meg (Garzon és Martinez, 1992; Pirisi és mtsai, 1999b; Rampilli és mtsai, 1997; Taibi és mtsai, 1999), de a szerzők többsége az AA és AB genotípus szárazanyagra, fehérje- és zsírtartalomra, valamint tejalvadási tulajdonságokra gyakorolt pozitív hatását figyelte meg.

1. táblázat: β -lactoglobulin genetikai variánsok juhban

Gén(1)	Tejfehérje variáns(2)	DNS polimorfizmus(3)
β -laktoglobulin (BLG)	A [Tyr-38, Arg-166] B [His-38, Arg-166] C [Tyr-38, Gln-166] (Ali és mtsai, 1990; Erhardt, 1989; Kolde & Braunitzer, 1983)	A, B allél, C/T bázis csere (Schlee és mtsai, 1993; Feligini és mtsai, 1998) C allél, G/A bázis csere (Prinzenberg & Erhardt, 1998)

[] = aminosav csere típusa és pozíciója a prekursor molekulában / type and position of amino acid change in the precursor molecule

Table 1. β -Lactoglobulin genetic variants in sheep
Gene(1), milk protein variant(2), DNS polymorphism(3)

Anyag és módszer

Mintavétel

A vizsgálatok során awassi és gyimesi racka juhok tejével dolgoztunk. Az összesen 252 awassi és 218 racka tejelő állat tejmintáját Bakonszegről, az Awassi Zrt. telephelyéről szereztük be 2007 tavaszán, illetve nyarán. A mintavételhez az állatokat véletlenszerűen választottuk ki. A tejmintákat felhasználásig -20°C -on tároltuk.

Mintaelőkészítés

Felolvasztás után a tejmintákat centrifugálással zsírtalanítottuk, majd liofilizáltuk. A liofilizált tejből 0,2 g/ml-es vizes oldatot készítettünk, majd izoelektromos precipitációval (pH 4,6) elválasztottuk egymástól a kazein és savó frakciót. 60 μl savó frakcióhoz 200 μl 8 M ureát, 5 (s)% glicerint és 30 mM dithiotreitolt tartalmazó minta puffert adtunk.



Izoelektromos fókuszálás (CA-IEF)

A tejminták izoelektromos fókuszálását – a *Krause és mtsai* (1988) által kifejlesztett módszer alapján – amfolinok és urea jelenlétében, 0,25 x 124 x 258 mm-es poliakrilamid gélen végeztük, egy Multiphore II elektroforézis készülék (Pharmacia) segítségével. Az IEF gélt 9,4 ml gél törzsoldat (4,85% akrilamid, 0,15% NN'-metilén-biszakrilamid, 48,05% urea, 15% glicerin) és 0,6 ml amfolin keverékéből (250 µl pH 4,2-4,9, 100 µl pH 4,5-5,4, 250 µl pH 5-6) készítettük. Az anód puffer 0,5 M foszforsav, a katód puffer 0,5 M nátrium-hidroxid. Mintafelvitel: 17 µl/cm. Előfókuszálás 25 percig 4 W-on (max. 2000 V és 15 mA), mintafókuszálás 60 percig 4 W-on (max. 2000 V és 15 mA) és 120 percig 2500 V-on (max. 5 mA és 20 W). Gélek fixálása 20 percig 12,5% triklór-ecetsav oldatban. Festés 40 percig, 25% etanolt, 10% ecetsavat, 5% réz-szulfátot és 0,1% Coomassie (Serva Blue G, Serva) festéket tartalmazó oldatban. Differenciálás 25% etanolt és 10% ecetsavat tartalmazó oldatban, amíg a háttér ki nem tisztul.

Statisztikai analízis

A genotípus-, és géngyakoriságok közötti különbségek szignifikancia vizsgálatát *Fisher-féle* teszttel végeztük (*QuickCalcs*, <http://www.graphpad/quickcalcs>).

Eredmények és értékelés

A rendelkezésre álló tejmintákból eddig 147 awassi és 203 gyimesi racka egyed BLG genotípusát határoztuk meg. Kiszámoltuk a különböző genotípus-, és géngyakoriságokat (2. táblázat). Mindkét fajtánál a leggyakoribb genotípus az AB. Az awassi populációban a genotípus gyakoriságok az AB>BB>AA, a rackánál pedig AB>AA>BB irányban csökkennek. A bakonszegi gyimesi racka populáció az eddig vizsgált juhfajták többségéhez hasonlóan (összefoglaló cikk: *Amigo és mtsai*, 2000) magasabb A allél gyakoriságot mutat. Ezzel ellentétben az awassi populációban a B allél volt a gyakoribb – az irodalmi adatok szerint ezt a tendenciát mutatja még a tejtermelésre használt olasz sarda és a cseh romanov populáció is.



2. táblázat: A vizsgált tejelőjuh populációk allél- és géngyakorisága

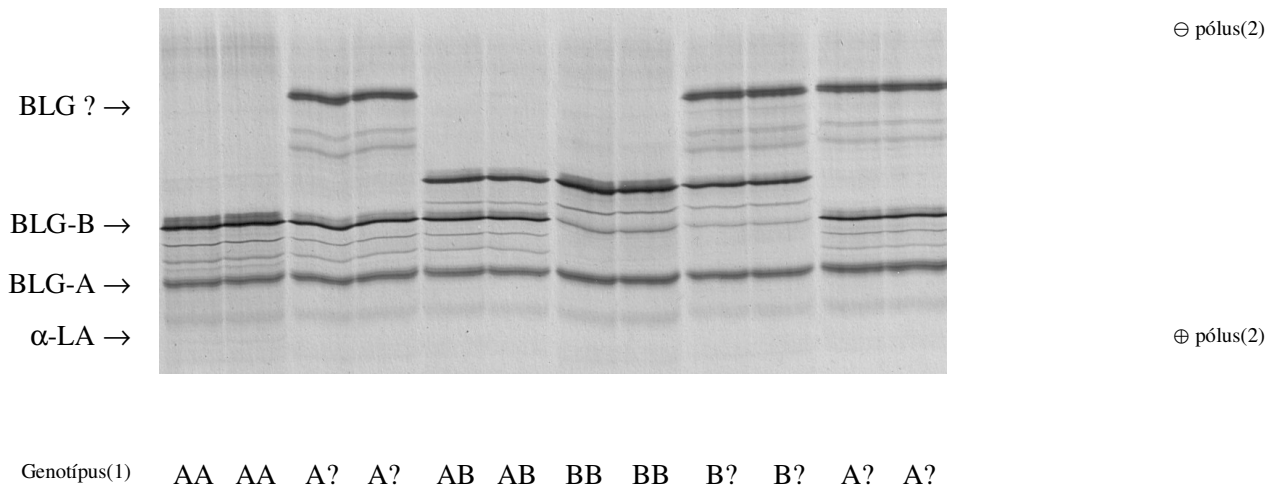
β -laktoglobulin	Awassi		Racka		P
	Gyakoriság(2)	Egyedszám(3)	Gyakoriság(2)	Egyedszám(3)	
Genotípus(1)					
AA	0,2313	34	0,3251	66	P=0,0565
AB	0,4966	73	0,5025	102	NS
BB	0,2721	40	0,1724	35	P=0,0343
Allél(4)					
A	0,4796		0,5764		P=0,0140
B	0,5204		0,4236		P=0,0140
Összes(5)		147		203	

NS = nem szignifikáns / not significant

Table 2. Genotype and gene frequencies in the examined sheep populations
Genotype(1), frequency(2), number of individual(3), allele(4), altogether(5)

A várt és tapasztalt genotípus gyakoriságok között nem találtunk szignifikáns különbséget, a Hardy-Weinberg törvénynek megfelelően mindkét populáció a genetikai egyensúlyhoz közelít.

A racka tejminták vizsgálata során 3 olyan tejmintát találtunk, amely eddig ismeretlen fehérje csíkot eredményezett a CA-IEF gélen (1. ábra). Mivel az alkalmazott mintakészítési és futtatási körülmények között gyakorlatilag csak az α -LA és a BLG látszik a gélen, jó esély van arra, hogy az ismeretlen csík egy új BLG genetikai variáns jelenlétét jelzi. Az ismeretlen gélcsík tömegspektrometriás fehérjeazonosítása ezen összefoglaló készítésekor még folyamatban van.



1. ábra: Savó fehérjék izoelektromos fókuszálása, ismeretlen fehérje csík detektálása

Figure 1. Isoelectric focusing of milk serum proteins, detection of unknown protein band
Genotype(1), pole(2)

Következtetések és javaslatok

Az elmúlt években számos adat került napvilágra arról, hogy az elkövetkezendő évezredben a világ népessége nagyfokú növekedésnek indul. Ez a helyzet jelentős változásokat okoz az élelmiszertermelésben és azon belül is leginkább az állattenyésztés területén. Ennek, és napjaink fejlődésének köszönhetően, az állattenyésztés minőségi és mennyiségi elvárásai is folyamatosan emelkednek. A több és jobb minőségű élelmiszer előállításnak a megoldása, nem az állat létszám növelésében rejlik, hanem a termelés hatékonyságának fokozásában. A termelés hatékonyabbá tételére az ágazatnak új és jobb módszereket kell kidolgoznia, majd a későbbiekben alkalmazni a tenyésztés, a takarmányozás, az állategészségügy, valamint az állat- és környezetvédelem területén. Ilyen új törekvés a termelés és a genetikai adottságok kapcsolatának vizsgálata is, melyek eredménye a későbbiekben igen nagy hatékonysággal alkalmazhatók lesznek a szelekciós eljárások során. Reméljük, hogy vizsgálatainkkal hozzá tudunk majd járulni ahhoz, hogy sikerüljön új tenyésztési stratégiákat kidolgozni a magasabb tejhozam, illetve a kedvezőbb tejösszetétel eléréséhez.



Köszönetnyilvánítás

E munkát a Kozma László TUDAS 06-HITECH07 (OMFB 00451/2007) pályázat támogatta.

Irodalomjegyzék

- Ali, S., McClenaghan, M., Simons, J.P., Clark, A.J.* (1990): Characterisation of the alleles encoding ovine beta-lactoglobulins A and B. *Gene*, 91, 201-207.
- Amigo L., Recoi I., Ramos M.* (2000): Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk- a review. *Intern. Dairy J.*, 10. 135-149.
- Erhardt, G.* (1989) Evidence for a third allele at the beta-lactoglobulin (beta-Lg) locus of sheep milk and its occurrence in different breeds. *Anim. Genet.*, 20. 197-204.
- Feligini, M., Parma, P., Aleandri, R., Greppi, G.F., Enne, G.* (1998): PCR-RFLP test for direct determination of β -lactoglobulin genotype in sheep. *Anim. Genet.*, 29. 473-474.
- Garzon, A., Martinez, J.* (1992): Beta-lactoglobulin in Manchega sheep breed. Relationship with milk technological indexes in handcraft manufacture of Manchego cheese. In: XXIII Int. Conf. Anim. Genet., Interlaken g. 19. (Abstract)
- Kolde, H.J., Braunitzer, G.* (1983): The primary structure of ovine beta-lactoglobulin. 2. Discussion and genetic aspects. *Milchwissenschaft (Milk Science International)* 38. 70-72. (Abstract)
- Krause, I., Buchberger, J., Weiss, G., Pflugler, M., Klostermeyer, H.* (1988): Isoelectric focusing in immobilized pH gradients with carrier ampholytes added for high-resolution phenotyping of bovine beta-lactoglobulins: characterization of a new genetic variant. *Electrophoresis*, 9. 609-613.
- Pirisi, A., Piredda, G., Papoff, C.M., Di Salvo, R., Pintus, S., Garro, G., Ferranti, P., Chianese, L.* (1999a): Effects of sheep alpha s1-casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties. *J. Dairy Res.*, 66. 409-419.
- Pirisi, A., Fraghi, A., Piredda, G.L.P.* (1999b): Influence of sheep beta-lactoglobulin genotypes on milk composition and cheese yield. *EAAP Publ.* 95. 553-555. (Abstract)
- Prinzenberg, E.M., Erhardt, G.* (1999): Molecular genetic characterization of ovine β -lactoglobulin C allele and detection by PCR-RFLP. *J. Anim. Breed. Genet.*, 116. 9-14.



- Rampilli, M., Cecchi, F., Giuliotti, L., Cattaneo, T.M.P.* (1997): The influence of beta-lactoglobulin genetic polymorphism on protein distribution and coagulation properties in milk of Massese breed ewes. IDF/FIL Publ. 9702. 311-315. (Abstract)
- Schlee, P., Krause, I., Rottmann, O.* (1993): Genotyping of ovine beta-lactoglobulin alleles A and B using PCR. Arch. Tierz., 36. 519-523. (Abstract)
- Taibi, L., Pilla, F., Tripaldi, C., Annicchiarico, G., Bevilacqua, C., Napolitano, F., Dell'Aquila, S.* (1999): Influence of crossbred and beta-lactoglobulin genotype on milk yield and quality in sheep. Zoot. Nutr. Anim., 25. 187-193 (Abstract)
- Wessels, G., Hamann, H., Erhardt, G., Distl, O.* (2004): Genotypeneffekte von Milchprotein-Polymorphismen auf die Milchleistung beim Ostfriesischen Milchschaaf [Genotype effects of milk protein polymorphisms on milk production in East Friesian dairy sheep]. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 117. 414-419.