

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

2118306

**DETEKCIA GENETICKÉHO POLYMORFIZMU
BOVINNÉHO BETA-LAKTOGLOBULÍNU
METÓDOU PCR-RFLP**

(Diplomová práca)

Študijný program: biotechnológie
Študijný odbor: 2908800 biotechnológie
Školiace pracovisko: katedra genetiky a plemenárskej biológie
Školiteľ: Ing. Martina Miluchová, PhD.

Nitra 2011

Katarína Brezániová, Bc.

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV**

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Názov záverečnej práce: Detekcia genetického polymorfizmu bovinného beta-laktoglobulínu metódou PCR-RFLP

Označenie záverečnej práce: diplomová práca

Jazyk, v ktorom sa práca vypracuje: slovenský

Študent: Bc. Katarína Brezániová

Študijný program: biotechnológie

Študijný odbor: 2908800 biotechnológie

Školiace pracovisko: katedra genetiky a plemenárskej biológie

Školiteľ: Ing. Martina Miluchová, PhD.

Vedúci školiaceho pracoviska: Doc. Ing. Juraj Candrák, PhD.

Dátum schválenia:

.....
podpis vedúceho školiaceho pracoviska

ČESTNÉ VYHLÁSENIE

Podpísaná Bc. Katarína Brezániová týmto vyhlasujem, že diplomovú prácu na tému *“Detekcia genetického polymorfizmu bovinného beta-laktoglobulínu metódou PCR-RFLP“* som vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak hore uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 15. apríla 2011

.....

POĎAKOVANIE

Dovoľujem si touto cestou úprimne poďakovať mojej školiteľke Ing. Martine Miluhovej, PhD. za pomoc, odborné vedenie, cenné rady a pripomienky pri vypracovávaní diplomovej práce.

ABSTRAKT

Práca bola zameraná na identifikáciu polymorfizmu β -laktoglobulínového génu v populácii slovenského pinzgauského dobytká. Izoláciu bovinnej genómovej DNA sme uskutočnili metódou proteolitickej hydrolyzy proteinázou K, fenol-chloroformovej deproteinizácie a etanolovej precipitácie, ktoré boli použité na zistenie β -LG genotypov pomocou PCR-RFLP metódy s použitím reštrikčného enzýmu *HaeIII*. Materiál zahŕňal 39 zvierat hovädzieho dobytká. Amplifikované PCR produkty boli vizualizované v 3 % agarózovom géle. V analyzovanej populácii zvierat boli detekované všetky tri genotypy pre β -LG gén, a to: genotyp AA (148 bp + 99 bp), genotyp AB (148 bp + 99 bp + 74 bp) a genotyp BB (99 bp + 74 bp). Najväčšie zastúpenie mal homozygotný genotyp BB s frekvenciou 0,6667 pred heterozygotným genotypom AB s frekvenciou výskytu 0,2564. Najmenej zastúpený bol genotyp AA s frekvenciou výskytu 0,0769. Genetickou analýzou populácie sme zistili frekvencie alel A a B génu β -LG, ktoré boli 0,2051 a 0,7949. β -LG je lokalizovaný na bovinom chromozóme 11. Genotyp AA β -LG je asociovaný s vysokým mliečnym výťažkom a genotyp BB je asociovaný s vysokým obsahom tuku a kazeínov potrebných pre výrobu syrov.

Kľúčové slová: mlieko, β -LG, hovädzí dobytok, PCR-RFLP

ABSTRACT

The aim of the work was identification of β -lactoglobulin gene polymorphism in the population of the Slovak pinzgau cattle. Bovine genomic DNA was isolated by method proteolytic hydrolyse of proteinase K, fenol-chlorophorm deproteinization and ethanol precipitation, which used in order to estimate β -lactoglobulin genotypes by means of PCR-RFLP method with using restriction enzyme *HaeIII* for β -LG. The material involved 39 animals of breed cattle. Amplified PCR products were visualized on 3 % agarose gel. We detected all three genotypes for β -LG gene: AA genotype (148 bp + 99 bp), AB genotype (148 bp + 99 bp + 74 bp) and genotype BB (99 bp + 74 bp) in our population. The BB genotype was the most frequent with observed frequency of 0,6667 while the frequency of the AB genotype was lower with frequency 0,2564. The AA genotype was represented with frequency of 0,0769. By using genetic analyse we detected in population the following frequency of alleles. Frequency of alleles A and B for gene β -LG were 0,2051 and 0,7949. β -LG is localized in bovinne chromosome 11. The AA genotype of β -LG is associated with hihg milk yield and the BB genotype is associated with high fat and casein content and is more desirable for cheese making.

Key words: milk, β -LG, breed cattle, PCR-RFLP

OBSAH

Obsah	7
Zoznam skratiek a značiek	9
Úvod	10
1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí	11
1.1 Charakteristika mlieka	11
1.1.1 Rozdelenie mliek	11
1.2 Produkcia mlieka	12
1.3 Zloženie mlieka.....	13
1.3.1 Voda.....	13
1.3.2 Laktóza.....	14
1.3.3 Mliečny tuk	15
1.3.4 Minerálne látky	16
1.3.5 Bielkoviny.....	17
1.3.6 Vitamíny	20
1.3.7 Enzýmy a hormóny	20
1.4 Klasifikácia kandidátskych génov kvality mlieka	21
1.4.1 Kazeínové bielkoviny	21
1.4.2 Srvátkové bielkoviny	23
1.5 Alergia na kravské mlieko	24
1.6 β -laktoglobulín.....	24
1.6.1 Štruktúra β -laktoglobulínu.....	25
1.6.2 Genetické varianty β -laktoglobulínu	28
1.6.3 Identifikácia a termostabilita β -laktoglobulínu.....	29
1.6.4 Genetický polymorfizmus β -laktoglobulínu.....	30
1.6.4.1 Vplyv genetického variantu β -laktoglobulínu na zloženie a vlastnosti mlieka	31
1.7 Molekulárno – genetické metódy detekcie polymorfizmu DNA.....	34
1.7.1 Techniky molekulárnych markerov založené na rôznych kombinácií reštrikčného štiepenia, hybridizácie a amplifikácie	35
1.7.2 Techniky molekulárnych markerov založené na metóde PCR.....	36
1.7.3 Techniky molekulárnych markerov založené na reštrikčnom štiepení.....	40

1.7.3.1	Reštrikčné endonukleázy	42
1.8	Analýza PCR produktov	44
1.8.1	Agarózová elektroforéza.....	44
2	Cieľ práce	46
3	Metodika práce a metódy skúmania	47
3.1	Materiál	47
3.2	Prístrojové vybavenie	47
3.3	Použité metódy	48
3.3.1	Izolácia genómovej DNA z krvi fenol-chloroformovou metódou.....	48
3.3.2	Meranie kvantitatívneho vyjadrenia nukleových kyselín na spektrofotometri	49
3.3.3	PCR - RFLP génu β -LG.....	50
3.3.4	Matematicko-štatistické vyhodnotenie genetickej štruktúry populácie	52
4	Výsledky práce	54
4.1	Izolácia genómovej DNA	54
4.2	PCR - RFLP génu β -LG.....	55
5	Diskusia.....	58
Záver		61
Použitá literatúra		62
Prílohy.....		72

ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

β -LG	beta-laktoglobulín
DNA	deoxyribonukleová kyselina
CSN1S1	as1-kazeínový systém
CSN1S2	as2-kazeínový komplex
CSN2	β -kazeínový systém
CSN3	kappa-kazeínový systém
LALBA, α -LA	α -laktalbumín
Asp	asparagín
Leu	leucín
Val	valín
Ala	alanín
PCR	polymerázová reťazová reakcia
VNTRs	variabilita v počte tandemových repetícií
AFLP	dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov
RAPD	náhodne amplifikovaná polymorfická DNA
RFLP	PCR – dĺžkový polymorfizmus reštrikčných fragmentov
RE	reštrikčné endonukleázy
ELFO	elektroforéza

ÚVOD

Mlieko tvorí jednu z najdôležitejších súčastí ľudskej stravy. Jeho vysoká biologická hodnota ho radí vo výžive na výnimočné miesto. Mlieko je prvá a jediná potrava človeka v prvých mesiacoch jeho života. Je prirodzeným zdrojom vápnika, esenciálnych mastných kyselín a bielkovín.

Mliečne bielkoviny sú predmetom intenzívneho výskumu pre svoj význam na ľudské zdravie a ako potenciálne markery úžitkových vlastností.

Mliečne proteíny sa tvoria z aminokyselín, polypeptidov a bielkovín krvnej plazmy. Obsahujú 18 z 22 známych esenciálnych aminokyselín.

Kravske mlieko obsahuje 3 – 4 % bielkovín, z čoho kazeínový komplex predstavuje približne 80 % obsahu celkových bielkovín.

β -laktoglobulín je hlavný srvátkový proteín mlieka prežúvavcov tvorí 60 – 80 % obsahu srvátkových bielkovín a 9,5 % z mliečnych bielkovín. Nachádza sa tiež v mlieku ďalších cicavcov, ale chýba v mlieku hlodavcov a ľudí. Je lokalizovaný na bovinom chromozóme 11. β -laktoglobulín bol prvý mliečny proteín, u ktorého bol detekovaný polymorfizmus.

V potravinárskom priemysle má β -laktoglobulín význam, pretože jeho vlastnosti sa využívajú pri spracovaní a výrobe mliečnych výrobkov. Má pozitívny vplyv na obsah bielkovín v mlieku a významne zlepšuje pomer proteínov k tuku. Je asociovaný s vysokým obsahom tuku a kazeínov potrebných pre výrobu syrov. Taktiež je najsilnejším a najčastejším potravinovým alergénom. Je to primárny antigén, ktorý dráždi imunitnú precitlivosť u dojčiat.

β -LG je extrémne stabilný proteín, ktorý existuje pri normálnom pH boviného mlieka ako dimér s molekulovou hmotnosťou 36 000 Daltonov a pozostáva zo 162 aminokyselinových zvyškov.

V súčasnosti je u hovädzieho dobytku známych 12 variant β -LG, z ktorých sú najfrekvencovanejšie A (β 1) a B (β 2) varianty. Neskôr boli objavené varianty: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W.

1 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY DOMA A V ZAHRANIČÍ

1.1 Charakteristika mlieka

Surové mlieko je v zmysle Potravinového kódexu SR definované ako sekret mliečnej žľazy získaný nadojením od jednej kravy, ovce, kozy alebo byvolej kravy alebo viacerých kráv, oviec kôz alebo byvolích kráv, ktorý nebol zahriaty na teplotu vyššiu ako 40 °C, alebo nebol ošetrovaný iným spôsobom, ktorý má rovnocenný účinok ako zahriatie na teplotu vyššiu ako 40 °C (NR EŠČ. 1662/2006).

1.1.1 Rozdelenie mliek

Mlieka možno deliť z viacerých hľadísk:

1. z praktického hľadiska:

- druhové mlieka – kravské, ovčie, kozie, byvolie a i.,
- kazeínové mlieka – v týchto mliekach je obsah kazeínu vyšší ako 75%; sú to mlieka prežúvavcov t.j. kravské, ovčie, kozie a i.,
- albumínové mlieka – v týchto mliekach je obsah kazeínu nižší ako 75%; sú to mlieka neprežúvavcov.

2. podľa štádia laktácie:

- nezrelé mlieko – mledzivo,
- zrelé mlieko – mlieko z obdobia od 5 (kravské) resp. 7 dní (ovčie, kozie) po pôrode do 4 – 6 týždňov pred pôrodom,
- starodojné – mlieko z obdobia konca laktácie t.j. z obdobia vysokého štádia gravidity – zasúšania,
- aberatné – mlieko z tzv. nepravej gravidity.

3. z technologického hľadiska:

- individuálne mlieko – pochádza od skupiny 1 až 5 samíc,
- zmiešané mlieko – pochádza od skupiny viac ako 5 samíc (Čuboň et al., 2007).

1.2 Produkcia mlieka

Mlieko sa tvorí v mliečnej žľaze dojníc, ktorá je jednou z najdôležitejších žliaz kože. Je tvorená zo štyroch samostatne produkujúcich súborov – štvrtiek. Súbor pozostáva z tzv. mliečnych jednotiek. Dojnica má v každom súbore vyvinutú len jednu mliečnu jednotku. Tá je tvorená mliečnymi alveolami, mliekovodnými kanálkami, cisternou a ceckom. Z hľadiska tvorby mlieka sú aktívnou funkčnou časťou mliečnej jednotky mliečnej alveoly s priemerom 0,1 – 0,3 mm. Tvorbu mlieka zabezpečuje jednovrstvový sekrečný epitel z mliekovodných buniek, ktorý vystiela mliečnu alveolu. Významnou časťou alveoly sú hladkosvalové tzv. košíčkovité bunky, ktoré sa nachádzajú okolo sekrečného epitelu v stene mliečnych alveol a majú význam pri vyprázdňovaní mlieka z vemena. Mliečne alveoly sú obklopené bohatou sieťou krvných kapilár, ktorých funkcia je rôznorodá (Semjan, 1994).

Všetky základné zložky, ktoré sú potrebné na tvorbu mlieka, odoberajú bunky sekrečného epitelu z krvi. Sekrécia mlieka nastáva v sekrečnom epiteli mliečnych alveol. Sekrečný epitel z krvi preberá niektoré zložky mlieka už hotové (voda, minerálne látky, vitamíny), ostatné zložky vznikajú činnosťou sekrečných buniek z dodaných stavebných materiálov. Pri syntéze tuku sú prekursorom jeho tvorby nízkomolekulové mastné kyseliny, najmä kyselina octová, ktorá vzniká v dostatočnom množstve pri fermentačných procesoch v bachore. Kazeín sa syntetizuje z glykoproteínových frakcií globulínov a čiastočne z doplnujúcich aminokyselín a kyseliny fosforečnej. Laktóza sa syntetizuje v sekrečnom epiteli mliečnej žľazy z glukózy a galaktózy, pričom hlavným prekursorom je glukóza, ktorá vzniká z octanov, propionátov a butyrátov, produkovaných v bachore prežúvavcov (Kološta, 2000).

Tvorba mlieka v mliečnej žľaze dojníc je riadená zložitou neurohormonálnou sústavou. Začiatok produkcie mlieka vo vemene dojnice súvisí s ukončením gravidity a odchodom lôžka z organizmu, čím je umožnený začiatok laktácie následkom stáleho pôsobenia hormónu prolaktínu. Prolaktín podnecuje činnosť mliečnych alveol. Tvorí sa už počas teľnosti, ale uvoľňuje sa až po otelení, keď prestáva činnosť progesterónu a estrogénu. Okrem toho sa pri tvorbe mlieka a činnosti hypofýzy zúčastňuje aj štítna žľaza, a to prostredníctvom hormónu tyroxínu. Na tvorbe mlieka sa čiastočne podieľa aj hormón nadobličiek (Gajdúšek, 2003).

1.3 Zloženie mlieka

Mlieko predstavuje zložitý biologický systém, v ktorom sa jednotlivé zložky nachádzajú v rôznom pomere. Sekrečné bunky mliečnej žľazy prijímajú stavebné častice z krvi či z lymfy, z nich syntetizujú mliečny tuk, laktózu a takmer všetky bielkoviny. Z krvnej plazmy prijímajú vodu a minerály (Gajdůšek, 2003).

Kravske mlieko sa skladá z komplexu zlúčenín organického a anorganického pôvodu, ktoré sa vyskytujú vo väčších koncentráciách, ale aj stopových množstvách. O zložení kravskeho mlieka informuje nasledujúca tabuľka (Chudý et al., 2000):

Tabuľka 1
Zloženie kravskeho mlieka

Pôvodné látky		Nepôvodné (cudzorodé) látky
Hlavné	Doplňujúce	
- voda (87 %) - laktóza (4,7 %) - tuk (3,7 %) - bielkoviny (3,2 %) - minerálne látky (0,8 %)	- biologicky aktívne látky: nebielkovinové dusíkaté látky, vitamíny, enzýmy, hormóny (1,4 %)	- pesticídy - liečivá - ťažké kovy - sanitačné prípravky - mykotoxíny - rádionuklidy a iné

1.3.1 Voda

Mlieko obsahuje 87 – 88 % vody. Voda sa vyskytuje vo forme: voľnej, viazanej na koloidy a viazaná chemicky. Voľná voda tvorí prevažnú časť vody v mlieku a je v nej rozpustená laktóza a minerálne látky (Gajdůšek, 2003).

Obsah viazanej vody v mlieku je 2 – 3,5 %. Je viazaná na koloidy a tvorí obaly koloidných častíc. Chemicky viazaná voda je veľmi silno viazaná na laktózu (Lukášová, 2001).

1.3.2 Laktóza (mliečny cukor)

V mlieku sa nachádzajú:

- monosacharidy – glukóza, galaktóza
- aminocukry – glukozamín, galaktozamín, kyselina neuraminová
- fosforečné estery sacharidov – glukózo-1-fosfát, glukózo-6-fosfát
- zložené cukry – laktóza, laktulóza (Lukášová, 2001).

Zo všetkých sacharidov v mlieku tvorí laktóza 90 %. Je disacharid zložený z glukózy a galaktózy, ktorý sa nikde inde v prírode nevyskytuje. Asi 85 % laktózy sa tvorí vo vemene z glukózy krvi, približne 12 % z uhlíkatých reťazcov plazmatických aminokyselín a zvyšok sa syntetizuje z iných zdrojov (Čuboň et al., 2007).

Laktóza sa vyskytuje iba v mlieku a to vo forme pravého roztoku. Jej obsah je v normálnom čerstvom mlieku od zdravej dojnice 47 g v 1 litri. Množstvo laktózy je za normálnych podmienok pomerne konštantné, závisí však do značnej miery od zdravotného stavu mliečnej žľazy. Asymetrický charakter prvého uhlíka na glukózovom zvyšku vytvára dve modifikácie laktózy, α - a β - formu. Obe formy majú rovnaké chemické vlastnosti, ale odlišné fyzikálne vlastnosti (Schaafsma, 2008).

Vlastná laktóza sa vyznačuje nízkou sladivosťou. Jej sladivosť je o 4/5 nižšia ako u sacharózy a pritom má vysokú výživnú hodnotu. Z chemickej stránky laktóza otáča rovinu polarizovaného svetla, je redukujúci disacharid a pomerne dobre znáša kyslé prostredie (Kološta, 2000).

Laktóza sa podieľa na niektorých fyzikálnych vlastnostiach mlieka ako je: osmotický tlak, bod mrznutia a bod varu. Pri teplotách nad 70 °C dochádza k miernemu hnednutiu mlieka, pretože mliečny cukor reaguje s ϵ -aminoskupinami lyzínu mliečnych bielkovín za tvorby melanoidov (Lukášová, 2001).

Karamelizácia nastáva pri teplotách vyšších ako 150 °C. Výslednou tvorbou melanoidov tzv. Maillardovou reakciou sa mení nielen farba mlieka na nahnedlú až svetlohnedú, ale aj chuť a ostatné sensorické vlastnosti mlieka. Z biochemických vlastností laktózy je pre mliekarstvo a výrobu všetkých fermentovaných mliečnych výrobkov najdôležitejšia schopnosť premeny laktózy na kyseliny, a to hlavne na kyselinu mliečnu. Pri tomto tzv. kysnutí mlieka, baktériami mliečneho kysnutia nastáva najskôr hydrolyza laktózy na glukózu a galaktózu. Potom nasleduje premena hexózu na kyselinu mliečnu cez

tvorbu kyseliny pyrohroznovej, ktorá sa redukuje na kyselinu mliečnu. Táto premena sa uskutočňuje pri výrobe všetkých kyslomliečnych nápojov a tiež pri výrobe tvarohov a syrov. Týmto spôsobom je samotná laktóza podstatne lepšie stráviteľná, a to i pre ľudí, ktorí sú intolerantní na laktózu. Fermentáciou laktózy vzniknutá kyselina mliečna výraznou mierou ovplyvňuje nielen chuť mliečnych výrobkov, ale zabezpečuje aj ich trvanlivosť, a hlavne nutričné a dietetické vlastnosti týchto kyslomliečnych výrobkov. Pozitívne ovplyvňuje črevnú mikroflóru a zabraňuje rastu hnilobných baktérií. Konzumácia kyslomliečnych výrobkov je zvlášť odporúčaná pri podávaní antibiotík, a to za účelom obnovenia pôvodnej črevnej mikroflóry. Tu majú zvláštny význam práve probiotické mliečne kultúry. Takéto kyslomliečne výrobky majú vynikajúci zdravotný účinok a sú vhodné pre všetky vekové i zdravotné kategórie (Čanigová et al., 1997).

1.3.3 Mliečny tuk

Mliečny tuk sa pokladá za najvariabilnejšiu zložku sušiny mlieka. Má veľmi komplikovanú štruktúru a zloženie.

Základnými zložkami sú:

- tri-, di- a monoacylglyceroly,
- voľné mastné kyseliny,
- fosfolipidy,
- steroly a estery sterolov,
- rozpustené vitamíny v tukoch (A, D, E, K) (Gajdůšek, 2003).

Mliečny tuk sa prevažne vyskytuje vo forme tukových guľôčok, ktoré sú pokryté obalom, tvoriaci lecitín, ako fosfolipidová vrstva priamo na tuku (tukovom jadre). Jej hrúbka je 2,2 nm a tvoria ju lecitín, kefalín, cerebrozidy, sfyngomyelín, cholesterín, karotenoidy a vitamín A. Na nej je bielkovinová vrstva (2,6 – 3,8 nm) ktorú tvoria enzýmy, proteíny a kovy (Fe, Cu - katalyzátor). Vonkajšiu vrstvu predstavuje hydratačná vrstva (50 – 100 nm), ktorú tvoria soli a voda (Chudý et al., 2000).

Tabuľka 2
Hlavné mastné kyseliny mliečneho tuku (URL 1)

Kyselina	Typ	Množstvo v %
Maslová	nasýtená	2,2 – 5,5
Kaprónová	nasýtená	1,3 – 3,3
Kaprylová	nasýtená	0,5 – 1,9
Kaprínová	nasýtená	0,3 – 3,0
Laurová	nasýtená	2,6 – 7,7
Myristová	nasýtená	9,7 – 22,6
Palmitová	nasýtená	25,8 – 38,9
Stearová	nasýtená	11,8 – 20,4
Olejová	nenasýtená	20,4 – 48,2
Linolová	nenasýtená	2,1 – 2,7
Linolénová	nenasýtená	0,7 – 1,3
Arachidonová	nenasýtená	0,6 – 1,2

1.3.4 Minerálne látky

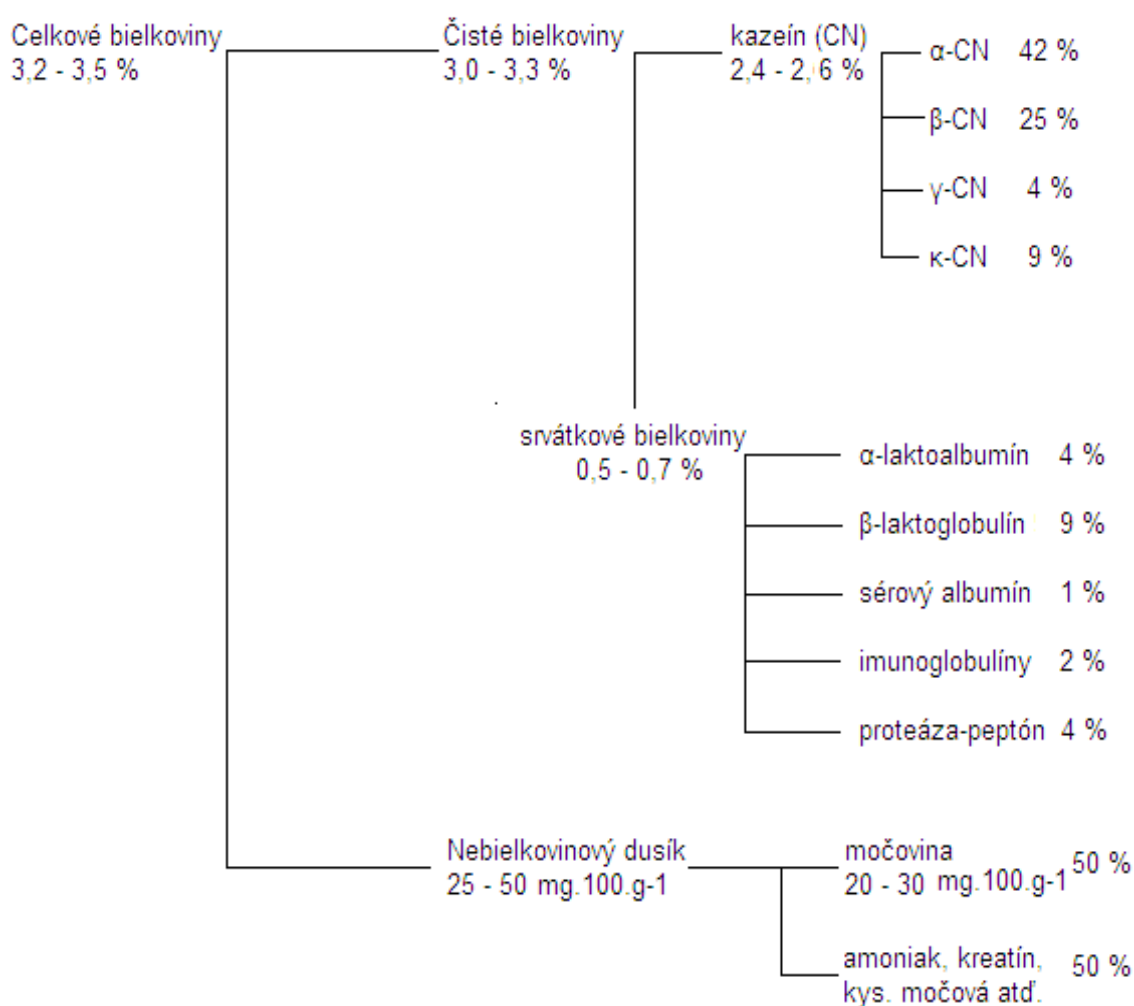
Mlieko obsahuje 14 minerálov, z toho vo väčšom množstve vápnik, fosfor, draslík, horčík, síru, sodík a chlór a v menšom množstve stopové prvky - železo, meď, kobalt, mangán, jód, zinok, fluór. Osobitne dôležitý je vysoký obsah a priaznivý pomer vápnika a fosforu v mlieku. Vo výžive človeka majú vápnik a fosfor nezastupiteľné postavenie pre stavbu kostí a zubov. Výskumy poukazujú na pozitívny vplyv voľných iónov vápnika z mlieka a mliečnych výrobkov na znižovanie obsahu cholesterolu v krvi. Z mlieka a mliečnych výrobkov získava človek až 56 % svojej potreby vápnika. Vápnik a fosfor hrajú významnú úlohu aj pri rôznych metabolických pochodoch cukrov, tukov, nukleových kyselín a pri transporte iónov (URL 2).

1.3.5 Bielkoviny (mliečne proteíny)

Mliečne proteíny sa tvoria z aminokyselín, polypeptidov a bielkovín krvnej plazmy. Obsahujú 18 z 22 známych esenciálnych aminokyselín, potrebných na stavbu a udržiavanie ľudského organizmu. Tieto esenciálne aminokyseliny si organizmus nevie vytvoriť sám. Samotná biologická hodnota mliečnych bielkovín je vôbec najvyššia, až 98 % z nich sa využije v prospech výstavby organizmu a jeho životných funkcií. Mliečne proteíny sú aj neoddeliteľnou súčasťou hormónov a enzýmov. Ich nedostatok môže spôsobiť poruchy rastu, resp. nedostatočne vyvinutú svalovú hmotu. Mliečne proteíny sa získavajú z odstredeného mlieka (zbaveného tukov) (Burdová et al., 2004).

Bielkoviny sú súčasťou zložitého komplexu dusíkatých látok v mlieku, ktoré označujeme ako celkové bielkoviny.

Schéma dusíkatých látok v mlieku (URL 3):



Biologická aktivita (funkcia) bielkovín (Holec, 1989):

1. *Kazeíny* (28 g.l^{-1}): transport iónov (vápnika, železa, medi, zinku, fosforečnanov), prekursor biologicky aktívnych peptidov,
2. *β -laktoglobulín* ($1,3 \text{ g.l}^{-1}$); *α -laktalbumín* ($1,2 \text{ g.l}^{-1}$): transport vitamínu A, syntéza laktózy v mliečnej žľaze, transport vápniku, udržiavanie imunity, antikarcinogénne účinky,
3. *Imunoglobulíny A, M a G* ($0,7 \text{ g.l}^{-1}$): udržiavanie imunity,
4. *Glykomakropeptid* ($1,2 \text{ g.l}^{-1}$): antivírusové a bifidogénne účinky,
5. *Laktoferín* ($0,1 \text{ g.l}^{-1}$): antimikróbne, antioxidačné a antikarcinogénne účinky, udržiavanie imunity, využiteľnosť železa z potravy,
6. *Laktoperoxidáza* ($0,03 \text{ g.l}^{-1}$): antimikróbne účinky,
7. *Lyzozým* ($0,0004 \text{ g.l}^{-1}$): antimikróbne účinky.

Zloženie mliečnych bielkovín

Kravske mlieko obsahuje 3 – 4 % bielkovín, z čoho kazeínový komplex predstavuje približne 80 % obsahu celkových bielkovín. β -laktoglobulín tvorí 60 – 80 % obsahu srvátkových bielkovín (Trakovická et al., 2002).

Chudý et al. (1998) uvádza, že v kravskom mlieku sa nachádzajú tri hlavné bielkovinové frakcie, a to kazeínová, laktalbumínová a laktoglobulínová. Každá frakcia je zmesou niekoľkých bielkovín s rôznymi genetickými variantmi. Hlavnú bielkovinovú frakciu – kazeínovú, ktorá predstavuje asi 80 % bielkovín mlieka tvoria α_{S1} -, α_{S2} -, beta-, κ -kazeín.

Percentuálne zastúpenie mliečnych proteínov ako ich uvádza Botto (1984) je nasledovné:

Tabuľka 3
Percentuálne zastúpenie mliečnych proteínov

Mliečne proteíny	Percentuálne zastúpenie
α -kazeín	45 – 63 %
β -kazeín	19 – 28 %
κ -kazeín	3 – 7 %
α -laktalbumín	2 – 7 %
β -laktoglobulín	7 – 12 %
mliečny séralbumín	0,7 – 1,3 %
imunoglobulín – englobulín	0,7 – 1,7 %
imunoglobulín – pseudoglobulín	0,6 – 1,4 %

Jednotlivé proteíny sa líšia zložením, stavbou ako i vlastnosťami, čo má praktické využitie pri výrobe niektorých mliečnych výrobkov.

Podľa Kažimíra a Gemeriho (1993) kravské mlieko obsahuje 3,0 – 3,5 % plnohodnotných proteínov. Ide o heterogénne zmesi frakcií, ktoré tvoria dve hlavné skupiny:

- kazeín tvorí až 80 % laktoproteínov,
- srvátkové bielkoviny tvoria 20 % všetkých mliečnych bielkovín.

Obe skupiny sa od seba odlišujú chemickým zložením, technologickými vlastnosťami a nutričnou hodnotou.

Z proteínov obsiahnutých v mlieku dominuje:

- kazeín (α_1 , α_2 , β a κ),
- srvátkové proteíny (α -laktalbumín, β -laktoglobulín, imunoglobulíny, bovinný sérový albumín) (Burdová et al., 2004).

1.3.6 Vitamíny

V mlieku sa nachádzajú všetky vitamíny, i keď koncentrácia niektorých je iba minimálna (zvýšená hladina vitamínov je v mledzive). Prehľad jednotlivých vitamínov a ich priemerný obsah v mlieku udáva nasledujúca tabuľka (Ingr, 2003):

Tabuľka 4
Prehľad vitamínov

Vitamín		Rozpustnosť	Obsah vitamínov (mg.kg ⁻¹)
Označenie	Názov		
A	retinol	rozpustné v tukoch	0,1 – 0,3
D	kalciferol		0,001
E	tokoferol		0,2 – 1,2
K	fylochinon		0,01 – 0,03
B ₁	tiamín	rozpustné vo vode	0,3 – 0,7
B ₂	riboflavín		0,2 – 0,3
B ₆	pyridoxín		0,2 – 2,0
B ₁₂	kobalamín		0,01 – 0,03
B ₅	kys. pantoténová		0,4 – 4,0
PP	niacín		0,8 – 5,0
C	kys. L-askorobová		5,0 – 20

1.3.7 Enzýmy a hormóny

V kravskom mlieku bol detekovaný veľký počet enzýmov, ktoré sú syntetizované v mliečnej žľaze, a niektoré sa dostávajú z krvi do mlieka. Okrem natívnych enzýmov (peroxidáza, lipáza, fosfatáza a i.) obsahuje mlieko aj mikrobiálne enzýmy z kontaminujúcej mikroflóry (proteázy, reduktázy a i.) (Ingr, 2003).

Všetky hormóny, ktoré sú produkované v tele alebo dodané z vonka sú vylučované aj do mlieka (Gajdůšek, 2003).

1.4 Klasifikácia kandidátskych génov kvality mlieka

Hoci sa v mlieku odlišných druhov vyskytujú kvantitatívne aj kvalitatívne rozdiely, môžu byť mliečne proteíny všetkých cicavcov rozdelené do dvoch tried: kazeíny (α_1 , α_2 , β a κ) a srvátkové proteíny (β -laktoglobulín, α -laktalbumín) (Jost, 1993).

1.4.1 Kazeínové bielkoviny

α_{S1} -kazeínový systém (CSN1S1)

Kazeíny sú hlavné mliečne proteíny cicavcov. Majú dve základné funkcie pre cicajúce mláďatá:

- a) slúžiť ako hlavný zdroj aminokyselín,
- b) transportovať fosfát a vápnik v dostatočných množstvách pre podporu rastu kostí.

U hovädzieho dobytku je α_{S1} -kazeín lokalizovaný na 6. chromozóme (Kučerová et al., 2006).

Polypeptidový reťazec sa skladá zo 199 aminokyselín. V prítomnosti vápenatých iónov tvorí nerozpustnú vápenatú soľ. Fragmenty α_{S1} -kazeínu sa považujú za λ -kazeín (Velíšek, 2002).

U hovädzieho dobytku bolo identifikovaných osem genetických variant tohto proteínu: A, B, C, D, E, F, G, H (Miluchová et al., 2009).

Genotyp BB významne ovplyvňuje výťažnosť mlieka, tuku a proteínov. Genotypy BC a BB zvyšujú percento proteínov v mlieku (Ferretti et al., 1990). Genotyp BC zvyšuje produkciu tuku. Syrenina z kravského mlieka s variantom A CSN1S1 je mäkkšia ako syrenina z mlieka s obsahom C variantu.

α_{S2} -kazeínový systém (CSN1S2)

α_{S2} -kazeín má podobnú štruktúru ako α_{S1} -kazeín, je však menej citlivý na prítomnosť vápenatých iónov (Velíšek, 2002).

Hovädzí dobytok má α_{S2} -kazeín lokalizovaný na chromozóme 6 (Ferretti et al., 1990). Sekvenciu CSN1S2 A, najrozšírenejšieho variantu, prvý popísali Brignon et al. (1977). Pozostáva z 207 aminokyselinových zvyškov s molekulovou hmotnosťou 25 150 –

25 390 Da. Pre bovinný CSN1S2 sú známe len štyri varianty: A, B, C, D (Grosclaude, 1976). Najbežnejší je genetický variant A a je rozšírený u všetkých druhov. Variant B sa vyskytuje len zriedka a nie je dostatočne charakterizovaný. Genetický variant C sa líši od A variantu tromi substitúciami, a to v pozícii 33 Glu→Gly, v pozícii 47 Ala→Thr a v pozícii 130 Thr→Ile. Posledný objavený variant CSN1S2 D je charakteristický deléciou 9 aminokyselín (51 – 59), zodpovedajúcich celému exónu.

β-kazeínový systém (CSN2)

Tento proteín obsahuje 209 aminokyselín (Velíšek, 2002).

U hovädzieho dobytká je β-kazeín lokalizovaný na chromozóme 6 (Kučerová et al., 2006).

β-kazeín má celý komplex genetických variantov: A, A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G (Miluchová et al., 2009).

Koncom 90-tych rokov minulého storočia bol kazeínový variant A1 zaradený medzi rizikový faktor pre diabetes mellitus typ 1 a ischemické srdcové ochorenie u ľudí (Jost, 1993). Je to zapríčinené štiepením β-kazeínového variantu A1 na β-kazomorfín-7, ktorý môže zohrávať úlohu pri niektorých ľudských chorobách. Tiež bol dokázaný vzťah β-kazomorfínu-7 k syndrómu náhleho úmrtia dojčiat (SIDS) (Kučerová et al., 2006).

Genotyp A1A1 má pozitívny vplyv na obsah tuku (Panicke et al., 1996). Variant A2 redukuje sérový cholesterol. Genotyp A2A2 má priaznivý vplyv na produkciu mlieka, tuku a bielkovín v kilogramoch. Variant A3 vplýva na produkciu mlieka.

κ-kazeínový systém (CSN3)

Primárna štruktúra tohto proteínu je tvorená 169 aminokyselinami s molekulovou hmotnosťou 19 007 Da (Velíšek, 2002).

U hovädzieho dobytká je CSN3 lokalizovaný na chromozóme 6 (Bovenhuis, 1992).

CSN3 bol posledný z hlavných mliečnych proteínov, u ktorých bol detekovaný polymorfizmus. U hovädzieho dobytká bolo identifikovaných 11 genetických variant: A, A1, B, B2, C, E, F, G, H, I, J (Miluchová et al., 2009).

Genotyp AA vplýva na vyššiu produkciu mlieka (kg), nižší obsah tuku a bielkovín (%), pomalšiu syriteľnosť, nižšiu akosť a produkciu syreniny, nižšiu výťažnosť syra. Genotypy AB a BB zvyšujú tukovosť mlieka a obsah bielkovín. Genotyp BB má pozitívny

vplyv na syriteľnosť, zvyšuje výtťažnosť syra a znižuje obsah syrového prachu v srvátke a skracuje dobu syrenia (Kučerová et al., 2006).

1.4.2 Srvátkové bielkoviny

Tvoria 20 % z bielkovín mlieka alebo 0,7 % z objemu mlieka. Ako srvátkové bielkoviny sa označuje časť bielkovín, ktoré zostanú v roztoku po vyzrážaní kazeínu syridlom alebo kyselinami a koagulujú pri teplotách okolo 60 – 70°C (Grieger et al., 1990).

β -laktoglobulin (β -LG)

Polypeptidový reťazec β -LG je tvorený 162 aminokyselinami (Gajdůšek, 2003).

Je lokalizovaný na hovädzom chromozóme 11 (Blahová et al., 2004).

β -LG má schopnosť viazať a prenášať vitamín A a schopnosť viazať mastné kyseliny. Táto vlastnosť súvisí s biologickou úlohou tohto proteínu. Prenáša tieto látky novorodeným mláďatám (Urban, 1997).

Genotyp AA β -LG je asociovaný s vysokým mliečnym výtťažkom, má pozitívny vplyv na obsah bielkovín v mlieku a významne zlepšuje pomer proteínov k tuku (Panicke et al., 1997). Alela A β -LG spolu s alelami A2 CSN2 génu a B CSN3 génu aditívne zvyšujú pomer proteínov k tuku. Genotyp BB je asociovaný s vysokým obsahom tuku a kazeínov potrebných pre výrobu syrov (Mao et al., 1992).

α -laktalbumín (LALBA, α -LA)

Je po β -LG druhou najviac zastúpenou srvátkovou bielkovinou. Primárna štruktúra je tvorená 123 aminokyselinami. α -LA má vysokú biologickú hodnotu, ktorá je daná vysokým obsahom cysteínu, tryptofánu a lyzínu (Zadrazil, 2002) a je tiež súčasťou enzymatického systému, ktorý syntetizuje laktózu (Urban, 1997).

Hovädzí α -laktalbumín je lokalizovaný na 5. chromozóme (Schaar et al., 2007).

Genotyp AA zvyšuje množstvo mlieka (kg) a tuku (kg). Genotyp BB zvyšuje percento bielkovín a tuku. Genotyp AB má stredné hodnoty pre všetky sledované znaky (Ng-Kwai-Hang, 1998).

1.5 Alergia na kravské mlieko

Kravské mlieko patrí k potravinám, ktoré vyvolávajú alergické reakcie. Postihuje hlavne dojčatá a malé deti do troch rokov (Ettlerová, 2007).

Potravinové alergény majú najčastejšie bielkovinový charakter. Medzi alergény kravského mlieka patrí kazeín, β -laktoglobulín, α -laktoglobulín, bovinný sérový albumín a bovinný laktoferín. Za hlavný alergén sa pokladá β -LG, ktorý spôsobuje 60 – 80 % alergických prejavov. Prechádza až do materského mlieka, čo vysvetľuje alergiu aj u úplne dojčiacich detí. Najmenej antigénny je α -laktoglobulín, jeho reziduá sa nachádzajú v potravinách obohatených laktózou. Môže byť inhalačným alergénom (URL 4).

Tabuľka 4

Zoznam hlavných potravinových alergénov kravského mlieka (Ettlerová, 2007)

Alergén	Biochemické meno	Molekulová hmotnosť (kDa)
Bos d 4*	α -laktoglobulín	0,2
Bos d 5*	β -laktoglobulín	18,3
Bos d 6*	sérový albumín	67,0
Bos d 7*	imunoglobulín	16,0
Bos d 8*	kazeíny	20 – 30

* označenie alergénov kravského mlieka je odvodené rovnako ako ostatné alergény od druhového názvu, od *Bos taurus domesticus* (tur domáci)

1.6 β -laktoglobulín

Je hlavný srvátkový proteín mlieka prežúvavcov. Nachádza sa tiež v mlieku ďalších cicavcov, ale chýba v mlieku hlodavcov a ľudí (Hambling et al., 1992).

Je lokalizovaný na bovinnom chromozóme 11 a kóduje hlavný srvátkový proteín (Blahová et al., 2004).

V potravinárskom priemysle má β -laktoglobulín význam, pretože jeho vlastnosti sa využívajú pri spracovaní a výrobe mliečnych výrobkov. Taktiež je najsilnejším a najčastejším potravinovým alergénom (Sawyer et al., 2000).

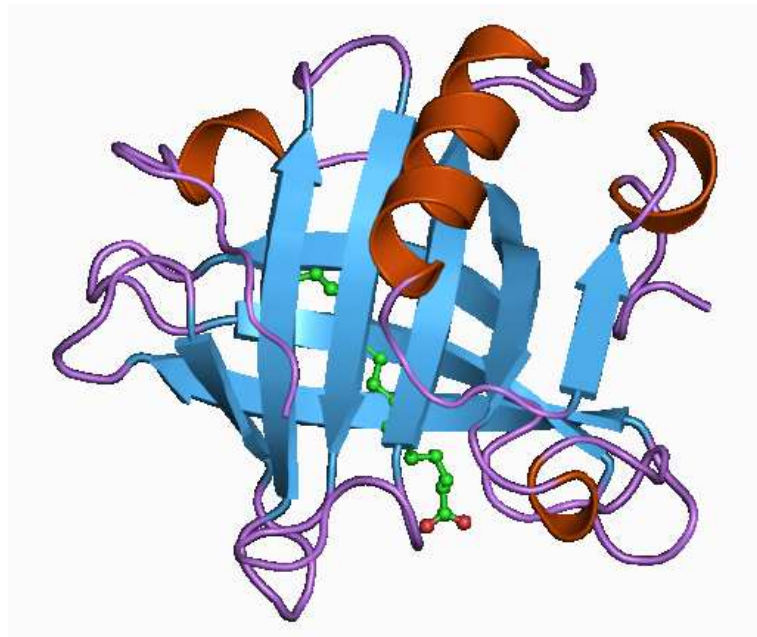
1.6.1 Štruktúra β -laktoglobulínu

Signálny peptid β -LG je u hovädzieho dobytku tvorený 16 aminokyselinami. Transkripčná jednotka má rozsah 4,7 kilobáz usporiadaných v siedmych malých exónoch a šiestich intrónoch v rozpätí od 213 bp do 1 116 bp. Prvý exón obsahuje 5' neprekladanú oblasť a sekvenciu kódujúcu signálny peptid a prvých štrnásť aminokyselín. 3' neprekladaná oblasť je obsiahnutá v exóne 6 a 7 (Hayes a Petit, 1993).

β -LG je extrémne stabilný proteín, ktorý existuje pri normálnom pH bovinného mlieka ako dimér s molekulovou hmotnosťou 36 000 Da. Jednovláknový polypeptid s molekulovou hmotnosťou 18 kDa pozostáva zo 162 aminokyselinových zvyškov (Creamer et al., 1983).

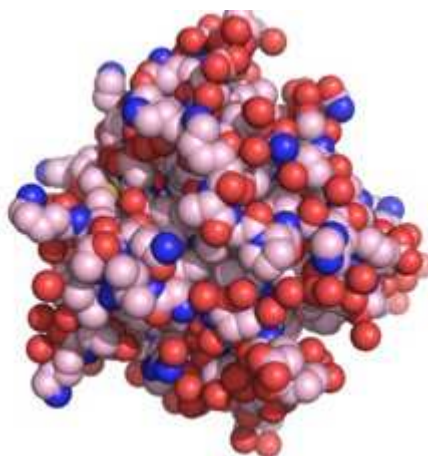
Obrázok 1

Štruktúra β -laktoglobulínu (Bromley et al., 2005)



Obrázok 2

Kryštalická štruktúra β -laktoglobulínu (Kontopidis et al., 2004)



Obrázok 3

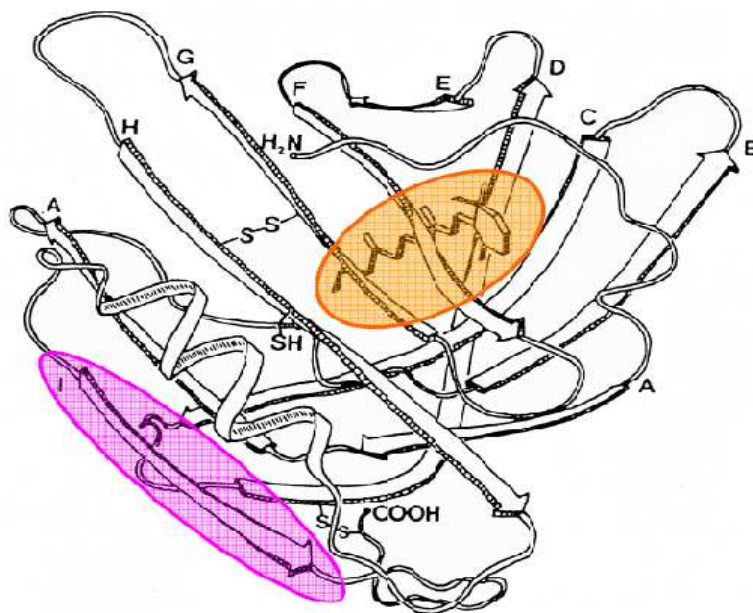
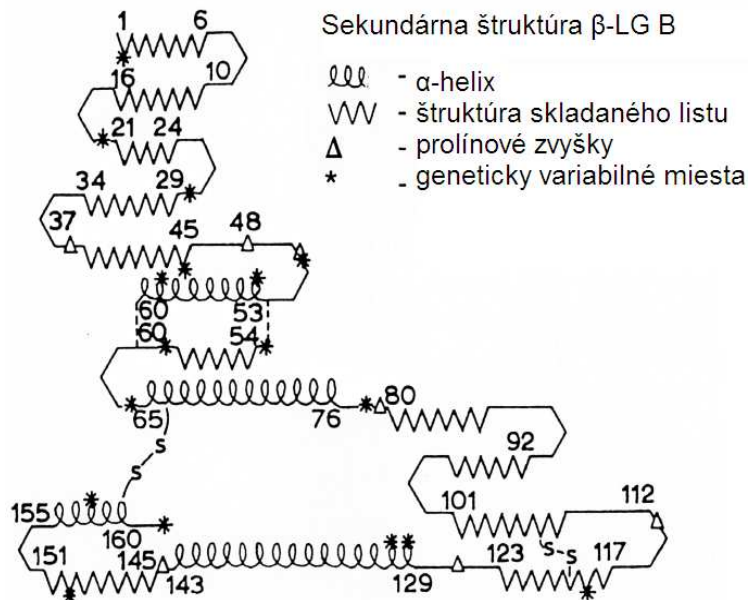
Primárna štruktúra β -laktoglobulínu (URL 5)

```
1                               10                               20
                               |<---helical--->| |<----  $\beta$ -A -----
H-Leu-Ile-Val-Thr-Gln-Thr-Met-Lys-Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys-Val-Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr-
21                               30                               40
-----  $\beta$ -A ---->| |<-helical->|
Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg-
41                               50                               60
|<-----  $\beta$ -B ----->| |<---  $\beta$ -C -----
Val-Tyr-Val-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu-Ile-Leu-Leu-Gln-Lys-
61                               70                               80
 $\beta$ -C-->| |<---  $\beta$ -D ----- -->|
Trp-Glu-Asn-Gly-Glu-Cys-Ala-Gln-Lys-Lys-Ile-Ile-Ala-Glu-Lys-Thr-Lys-Ile-Pro-Ala-
81                               90                               100
|<---  $\beta$ -E --- -->| |<-----  $\beta$ -F ----->|
Val-Phe-Lys-Ile-Asp-Ala-Leu-Asn-Glu-Asn-Lys-Val-Leu-Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys-
101                              110                              120
|<-----  $\beta$ -G ----->| |<-helical->| |<----  $\beta$ -H ---
Lys-Tyr-Leu-Leu-Phe-Cys-Met-Glu-Asn-Ser-Ala-Glu-Pro-Glu-Gln-Ser-Leu-Ala-Cys-Gln-
121                              130                              140
---  $\beta$ -H -->| |<-----  $\alpha$ -helix ----->|
Cys-Leu-Val-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu-Ala-Leu-Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-Ala-Leu-
141                              150                              160
                               |<----  $\beta$ -I ---->| |<---helical--->|
Lys-Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg-Leu-Ser-Phe-Asn-Pro-Thr-Gln-Leu-Glu-Glu-Gln-Cys-
162
His-Ile-OH
```

Obrázok 4

Sekundárna a terciárna štruktúra β -laktoglobulínu (URL 5)

Vysoko usporiadaná štruktúra: 10 – 15 % α -helix, 43 % - β -štruktúra, 47 % neusporiadaná štruktúra



Trojrozmerná štruktúra β -LG s naviazaným retinolom;
 šípky a pásiky β -štruktúry

1.6.2 Genetické varianty β -laktoglobulínu

V súčasnosti je u hovädzieho dobytku známych 12 variant β -LG, z ktorých sú najfrekventovanejšie A (β 1) a B (β 2) varianty (Aschaffenburg, Drewry, 1957). Neskôr boli objavené varianty: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W, ale najfrekventovanejšie alely sú A a B, ktoré sa odlišujú v poradí aminokyselín na pozícii 64 a 118 (Panicke et al., 1996). Pre variant A je na pozícii 64 asparagín (Asp) a na pozícii 118 je valín (Val) a u variantu B je na pozícii 64 glycín (Gly) a na pozícii 118 alanín (Ala). Frekvencia ostatných alel je veľmi nízka okrem alely D, ktorá sa vyskytuje u jaka (Chrenek, 1997).

Variant C sa líši od variantu B substitúciou Gln na His v pozícii 59. Pri variante D je substituovaný v pozícii 45 Glu za Val, vzhľadom na genetický variant B. Variant D sa odlišuje od variantu B tromi aminokyselinami, a to Gly v pozícii 64, ktorý je substituovaný Asp, v pozícii 118 je Ala substituovaný Val a v pozícii 28 je namiesto Asp prítomný Asp-CHO. Variant E sa líši od variantu B zámenou Glu za Gly v pozícii 158. Variant F sa líši od variantu B v pozícii 158, kde je zamenený Glu za Gly v pozícii 50, kde je zamenený Pro za Ser a v pozícii 130, kde je zamenený Asp za Tyr. Rozdiel medzi variantom B a W je v pozícii 56, kde variant B má Ile a variant W má Leu. Genetický variant B sa líši od variantu I v pozícii 108, kde je substituovaný Glu za Gly a od variantu J v pozícii 126, kde je substituovaný Pro za Leu (Miluchová et al., 2009).

Tabuľka 5

Genetické varianty s pozíciami sú uvedené nasledovne (URL 5)

Genetické varianty	Pozície											
	45	50	56	59	64	70	78	108	118	126	129	158
A					Asp				Val			
B	<i>Glu</i>	<i>Pro</i>	<i>Ile</i>	<i>Gln</i>	<i>Gly</i>	<i>Lys</i>	<i>Ile</i>	<i>Glu</i>	<i>Ala</i>	<i>Pro</i>	<i>Asp</i>	<i>Glu</i>
C				His								
D	Gln											
E												Gly
F		Ser									Tyr ²	Gly
G							Met					Gly
H					Asp	Asn			Val			
I								Gly				
J										Leu		
W			Leu									

1.6.3 Identifikácia a termostabilita β -laktoglobulínu

Srvátkové bielkoviny tvoria 20 % z bielkovín mlieka alebo 0,7 % z objemu mlieka. Ako srvátkové bielkoviny sa označuje časť bielkovín, ktoré zostanú v roztoku po vyzrážaní kazeínu syridlom alebo kyselinami a koagulujú pri teplotách okolo 60 - 70°C (Grieger et al., 1990).

β -laktoglobulín sa vyznačuje vysokým obsahom lyzínu (vyše 11 %), valínu (15 – 16 %), prípadne cysteínu a cystínu (3,4 %) (Uhrinova et al., 2000). Denaturuje od 65 °C a pri zahriatí vytvára s α -laktoalbumínom a κ -kazeínom komplex, ktorý v celom mlieku zvyšuje jeho termostabilitu (oproti denurácii v srvátke) a inhibuje syriteľnosť mlieka (Pervaiz et al., 1999). Plní teda dôležitú technologickú funkciu, a to najmä preto, že pri silnejšom zahriatí mlieka (napr. pri 80°C počas niekoľkých sekúnd) sa v dôsledku tepelnej denaturácie bielkovín obnažia SH (sulfhydridové skupiny) skupiny cysteínu, ktoré majú schopnosť viazať stopové množstvá ťažkých kovov (hlavne medi) nežiaduco znečisťujúcej mlieko alebo smotanu (Uhrinova et al., 2000).

Poznatky o tepelnej stabilite β -LG nie sú celkom jednoznačné. Niektoré štúdie uvádzajú, že mlieko od nositeľiek genetického variantu β -LG BB je viac citlivé na pôsobenie tepla (Dalglish, 1995), zatiaľ čo z výsledkov iných autorov (Jakob, 1995; Chrenek, 1997) uvádzajú, že najvyššia tepelná stabilita bola dosiahnutá práve u mlieka dojníc s β -LG BB.

Michalcová, Čanigová (1997) uvádzajú, že rozdiely v tepelnej stabilite medzi jednotlivými genetickými variantmi β -LG neboli preukázané, pričom zistili, že β -LG BB je citlivejší na pôsobenie tepla ako β -LG BB, resp. β -LG AA. Ďalej Van den Berget al. (1992) zistili, že termostabilita mlieka pri zahriatí na 125°C u genetického variantu β -LG AA odoláva tejto teplote najdlhší čas, a naopak β -LG BB najkratší čas.

Odlíšnosti jednotlivých genetických variant β -LG ovplyvňujú aj technologické vlastnosti mlieka. Na základe zistených poznatkov Gajdůšek (1997) uvádza, že u genotypov β -LG sa javí pre výrobu syrov výhodnejšie mlieko nositeľiek alely B. Tieto výsledky boli zistené tak u surového ako i pasterizovaného mlieka.

1.6.4 Genetický polymorfizmus β -laktoglobulínu

Bielkoviny sú vo svojich vlastnostiach a funkciách veľmi rôznorodé, avšak ich spoločným znakom je, že sú tvorené aminokyselinami. Poradie aminokyselín v polypeptidovom reťazci určuje tzv. primárnu štruktúru bielkoviny. Každá bielkovina má prísne špecifické, geneticky determinované usporiadanie aminokyselín. Ak dôjde k zámene aminokyselín s kladným alebo záporným elektrickým nábojom s neutrálnou aminokyselinou, má to za následok zmenu elektrického náboja celej molekuly bielkoviny, a tým aj zmenu v elektroforetickej pohyblivosti (Jakob et al., 1992).

Genetický polymorfizmus proteínov má vo väčšine prípadov základ vo výskyte dvoch alebo viac alel jedného génu v populácii. Vznik rôznych alel, a tým aj rôznych variantov proteínu možno vysvetliť mutáciami. O proteínoch, ktoré sa vyskytujú v populácii vo viacerých variantoch, hovoríme ako o polymorfných znakoch (Nový et al., 1998).

Produkcia a obsah bielkovín sú okrem výrazného genetického vplyvu ovplyvnené výživou, zdravotným stavom, štádiom laktácie a inými faktormi. Selekcia zvierat na

základe genotypov β -LG vedie k zlepšeniu kvality mliečnych produktov (Robitaille et al., 2002).

Vzťah medzi genotypom alel kódujúcich proteíny a kvantitatívnymi a kvalitatívnymi parametrami mliečnej úžitkovosti boli študované od päťdesiatych rokov, kedy Aschaffengurg a Drewery (1957) popísali prvý výskyt polymorfizmu β -laktoglobulínu – najdôležitejšej bielkovine srvátky, teda výskyt dvoch foriem tejto bielkoviny, ktoré sa líšia poradím aminokyselín v reťazci (Jandurová et al., 2002).

Genetická variabilita mliečnej bielkoviny β -laktoglobulínu je zaujímavá z hľadiska výskumu, plemenitby hovädzieho dobytká a spracovania mlieka pre pozitívny vplyv niektorých alel, najmä B alely β -laktoglobulínu, na obsah bielkovín, zloženie mlieka a jeho technologické vlastnosti (Chrenek et al., 1996).

1.6.4.1 Vplyv genetického variantu β -laktoglobulínu na zloženie a vlastnosti mlieka

Zistilo sa, že mlieko produkované AA genotypom obsahuje viacej laktoglobulínu, menej kazeínu a menej tuku, ako získané z BB genotypu kráv (Patel et al., 2006).

V literatúre všeobecne prevláda zhoda, že genetické varianty β -laktoglobulínu hovädzieho dobytká sú späté s výkonnosťou laktácie a majú hlavný vplyv na zloženie mlieka, jeho spracovateľské vlastnosti, vrátane výťažnosti syreniny. BB genotyp β -LG je spätý s vyšším obsahom tukov a kazeínov, a tým je žiaducejší pre výrobu syrov (Uhrín et al., 1994). Viacerí autori (Kopečný et al., 1996, Foltys, 1996) poukazujú na asociáciu BB β -LG s vyššou produkciou tuku. Hill (1993) konštatuje, že mlieko kráv s genetickým variantom BB β -LG obsahuje o 11 % viac tuku ako mlieko kráv s variantom AA a AB β -LG, čiže je spojený s vyšším percentom tuku.

Obsah β -LG závisí od genotypu tohto lokusu a jeho množstvo klesá v poradí AA>AB>BB. Množstvo β -LG u varianty AA ($4,96 \text{ g.l}^{-1}$) viac než dvojnásobne prevyšuje množstvo β -LG zistené u varianty BB ($2,24 \text{ g.l}^{-1}$). Heterozygotná kombinácia AB má vyššie percento β -LG a množstvo bolo zistené na úrovni $4,56 \text{ g.l}^{-1}$, čo je hodnota vyššia o $0,96 \text{ g.l}^{-1}$ než priemer medzi AA a BB variantom ($x = 3,60 \text{ g.l}^{-1}$) (Jandurová et al., 2002). Genotyp β -LG ovplyvňuje aj expresiu kazeínových lokusov. Kombinácia β -LG BB zvyšuje celkovú produkciu kazeínov.

Genetické varianty β -LG majú vplyv na obsah kazeínu v mlieku. Z výsledkov van den Berga et al. (1992) vyplýva, že najvyšší obsah kazeínu bol u genetickej varianty BB 3,08 %, vyšší u AB 3,98 % a najnižší bol u AA 2,93 %.

Pri hodnotení obsahu kazeínu sa v literatúre častejšie používa vyjadrenie pomocou kazeínového čísla, ktoré udáva pomer kazeínu k celkovým bielkovinám (Gajdůšek, 1997). Pri porovnaní vplyvu variant β -LG u jednotlivých plemen hovädzieho dobytku na kazeínové číslo dospeli Jakob a Puhan (1992) k záveru, že pri variante BB β -LG v porovnaní s AB je kazeínové číslo vyššie u všetkých sledovaných plemien.

Van den Berg et al. (1992) uvádzajú nasledovné hodnoty kazeínového čísla u variant β -LG:

Tabuľka 6
Hodnoty kazeínového čísla u variant β -LG

Genotyp	Hodnota kazeínového čísla (v %)
AA	76,4
AB	78,2
BB	80,2

Na základe hodnotenia kazeínového čísla vyplýva, že mlieko kráv s genetickým variantom BB β -LG dosahuje najvyššie hodnoty.

Genotyp BB β -LG je asociovaný s vyšším obsahom kazeínu v mlieku, ako v mlieku kráv s genotypom AA β -LG, keďže genotyp AA je spojený s vyšším množstvom srvátkových bielkovín a celkového obsahu bielkovín (Kopečný et al., 1996; Bulla 1994). Lundén et al. (1997) zistili, že alela β -LG zvyšuje obsah kazeínov v mlieku o 0,4 až 2 g/l. Túto tendenciu potvrdzuje aj Hill (1993), ktorý uvádza, že v mlieku dojníc a genotypom AA β -LG sa nachádza o 7 % menej kazeínu ako v mlieku dojníc s genotypom BB β -LG.

Trakovická, Strapáková a Ostertág (2002) zistili, že najvyššia produkcia mlieka 533,41 kg bola u homozygotných dojníc s genotypom AA, u ktorých bola zároveň zistená i najvyššia produkcia laktózy 219,28 kg, tuku 203,61 kg a bielkovín 154,15 kg. Najnižšiu

produkcii vo vybraných ukazovateľoch zistili pri heterozygotných kombináciách, v ktorých genotypov sa vyskytovala alela C. Pri heterozygotných kombináciách bola zistená vyššia variabilita ako pri homozygotných kombináciách.

Tabuľka 7

Diferencie a ich preukaznosť pre produkčné ukazovatele (Trakovická et al., 2002)

Genotypy	Mlieko (kg)	Laktóza (kg)	Tuk (kg)	Bielkoviny (kg)
AA – AB	89,73	5,87	8,12	2,52
AA – AC	136,56	4,99	22,53	4,61
AA – BB	258,47	20,35	16,57	9,38
AA – BC	694,79	53,19	42,23	27,84
AB – AC	46,83	0,88	14,41	2,09
AB – BB	168,74	14,48	8,45	6,86
AB – BC	605,06	47,32	34,11	25,32
AC – BB	121,91	15,36	5,96	4,77
AC – BC	558,23	48,20	19,70	23,23
BB – BC	436,32	32,84	25,66	18,46

P<0,001

P<0,01

P<0,05

P>0,05

n AA = 297

n AB = 572

n AC = 26

n BB = 266

n BC = 13

Trakovická, Strapáková a Ostertág (2002) zistili pri sledovaní genetického polymorfizmu β -LG a jeho vzťah k variabilite produkcie mlieka dojníc nasledujúce závery, že vo všetkých genotypových kombináciách bola najnižšia produkcia ukazovateľov (produkcia mlieka, laktózy, tuku a bielkovín) v 1. laktácii. Najvyššiu produkciu na 3. laktácii dosahovali dojnice s genotypom AA. Heterozygotné dojnice AB mali najvyššie produkčné ukazovatele na 4. laktácii. Ďalej zistili, že efekt poradia laktácie má vyššiu váhu ako efekt vlastného genotypu.

1.7 Molekulárno – genetické metódy detekcie polymorfizmu DNA

Molekulárno-genetické metódy využívané pre identifikáciu genetických markerov sú založené na úrovni polymorfizmu kódujúcich a nekódujúcich sekvencií v genóme.

Pomocou DNA markerov možno detekovať rozdiely v genetickej informácii medzi analyzovanými druhmi, populáciami, jedincami alebo bunkami (URL 6).

Sú využívané pre: - sledovanie určitých génov behom šľachtiteľských programov,

- genetické mapovanie,
- populačnú genetiku,
- testovanie otcovstva.

DNA markery sú aplikovateľné u všetkých organizmov, kde je zvládnutá technika izolácie DNA (URL 6).

Vďaka fyzikálnym vlastnostiam majú niekoľko výhod:

- DNA môžeme získať nielen zo živých, ale aj z mŕtvych tkanív,
- molekula DNA je natoľko stabilná, že môže byť zachovaná i po dobu niekoľko miliónov rokov,
- malé množstvá DNA, ktoré sú potrebné k analýzam (Cano et al., 1993).

Súčasná analýza polymorfizmu DNA sú založené na (URL 6):

1. Rôznych kombináciách reštrikčného štiepenia, hybridizácie a amplifikácie

I-PCR - Inverzná PCR (Inverse PCR)

In situ PCR

VNTRs – Variabilita v počte tandemových repetícií (Variable Number Tandem Repeats)

AFLP – Dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov (Amplified Fragment Length Polymorphism)

2. Amplifikácii špecifických fragmentov v in vitro podmienkach

PCR – Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction)

PCR-SPLAT – Amplifikácia špecifického polymorfného lokusu (Specific Polymorphic Locus Amplification Test)

PCR-STS – Amplifikácia jedného cieľového miesta (Single Tagged Site)

RT-PCR – Reverzná (spätná) polymerázová reakcia (Reverse Transcription PCR)

Real Time PCR

RAPD – Náhodne amplifikovaná polymorfická DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

3. Špecifickom reštrikčnom štiepení analyzovanej DNA

PCR-RFLP – Dĺžkový polymorfizmus reštrikčných fragmentov (Restriction Fragment Length Polymorphism).

1.7.1 *Techniky molekulárnych markerov založené na rôznych kombinácii reštrikčného štiepenia, hybridizácie a amplifikácie*

I-PCR

Tento postup je používaný pre amplifikáciu fragmentov DNA s neznámou sekvenciou, ktorá je ohraničená známymi sekvenciami. Metóda je založená na reštrikčnom štiepení známej sekvencie, ktoré umožnia tvorbu kohéznych koncov. Druhým krokom je vytvorenie cirkulárnej molekuly. Amplifikácia je zahájená protismerným pripojením primeru k známej sekvencii v cirkulárnej molekule. Týmto spôsobom je zaistená amplifikácia vnútorného úseku cirkulárnej molekuly (URL 6).

In situ PCR

Amplifikácia DNA prebieha priamo v bunkách alebo v cytologických preparátoch. Produkt amplifikácie je následne detekovaný hybridizáciou so špecifickou sondou alebo s využitím imunochemických metód. Na tomto princípe sú založené tzv. bio-chipy (URL 8).

AFLP

Metóda je založená na detekcii DNA reštrikčných fragmentov PCR amplifikáciou, ktorá prebieha pomocou ligácie adaptorových sekvencií na konci reštrikčného miesta, predstavujúce univerzálne miesto pre primery PCR (URL 7).

1.7.2 Techniky molekulárnych markerov založené na metóde PCR

RAPD

Metóda s názvom náhodne amplifikovaná polymorfická DNA, alebo náhodná PCR (AP-PCR) je jednoduchá technika pre fingerprinting DNA, ktorá je vhodná pre rýchlu porovnávaciu typizáciu DNA. Používajú sa v nej krátke obvykle 8 – 12 nukleotidové primery ľubovolnej sekvencie s neznámou homológiou k cieľovej sekvencii DNA a s málo prísnyimi podmienkami pre pripojenie primerov (Šmarda et al., 2005).

Real-time PCR

Predstavuje modernú metódu, umožňujúcu sledovanie priebehu PCR reakcie v reálnom čase na základe sledovania intenzity fluorescenčného signálu. Využíva sa pre kvantitatívnu PCR, pre stanovenie bodu topenia a pre priamu detekciu genotypu. Technika vyžaduje nákladné zariadenie (Ovesná et al., 2001)

PCR

Je v súčasnosti jednou z najpoužívanejších techník v molekulárnej biológii a v molekulárnej genetike. Využíva sa na amplifikáciu t. j. namnoženie špecifických úsekov DNA pomocou enzymatickej syntézy *in vitro* (Miluchová et al., 2009).

Túto veľmi citlivú, exaktnú a v princípe veľmi jednoduchú metódu vyvinul Kary Banks Mullis v laboratóriu H. A. Erlicha firmy Cetus Corp. (California, USA). Princíp metódy bol prvý raz publikovaný v práci Saiki et al. (1988), kde sa autori zaoberali amplifikáciou ľudského 5-globínového génu a prenatálnou diagnostikou kosáčikovitej anémie.

Zložky dôležité k priebehu reakcie PCR (Šmarda et al., 2005):

1. Termostabilná DNA-polymeráza (*Taq* polymeráza),
2. Reakčný tlmivý roztok ($MgCl_2$),
3. Voľné deoxyribonukleozidtrifosfáty (dATP, dGTP, dCTP, dTTP),
4. Primery (syntetické jednovláknové oligonukleotidy),
5. Templátová DNA.

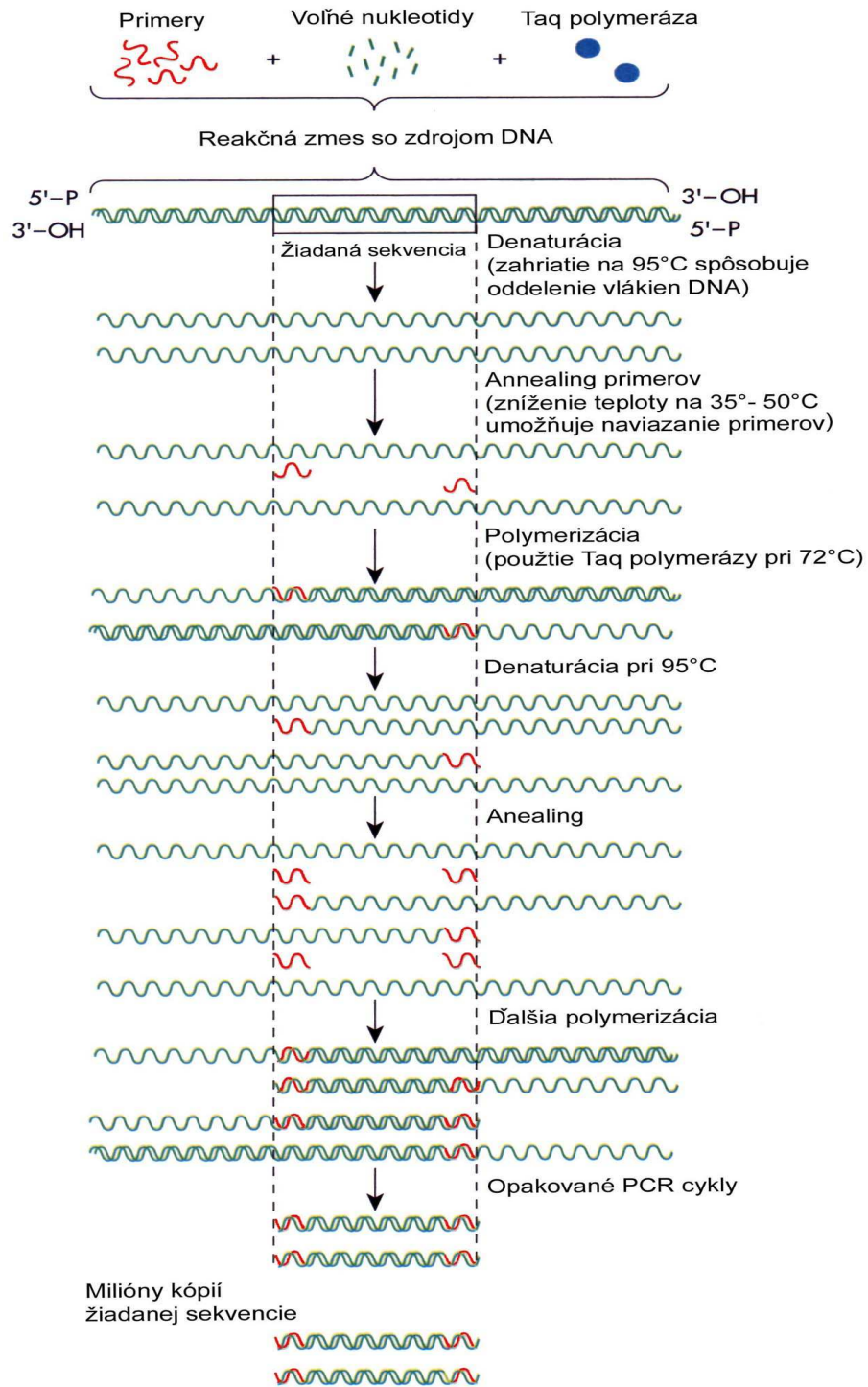
Priebeh reakcie:

Amplifikácia DNA v PCR je cyklický proces, v ktorom sa 20 – 40 krát opakujú tri kroky:

- 1.) Denaturácia: prvým krokom je tepelná denaturácia templátovej DNA zohriatím reakčnej zmesi na teplotu 95°C.
- 2.) Anelácia primerov na templátovú DNA: v druhom kroku sa zníži teplota na 40 – 60°C, čo umožní hybridizáciu dvoch oligonukleotidových primerov na komplementárne úseky na templátovej DNA. PCR primery sú navzájom vzdialené 100 – 5000 bp a orientované na protiľahlé DNA templátové vlákna.
- 3.) Polymerizácia: účinkom DNA polymerázy sa syntetizuje druhé vlákno DNA pripájaním nukleotidov (substrátom sú deoxynukleozidtrifosfáty, dNTP) na 3'OH koniec primerov, optimálna teplota reakcie je 72°C.
Tieto tri kroky sa cyklicky opakujú 20 až 40-krát a výsledkom je syntéza mnohých kópií fragmentu DNA ohraničeného použitými primermi.
- 4.) Záverečná polymerizácia - tento krok prebehne počas PCR reakcie len raz, a to na konci PCR programu. Slúži na "dobehtie" všetkých polymerizačných reakcií, ktoré ešte prebiehajú (Šmarda et al., 2005).

Obrázok 4

Amplifikácia DNA pomocou PCR (Bauerová et al., 2004)



Tabuľka 8

Využitie PCR vo výskume a praxi (Šmarda et al., 2005)

Základný výskum	<ul style="list-style-type: none">• Izolácia génov• Sekvenovanie DNA• Mutagenéza <i>in vitro</i>, modifikácia koncov DNA• Analýza klonov z génových knižníc• Príprava značených sond
Aplikovaný genetický výskum	<ul style="list-style-type: none">• Prenatálna diagnostika dedičných chorôb• Detekcia mutácií v génoch• Štúdium polymorfizmu génov• Populačná genetika
Klinické disciplíny	<ul style="list-style-type: none">• Detekcia patogénnych baktérii, vírusov, prvokov a húb• Typizácia patogénnych mikroorganizmov• Identifikácia onkogénov• Typizácia nádorov• Určenie pohlavia
Ostatné	<ul style="list-style-type: none">• Archeológia• Súdnictvo• Kriminalistika

1.7.3 Techniky molekulárnych markerov založené na reštrikčnom štiepení

PCR-RFLP

Metóda bola vyvinutá ako prvá na detekciu polymorfizmu na úrovni DNA. Na začiatku bola použitá predovšetkým pri mapovaní ľudského genómu, no neskôr sa začala používať aj pri mapovaní rastlinných a živočíšnych genómov (Meyer et al., 1995; Sun et al., 2003).

V oblasti analýzy genetických markerov hospodárskych zvierat sa využíva hlavne metóda PCR-RFLP, ktorá je kombináciou polymerázovej reťazovej reakcie a polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov. Metóda umožňuje detekciu mutácií v amplifikovanej DNA a využíva existenciu reštrikčných endonukleáz, ktoré štiepia polynukleotidový reťazec prerušením fosfodiesterových väzieb v určitých špecifických sekvenciách (Bauerová et al., 2004; Gábor, 2009).

Na rozdiel od klasickej RFLP sa vhodným reštrikčným enzýmom štiepi len relatívne krátky úsek DNA – PCR produkt. Keďže v dôsledku mutácie vzniká alebo zaniká štiepne miesto pre reštrikčnú endonukleázu, detekuje sa rôzny počet fragmentov alebo ich rôzna veľkosť. Získané fragmenty, ktorých veľkosť a počet závisí od prítomnosti, resp. neprítomnosti štiepneho miesta sa detekujú elektroforézou na polyakrylamidovom alebo agarózovom géle (sa posudzuje prítomnosť mutácie typickej pre danú alelu) a vizualizujú etídium bromidom pod UV svetlom (Bauerová et al., 2004; Miluchová et al., 2009).

V genetike hospodárskych zvierat sa PCR-RFLP využíva napríklad na:

- analýzu tzv. markerových génov kvality mäsa u ošípaných (RYR 1, RN, KIT, PIT 1, LEP); mlieka u hovädzieho dobytku (κ -kazeín, β -laktoglobulín) a reprodukčných vlastností (ESR, PRLR, RBP 4),
- identifikáciu geneticky podmienených ochorení (BLAD, DUMPS, citrulinémia) (Bauerová et al., 2004).

V tejto oblasti sa identifikujú a analyzujú špecifické gény alebo anonymné genetické markery hospodárskych zvierat predovšetkým ošípaných, hovädzieho dobytku a oviec:

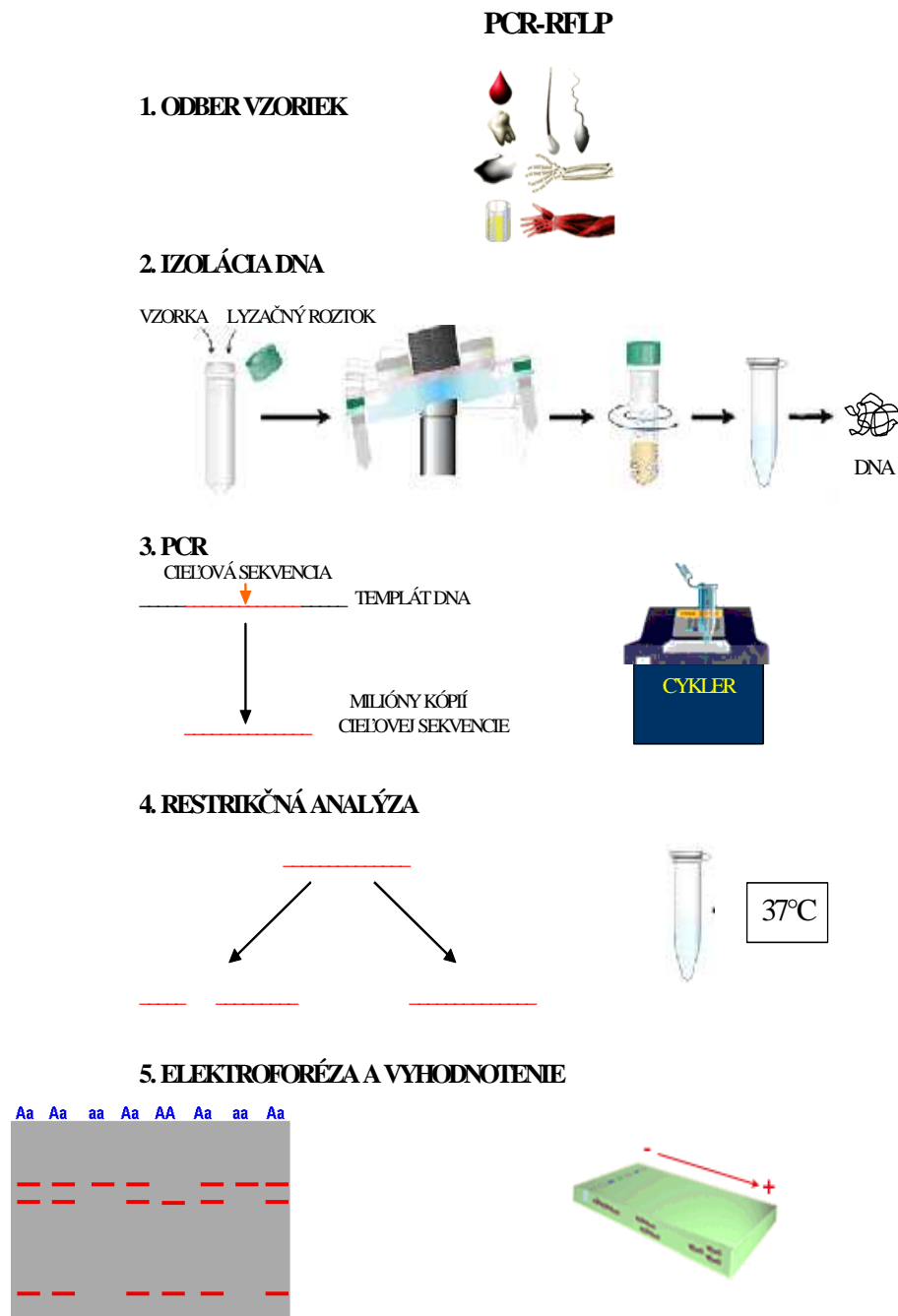
- produkčné vlastnosti (kvalita mäsa, mlieka, vlny),
- reprodukčné vlastnosti (počet narodených mláďat) (Bauerová et al., 2004).

Detekujú sa vírusové a bakteriálne ochorenia a predispozícia ku vzniku genetických chorôb. S pribúdajúcim počtom identifikovaných markerových génov sa

ukazujú nové efektívne metódy šľachtenia na základe markerovo-podporovanej selekcie (Bauerová et al., 2004).

Obrázok 5

Schéma postupu pri realizácii PCR-RFLP (Bauerová et al., 2004)



Výhody a využite PCR-RFLP techniky:

- využíva sa na analýzu geneticky podmienených chorôb v humánnej a veterinárnej medicíne,
- detekcia onkogénov,
- pri mapovaní génov,
- pri štúdiu asociačných vzťahov kandidátnych génov k ukazovateľom úžitkovosti,
- nenáročnosť,
- umožňuje odlíšenie homozygota od heterozygota,
- nie je potrebná znalosť sekvencie DNA študovaného genómu (Gábor, 2009; Verkaar et al., 2002).

Nevýhody PCR-RFLP techniky:

- vyžadujú veľké množstvo vysokokvalitnej čistej DNA,
- analýzy sú časovo i finančne náročné (Verkaar et al., 2002).

1.7.3.1 Reštrikčné endonukleázy

Sú enzýmy, ktoré rozpoznávajú špecifické nukleotidové sekvencie na dvojvláknovej DNA a štiepia jej oba vlákna v rozpoznávacej sekvencii alebo mimo nej. Tie predstavujú zväčša palindromatické sekvencie DNA s párnym počtom rozpoznávacích nukleotidov (4 – 8 bp). Palindróm je nukleotidová sekvencia, ktorá sa na komplementárnom vlákne opakuje v presne obrátenom poradí nukleotidov. Sú súčasťou tzv. reštrikčno – modifikačných systémov baktérií, kde plní dôležitú úlohu pri ochrane bakteriálnych buniek pri vstupe cudzorodej DNA do nich. Aby RE nezničili vlastnú bakteriálnu bunku, baktérie majú aj tzv. metylázy, teda enzýmy, ktoré rozpoznávajú tú istú sekvenciu ako RE a modifikujú ju metyláciou tak, že ju RE nerozoznávajú a neštiepia. Endonukleázy sa najviac využívajú v biologickom výskume (napr. pri metóde PCR-RFLP) (Rédei, 2008).

Reštrikčné endonukleázy sa rozdeľujú do troch skupín:

1. Trieda (Murray, 2000):

- vykazujú endonukleázovú aj metylázovú aktivitu,
- štiepia náhodne,

- rozoznávajú metylovanú sekvenciu nukleotidov, putujú od nej pozdĺž DNA na vzdialenosť 1 000 – 5 000 nukleotidov, kde štiepia,
- napr. EcoB s rozoznávacou sekvenciou TGA(N₈)TGCT, EcoK,
- môžu vzniknúť rôzne dlhé fragmenty s rôznymi koncami,
- vyžadujú ATP, horčík, S – adenozylnmetionín.

2. Trieda (Pingoud et al., 2001):

- vykazujú endonukleázovú, resp. metylázovú aktivitu,
- štiepia v rozpoznávacej špecifickej sekvencii, ktorá je rotačne symetrická, teda obsahuje palindromatické sekvencie,
- využívajú sa na získavanie fragmentov DNA, ale iba v prípade, ak gén nemá intróny,
- vyžadujú pre restriktázy iba horčíkové ióny a pre metylázy S – adenozylnmetionín.

Typ I.:

- štiepi vlákno DNA tak, že vznikajú prečnievajúce 1-vláknové lepivé úseky na 5' konci vzniknutých fragmentov,
- napr. EcoRI.

Typ II.:

- štiepi vlákno DNA tak, že vznikajú prečnievajúce 1-vláknové lepivé úseky na 3' konci vzniknutých fragmentov,
- napr. PstI., HhiI.

Typ III.:

- štiepia vlákno DNA tak, že vznikajú fragmenty so zarovnanými tupými koncami,
- napr. HaeIII., EcoRV.

3. Trieda (Meisel et al., 1992; Dryden et al. 2001):

- Je multifunkčný enzým zložený z 2 odlišných podjednotiek a vykazuje endonukleázovú aj metylázovú aktivitu,
- enzýmy štiepia 24 – 26 bp ku 3'- koncu od rozpoznávacieho miesta, pričom vznikajú presahujúce 1-vláknové konce nešpecifickej sekvencie,
- napr.: HgaI. rozpoznáva sekvenciu GACGC (N)₅ CTGCG (N)₁₀.

1.8 Analýza PCR produktov

Elektroforetické metódy

Je jedna z najdôležitejších techník, ktoré slúžia na separáciu nukleových kyselín alebo samotných špecifických fragmentov, ktoré vznikajú v priebehu jednotlivých metód (napr. PCR-RFLP, PCR-SSCP, PCR-DGGE a iné). Podstata ELFO spočíva vo využití jednosmerného elektrického prúdu a záporného náboja nukleových kyselín. Na základe tejto vlastnosti putuje DNA vždy od zápornej anódy ku kladnej katóde. Zariadenie potrebné pre elektroforetickú separáciu DNA a RNA rozdelíme na dva typy:

1. Horizontálne elektroforézy: ako nosné médium sa využíva agaróza pri analýzach DNA (PCR-RFLP),
2. Vertikálne elektroforézy: ako nosné médium sa využíva polyakrylamidový gél pri analýzach DNA (SSCP, DGGE, TGGE) a proteínov (PAGE-SDS) (Miluchová et al., 2009).

1.8.1 Agarózová elektroforéza

Produkty restričných (PCR-RFLP) reakcií sa delia podľa svojej relatívnej molekulovej hmotnosti a veľkosti náboja agarózovou elektroforézou v géli. Najčastejšie sa používa ako elektroforetické médium – agaróza (polysacharid získavaný z morských rias) s koncentráciou 0,8 – 3,5 %. Jej koncentrácia sa delí podľa veľkosti fragmentov, ktoré budú separované (Sambrook et al., 1989).

ELFO v agarózovom géle patrí medzi jednoduché, pomerne rýchle metódy na izoláciu, identifikáciu a prečistenie fragmentov DNA. Medzi jej výhody patrí priama detekcia fragmentov DNA v UV svetle, pomocou farbenia s fluorescenčným interkalačným činidlom (etídium bromidom). Rýchlosť pohybu fragmentov DNA v agarózovom géle závisí od:

- molekulovej hmotnosti DNA,
- konformácie DNA,
- koncentrácie agarózového gélu,
- veľkosti použitého napätia,
- zloženia elektrolytických roztokov,

- teploty delenia (Vígaský et al., 2000).

Tabuľka 9

Závislosť delenia fragmentov DNA od koncentrácie agarózového gélu (Vígaský et al., 2000)

Obsah agarózy (%)	Rozsah delenia DNA (kb)
0,3	60 – 5
0,6	20 – 1
0,7	10 – 0,8
0,9	7 – 0,5
0,2	3 – 0,1

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo:

- izolovať genómovú DNA z krvi hovädzieho dobytká,
- s využitím PCR – RFLP metódy identifikovať polymorfne varianty β -laktoglobulínu hovädzieho dobytká,
- vyhodnotiť frekvencie alel a genotypovú štruktúru populácie hovädzieho dobytká pre β -laktoglobulín.

3 METODIKA PRÁCE A METÓDY SKÚMANIA

3.1 Materiál

Pre štúdium polymorfizmu vybraného kandidátskeho génu β -LG bol použitý biologický materiál získaný od hovädzieho dobytku v celkovom počte 39 matiek býkov slovenského pinzgauského plemena.

Zvieratám bola odoberaná krv veterinárnym lekárom z krčnej žily *vena jugularis* do skúmavky s antikoagulačným roztokom ACD:

- a) 0,48 % kyselina citrónová,
- b) 1,32 % citrát sodný,
- c) 1,47 % glukóza v pomere 1:6 (ACD : krv).

Vzorky boli až do zahájenia analýz zmrazené.

3.2 Prístrojové vybavenie

Pri izolácií DNA a PCR metódach sme použili nasledovné prístroje:

- analytické váhy: CHYO BALANCE CORP. JAPAN, MP-300,
- centrifúga: HERMLE, Z 233 MK-2,
- elektroforéza: SCIE-PLAS MINI-PLUS HU 10, OWL P10DS,
- zdroj napätia: CONSORT, EV 243,
- pipety: NICHIRIO,
- termostat: BINDER, 0010-0081, BD 53,
- UV transiluminátor: UVP – M 15,
- spektrofotometer: BOECO, S-30,
- vortex: IKA WORKS, INC, MS1,
- termocykler: BIORAD, MJ MINI,
- fotodokumentačná jednotka: OLYMPUS 7070.

3.3 Použité metódy

3.3.1 Izolácia genómovej DNA z krvi fenol-chloroformovou metódou

Izoláciu DNA z krvi sme uskutočnili metódou proteolytickej hydrolýzy proteinázou K, fenol-chloroformovej deproteinizácie a etanolovej precipitácie DNA podľa Sambrooka et al. (1989).

Postup izolácie DNA závisí od organizmu, z ktorého pri izolácii vychádzame. Cieľom izolácie je získať DNA s čo možno najväčšou relatívnou molekulovou hmotnosťou bez RNA, proteínov a polysacharidov.

Postup pri izolácii genómovej DNA:

1. DNA sme izolovali z lymfocytov periférnej krvi odobratej do roztoku ACD.
2. Bunky z 500 μl krvi boli lyzované pridaním rovnakého množstva lyzačného roztoku:

- sacharóza	320 mM,
- Tris-HCl pH 7,5	10 mM,
- MgCl_2	5 mM,
- Triton X-100	1 %.
3. Zmes krvi a lyzačného roztoku sme 5 min. pretrepávali a centrifugovali,
4. Po centrifugácii pri 10 000 x g po dobu 2. min. sme získaný sediment suspendovali v 500 μl lyzačného roztoku a lýzu buniek sme opakovali podľa potreby 2 – 5 krát,
5. Sediment po pridaní 200 μl TE roztoku (10 mM; Tris-HCl; pH 7,5; 1 mM EDTA) sme centrifugovali 5 min. pri 10 000 x g,
6. Ďalej sme pridali 20 μl 10 % SDS a proteinázu K s výslednou koncentráciou 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$,
7. Následne túto zmes sme resuspendovali, a potom ju cez noc inkubovali vo vodnom kúpeli pri teplote 60°C,
8. Po extrakcii zmesou fenol-chloroform-izoamylalkohol (25:24:1) a pridaní octanu sodného sme DNA zrážali 96 % etanolom pri -20°C,
9. Zrazeninu DNA sme premývali 70 % etanolom, vysušili a rozpustili v 50 μl roztoku TE.

3.3.2 Meranie kvantitatívneho vyjadrenia nukleových kyselín na spektrofotometri

Pri spektrofotometrickej metóde meriame absorbanciu vzorky nukleových kyselín pri vlnovej dĺžke 260 nm a 280 nm. Hodnoty A namerané pri 260 nm umožňujú stanoviť koncentráciu nukleových kyselín nasledovne:

A_{260} odpovedá 50 $\mu\text{g/ml}$ pre dvojvláknovú DNA,
40 $\mu\text{g/ml}$ pre jednovláknovú DNA,
20 $\mu\text{g/ml}$ pre oligonukleotidy.

Keďže prítomnosť RNA, proteínov a detergentov ovplyvňuje priebeh absorpčného spektra, môže byť spektrofotometricky vyhodnocovaná i čistota vzorky.

Kontrola čistoty nukleovej kyseliny

Extrakcia nukleových kyselín z buniek je doprevádzaná proteínmi a požaduje sa, aby sa rozsiahlou purifikáciou odstránila proteínová zložka. Vzhľadom na to, že najbežnejšie znečisťujúcimi látkami bývajú proteíny, ktoré majú absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke 280 nm, používa sa tento pomer A_{260}/A_{280} ako kritérium čistoty. Čisté DNA a RNA preparáty majú predpokladané pomery $\geq 1,8$ pre DNA a $\geq 2,0$ pre RNA (môžeme hovoriť o čistých preparátoch nukleových kyselín), odchýlky z týchto pomerov signalizujú prítomnosť nečistoty vo vzorke.

Kvantitatívne vyjadrenie nukleovej kyseliny (NAQ)

$$1 \mu\text{g/ml} = 1 \text{ ng}/\mu\text{l} = 0,001 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$\text{pmol}/\mu\text{l} = \frac{\mu\text{g/ml} \times 1000}{\text{MW oligo}}$$

$$\text{pmol fosforu} = \frac{\text{nukleotidová koncentrácia, } \mu\text{g/ml}}{315}$$

3.3.3 PCR - RFLP génu β -LG

Na amplifikáciu špecifického úseku génu β -LG boli použité nasledovné oligonukleotidové primery: FOR a REV podľa Medrano, Aguilar-Cordova (1990).

β -LG FOR 25-mer

5' - TGT GCT GGA CAC CGA CTA CAA AAA G - 3'

β -LG REV 24-mer

5' - GCT CCC GGT ATA TGA CCA CCC TCT - 3'

Tabuľka 10

Zloženie reakčnej zmesi s objemom 25 μ l

Komponent	Konečná koncentrácia
1. Sterilná voda	-----
2. Templát DNA	50 ng
3. dNTP Mix, 10 mM (INVITROGEN)	2 mM
4. MgCl ₂ , 25 mM (FERMENTAS)	1,5 mM
5. Primery β -LG, 10 pM. μ l ⁻¹ (KRD)	0,5 pM
6. 10 x Reaction buffer (FERMENTAS)	1x
7. <i>Taq</i> DNA polymeráza 5U. μ l ⁻¹ (FERMENTAS)	1 U

Tabuľka 11
Teplotný a časový režim PCR reakcie.

Kroky	Cyklus	Počet cyklov	Teplota	Čas (v min.)
1.	Štart	-	94°C	2
2.	Denaturácia	35	94°C	1
3.	Anelácia		55°C	1
4.	Polymerizácia		72°C	1
5.	Elongácia	-	72°C	8
6.	Schladenie	-	4°C	uskladnenie

V našej práci bol použitý reštrikčný enzým *HaeIII* pre PCR-RFLP analýzu, ktorý štiepil získané PCR produkty so známou sekvenciou.

Tabuľka 12
Zloženie štiepiacej zmesi RFLP s objemom 30 µl

Komponent	Množstvo na 1 vzorku	Výsledná koncentrácia
Sterilná voda (MiliQ)	16,2 µl	-----
PCR produkt	10 µl	-----
10X NEBuffer 4	3,0 µl	1 x
ENZÝM <i>HaeIII</i> 10 U.µl ⁻¹ (Fermentas)	0,5 µl	5 U
100X BSA	0,3 µl	1 x

Tabuľka 13
Priebeh štiepenia reštrikčným enzýmom

Názov enzýmu	<i>HaeIII</i>
Teplota štiepenia	37°C
RE miesto	GG/CC
Doba inkubácie	3 hodiny

3.3.4 Matematicko-štatistické vyhodnotenie genetickej štruktúry populácie

Na základe PCR analýz (PCR-RFLP) sme stanovili genotypovú štruktúru sledovanej populácie slovenského pinzgauského plemena; vypočítali sme frekvencie alel v jednotlivých polymorfných génoch sledovanej populácie hovädzieho dobytká. Významnosť rozdielov medzi experimentálne pozorovanou a teoreticky očakávanou frekvenciou genotypov sme overili χ^2 -testom.

Frekvencie alel podľa Hardy-Weinbergovho zákona:

$$p_A = \frac{2AA + AB}{2N} \qquad q_B = \frac{2BB + AB}{2N}$$

- P_A, q_B - frekvencia génu
- AA, AB, BB - počet genotypov príslušného polymorfného systému
- N - počet testovaných zvierat

Frekvencia genotypov podľa Hardy-Weinbergovho zákona:

$$(p_A + q_B)^2 = p_A^2 + 2p_Aq_B + q_B^2 = 1$$

Fenotypová rovnováha bola overená podľa χ^2 - testom:

$$AA:AB:BB = (p_A)^2:2p_Aq_B:(q_B)^2$$

$$\chi^2_{(n-1)} = \sum \frac{(e-t)^2}{t}$$

kde: e - pozorovaný počet genotypov
 t - teoretický počet genotypov
 n - počet genotypových tried

Vypočítaná hodnota χ^2 -testu bola na základe stupňov voľnosti porovnávaná s tabuľkovou hodnotou podľa Fishera a následne určená pravdepodobnosť zhody alebo rozdielov medzi experimentálnymi a teoretickými hodnotami.

$p > 0,05$ – štatisticky nepreukazné

$p < 0,05$ – štatisticky preukazné

$p < 0,001$ – štatisticky vysoko preukazné

4 VÝSLEDKY PRÁCE

4.1 Izolácia genómovej DNA

Genómová DNA bola izolovaná metódou proteolytickej hydrolýzy proteínázou K, fenol-chloroformovej deproteinizácie a etanolovej precipitácie DNA.

Koncentrácia a čistota izolovanej DNA bola meraná spektrofotometricky na prístroji S-30 (Boeco). Extrakcia DNA bola doprevádzaná určitým množstvom proteínov, ktorý určoval čistotu DNA. Pri tejto metóde pomeru absorbancie vlnových dĺžok 260/280 poskytuje informácie o čistote preparátov nukleových kyselín, ktorý intervalom $\geq 1,8$ vyjadruje čistotu DNA. Odchýlky z týchto pomerov mohli signalizovať prítomnosť nečistôt a znižovať uvedené pomerné hodnoty vo vzorke, ktoré by negatívne vplývali na presnosť spektrofotometrického stanovenia koncentrácie DNA. Preto boli niektoré vzorky opätovne purifikované, alebo nanovo izolované.

Meranie koncentrácie DNA na spektrofotometri

Extrakcia DNA z buniek bola doprevádzaná prítomnosťou proteínov, čo si vyžadovalo, aby sa separovala rozsiahlou purifikáciou proteínová nečistota.

Tabuľka 14

Reprezentatívna vzorka kontroly čistoty DNA u 10 kráv (12 – 21)

Číslo	Koncentrácia	260/280 ratio	λ 260 nm	λ 280 nm
1.	56,40	1,37	0,064	0,047
2.	35,80	1,23	0,043	0,035
3.	32,14	1,44	0,036	0,025
4.	25,96	1,36	0,030	0,022
5.	70,59	1,59	0,081	0,051
6.	16,84	1,29	0,015	0,020
7.	19,63	1,07	0,030	0,028
8.	30,49	1,05	0,039	0,037
9.	26,49	1,65	0,028	0,017
10.	24,10	1,03	0,032	0,031

Poznámka: Faktor zriedenia (f): 20

4.2 PCR - RFLP génu β -LG

Pre identifikáciu mutácií v géne β -LG bola použitá metóda PCR-RFLP. Táto varianta PCR umožňuje odlíšenie homozygota od heterozygota.

Pre rozlíšenie dĺžky fragmentov bol použitý molekulárny marker DNA Ladder (Fermentas) o veľkosti 100 bp.

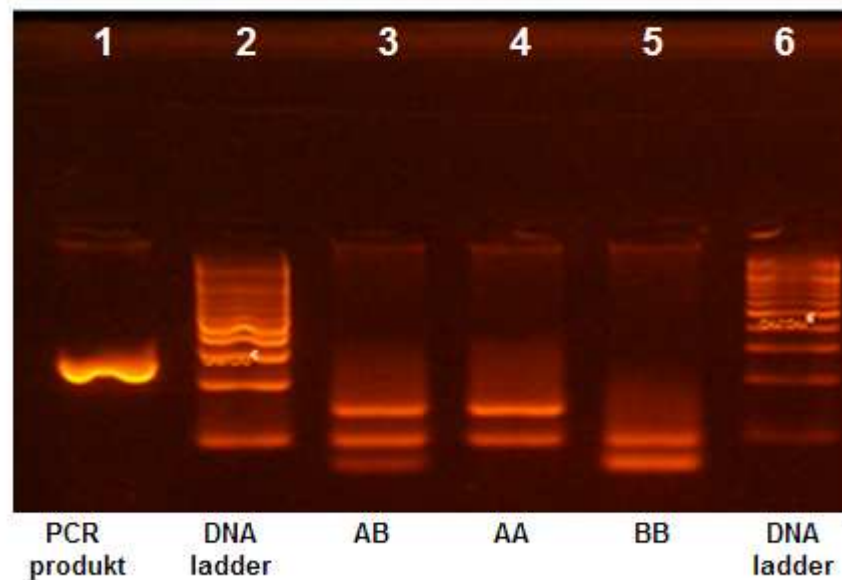
Amplifikované PCR produkty o veľkosti 247 bp boli štiepené enzýmom *HaeIII* a vizualizované v 3 % agarózovom géle.

V populácii hovädzieho dobytku v celkovom počte 39 zvierat boli zistené všetky tri genotypy, a to:

- genotyp AA (148 bp, 99 bp) 3 zvieratá,
- genotyp AB (148 bp, 99 bp, 74 bp) 10 zvierat,
- genotyp BB (99bp, 74 bp) 26 zvierat.

Obrázok 6

Reprezentatívne výsledky PCR-RFLP analýzy β -LG štiepené enzýmom *HaeIII* na 3% agarózovom géli

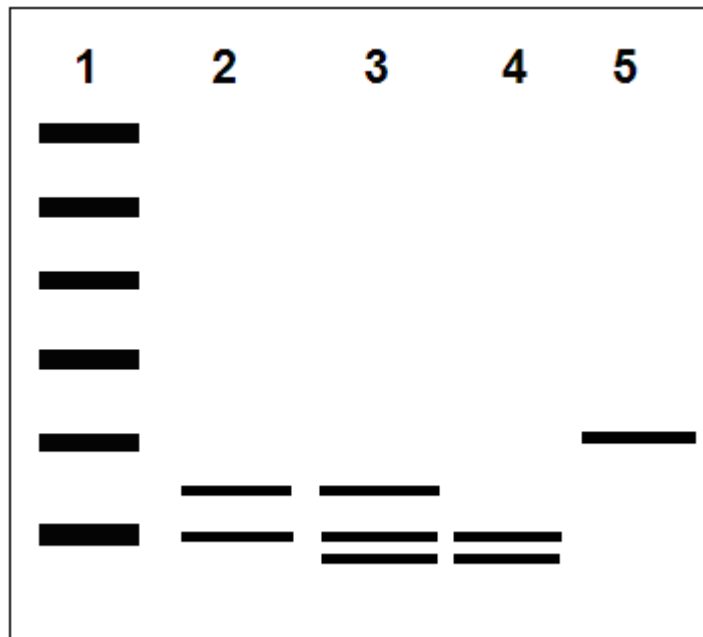


- Dráha 1. PCR produkt (247 bp),
2. marker 100 bp DNA Step Ladder (Fermentas),
 3. genotyp AB (148 bp, 99 bp, 74 bp),
 4. genotyp AA (148 bp, 99 bp),
 5. genotyp BB (99 bp, 74 bp),
 6. marker 100 bp DNA Step Ladder (Fermentas).

Obrázok 7

Schematické znázornenie štiepneho produktu β -LG:

1. *DNA ladder* – 100 bp;
2. *genotyp AA* – 148 bp, 99 bp;
3. *genotyp AB* – 148 bp, 99 bp, 74 bp;
4. *genotyp BB* – 99 bp, 74 bp;
5. *PCR produkt* – 247 bp.



Na základe výsledkov PCR-RFLP analýzy sme vypočítali genetickú štruktúru a χ^2 -testom overili rovnováhu sledovanej populácie.

Tabuľka 15
Genotypové a alelové frekvencie β -laktoglobulínového génu

FREKVENCIE	GENOTYPY (n=39)			ALELY		χ^2 d.f. = 2
	AA	AB	BB	A	B	
ABSOLÚTNE	<i>pozorované</i>			16	62	0,20
	3	10	26			
	<i>teoretické</i>					
	1,6419	12,7179	24,6402			
RELATÍVNE	<i>pozorované</i>			0,2051	0,7949	
	0,0769	0,2564	0,6667			
	<i>teoretické</i>					
	0,0421	0,3261	0,6318			

$p > 0,05$

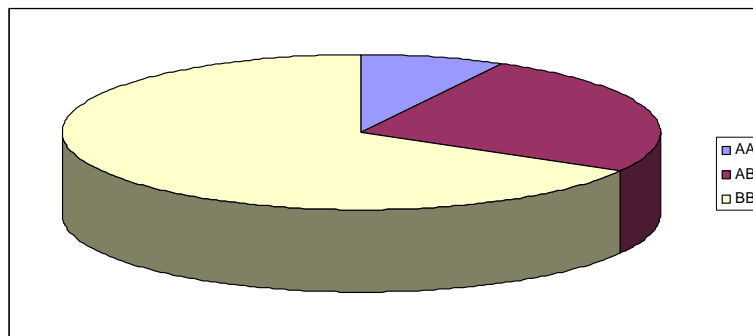
Ako vidieť z tabuľky 15 v populácii sa vyskytoval genotyp BB s frekvenciou 66,67 %, frekvencia genotypu AB bola 25,64 % a najmenej zastúpený bol genotyp AA s frekvenciou 7,69 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely B bola veľmi vysoká a je v populácii zastúpená 79,49 %. Frekvencia alely A bola 20,51 %.

Na základe χ^2 - testu sme zistili, že rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov hovädzieho dobytku bol štatisticky nepreukazný, čo znamená, že sa v sledovanej populácii zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

5 DISKUSIA

V našej práci uvádzame u slovenského pinzgauského dobytka najvyšší výskyt alely B β -LG 79,49 % a najnižší výskyt u alely A 20,51 %. Ďalej u tohto plemena boli zistené nasledovné frekvencie genotypov β -LG: AA 7,69 %; AB 25,64 % a BB 66,67 %.

Graf 1
Percentuálne zastúpenie genotypov β -LG



V analyzovanej populácii hovädzieho dobytka boli detekované pre β -LG gén tieto genotypy:

- homozygotný genotyp AA (148 bp, 99 bp),
- heterozygotný genotyp AB (148 bp, 99 bp, 74 bp),
- homozygotný genotyp BB (99 bp, 74 bp).

V sledovanej populácii hovädzieho dobytka bol β -LG gén najpočetnejšie zastúpený genotypom BB s frekvenciou výskytu 0,6667. Frekvencia genotypu AB bola 0,2564 a najmenej zastúpeným genotypom bol genotyp AA s frekvenciou 0,0769.

Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely B je vysoká, v populácii je zastúpená 0,7949 a frekvencia alely A je 0,2051.

Naše údaje pre β -LG súhlasia s údajmi viacerých autorov: sú takmer v súlade s výsledkami Uhrína et al. (1994), ktorí v populácii hovädzieho dobytka detekovali prevahu alely B nad alelou A. Ďalej sú výsledky takmer zodpovedajúce s údajmi Chreneka (1997), ktorý uvádza u pinzgauského dobytka frekvenciu výskytu alely B 0,78. Podobne aj Beja-Pereira et al. (2003) uvádzajú v populácii pinzgauského dobytka vyššiu frekvenciu alely B (0,833). Bláhová et al. (2004) detekovali u náhodne vybranej skupiny kráv vysokú frekvenciu alely B (0,74) a taktiež aj Bulla et al. (2007) zistili prevahu alely B (0,73).

Najfrekventovanejší genotyp AB (88 %) u slovenského strakatého plemena identifikovali Chobotová et al. (1998), a naopak vôbec neidentifikovali variant BB u slovenského pinzgauského plemena. U tohto plemena identifikovali homozygotnú formu AA (96 %).

Žitný et al. (1995) v polymorfnom systéme β -LG detekovali dve alely β -LG^A a β -LG^B a zaznamenali posun na stranu alely A (0,52). V jednej vzorke mlieka kravy plemena slovenského strakatého objavili frakciu BC, ktorá doteraz pri tomto plemene nebola zaznamenaná. U slovenského strakatého dobytky stanovili tri genotypy β -laktoglobulínu AA, AB a BB s najväčšou prevahou heterozygotnej formy AB (60,2 %) a najnižšou homozygotnou BB (17,9 %).

Polymorfizmus β -laktoglobulínu je geneticky riadený kodominantnými alelami, z ktorých sa najčastejšie vyskytujú A a B.

Chrenek (1997) sledoval tri plemená hovädzieho dobytky na Slovensku. U všetkých stanovili vyššiu frekvenciu alely β -LG^B, a to nasledovne: u pinzgauského dobytky bola frekvencia alely B najvyššia (0,78) a najnižšia u slovenského strakatého dobytky (0,52). Z hľadiska genotypov bol genotyp AB najviac zastúpený u holštajnskeho a strakatého plemena a u pinzgauského plemena bola najvyššia frekvencia genotypu BB. V tom istom roku sledovali importované plemená hovädzieho dobytky na Slovensko, u ktorých stanovili alely A a B β -LG systému s prevahou alely B. U rakúskeho pinzgauského dobytky bola frekvencia alely B (0,78) najvyššia, a naopak u plemena montbeliard B (0,59) najnižšia.

Tabuľka 16
Frekvencie alel u analyzovaných zvierat (Chrenek, 1997)

Plemeno	Genotyp			Frekvencia alel	
	AA	AB	BB	A	B
Slovenské strakaté	22,3%	50,5%	27,13%	0,47	0,52
Holštajnské	14,7%	44,1%	41,1%	0,37	0,63

Frekvencia B alely β -LG u slovenského strakatého plemena podľa Chreneka (1997) bola 0,52, čo je takmer v zhode s frekvenciou 0,52 zistenou Trakovickou a Kúbekom (1996).

Viacerí autori potvrdzujú, že u plemien Simentálskeho pôvodu (České strakaté, Maďarské strakaté) ako aj u samotného plemena Simentál sa frekvencia alely B β -LG pohybovala od 0,49 po 0,57 (Hanuš, Beber, 1995; Barany et al., 1992).

Uhrín et al. (1995) vo svojej práci uvádzajú u slovenského strakatého dobytká výskyt alely B β -LG 62 %. U rovnakého plemena Žitný et al. (1995) uvádza frekvenciu genotypov β -LG nasledovne: AB 60,2; % AA 21,9 % a BB 17,9 %. K podobným výsledkom dospel aj Foltys (1997), ktorý uvádza v populácii slovenského strakatého plemena najvyššiu frekvenciu β -LG genotypu AB 88 %, nižšiu AA 9 % a najnižšiu BB 3 %.

U holštajnsko-frízskeho dobytká Chrenek (1997) zistil výskyt alely B β -LG 0,63, čo je zrovnateľné s výsledkami Trakovickej a Kúbeka (1996) podľa ktorých výskyt alely B β -LG bol 0,71. Taktiež podľa výsledkov Gajdúška (1997) bola u holštajnsko-frízskeho plemena vyššia frekvencia alely B β -LG (0,63) ako alely A β -LG (0,37). Podobne ako citovaní autori, aj Mašková a Čítek (1997) uvádzajú u holštajnsko-frízskeho plemena vyššiu frekvenciu B alely β -LG (0,61) ako A alely β -LG (0,39).

Neubanuerová et al. (2000) zistili na lokuse β -LG miernu prevahu alely A (0,5087).

Čítek et al. (2000) na lokuse pre β -LG určili nižšiu frekvenciu alely A oproti alele B u českého strakatého plemena, a to 0,472; u čiernostrakatého dobytká 0,405 a u nemeckého čiernostrakatého dobytká 0,303. V literatúre sú uvedené väčšie rozdiely, frekvencia alely B u niektorých plemien dosahuje až 0,9. Ďalej zistili na β -LG lokuse u českej červienky frekvenciu alely A (0,441) a B (0,559). U krížencov F1 generácie bola frekvencia alely A (0,417) a u nemeckej červienky A (0,321). U poľskej červienky bola frekvencia alely A (0,192) výrazne nižšia ako u analyzovaných populácií červeného dobytká.

Genotyp AA β -LG je asociovaný s vysokým mliečnym výťažkom, má pozitívny vplyv na obsah bielkovín v mlieku a významne zlepšuje pomer proteínov k tuku (Panicke et al., 1997). Alela A β -LG spolu s alelami A2 CSN2 génu a B CSN3 génu aditívne zvyšujú pomer proteínov k tuku. Genotyp BB je asociovaný s vysokým obsahom tuku a kazeínov potrebných pre výrobu syrov (Mao et al., 1992).

ZÁVER

Z našej práce vyplýva, že mlieko patrí medzi významnú zložku ľudskej stravy. Je výborným zdrojom základných výživových látok, ako napríklad: bielkoviny, laktóza, vitamíny a minerálnych látok.

Kvalita mlieka zahŕňa nielen chemické zloženie, ale aj technologické a senzorické vlastnosti mlieka. Táto kvalita môže byť ovplyvnená genetickými a negenetickými faktormi.

Genetické varianty β -laktoglobulínu hovädzieho dobytká sú späté s produkciou mlieka a majú vplyv na jeho zloženie, spracovateľské vlastnosti, vrátane výťažnosti syreniny.

Práca bola zameraná na identifikáciu polymorfizmu β -laktoglobulinového génu v populácii slovenského pinzgauského dobytká pomocou metódy PCR-RFLP.

V analyzovanej populácii boli pre β -LG gén zistené všetky tri genotypy, a to: genotyp AA 3 zvieratá, genotyp AB 10 zvierat a genotyp BB 26 zvierat.

Najfrekvencovanejšie genetické varianty β -laktoglobulínu sú genotypy: AA a BB. V našej práci bol uvedený u slovenského pinzgauského dobytká najvyšší výskyt alely B β -LG 79,49 % a najnižší výskyt u alely A 20,51 %. Ďalej u tohto plemena boli zistené nasledovné frekvencie genotypov β -LG: AA 7,69 %; AB 25,64 % a BB 66,67 %.

V sledovanej populácii hovädzieho dobytká bol β -LG gén najpočetnejšie zastúpený genotypom BB s frekvenciou výskytu 0,6667. Frekvencia genotypu AB bola 0,2564 a najmenej zastúpeným genotypom bol genotyp AA s frekvenciou 0,0769.

Genotyp AA β -LG je asociovaný s vysokým mliečnym výťažkom a genotyp BB je asociovaný s vysokým obsahom tuku a kazeínov potrebných pre výrobu syrov.

Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely B je vysoká, v populácii je zastúpená 0,7949 a frekvencia alely A je 0,2051.

Zo získaných výsledkov je možné využiť poznatky:

- v teoretickej oblasti poznania genetického polymorfizmu bielkovín mlieka, hlavne β -laktoglobulínu,
- zvýšiť efektívnosť selekcie k dosahovaniu podobnej úrovne genetického zisku ako v iných krajinách (zvýšenie presnosti a intenzity selekcie, využitie v biotechnológiách a metód molekulárnej biológie...),
- zvýšiť podiel selekcie na kvalitatívne znaky (obsah a pomer hlavných zložiek mlieka).

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ASCHAFFENBURG, R. – DREWRY, J. 1957. Occurrence of different beta-lactoglobulins in cow's milk. *Nature*. 1957 Jul 30;176(4474), p. 216 – 218.
2. BAUEROVÁ, M. – TURČÁNI, M. – OMELKA, R. 2004. Polymerázová reťazová reakcia. UKF Nitra, 2004.
3. BEJA-PEREIRA, A. – LUIKART, G. – ENGLAND, P. R. – BRADLEY, D. G. – JANN, O. C. – BERTOLLE, G. – CHAMBERLAIN, A. T. – NUNES, T. P. – METODIEV, S. – FERRAND, N. – ERHARDT, G. 2003. Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. In: *Nature Genet.*, vol. 35, 2003 no. 4, p. 312.
4. BERG, G. van den – ESHER, J. I. M. – KONING, P. J. – BOVENHUIS, H. 1992. Genetic polymorphism of κ -casein and β -lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. In: *Neth. Milk Dairy Journal*, vol. 46, 1992, p. 153 – 178.
5. BLAHOVÁ, B. – ŘEHOUT, V. – KÚBEK, A. – ČÍTEK, J. – PŮBALOVÁ, M. 2004. Genetic variation of milk proteins in cattle maintained as gene reserve. In: *Amin. Sci. Pap. Rep.*, vol 22, 2004, p. 7 – 10.
6. BOTTO, V. – KONÍČEK, R. – PAŠEK, V. 1984. Chov hovädzieho dobytka. 2. vydanie. Bratislava: *Príroda*, 1984, s. 97 – 102. ISBN 064-037-88
7. BOVENHUIS, H. – VAN ARENDONK JAM. – KORVER, S. 1992. Associations between milk protein polymorphism and milk production traits. In *Journal of Dairy Science*, vol. 72, 1992, p. 2549 – 2559.
8. BRIGNON, G. – RIBADEAU-DUMAS, B. – MERCIER, J. C. – PÉLISSIER, J. P. – DAS, B. C. 1977. Complete aminoacid sequence of bovine α 2 casein. In: *Febs Lett.*, vol. 76, 1977, p. 275.

9. BROMLEY, E. H. C. – KREBS, M. R. H. – DONALD, A. M. 2005. Aggregation across the length scales in beta-lactoglobulin. In *Faraday Discussions*, vol. 128, 2005, p. 13 – 27.
10. BULLA, J. 1994. Využitie molekulárno – genetických metód v kontrole dedičnosti a určovaní paternity HD. In *Praktická škola chovateľa HZ*. Nitra: VŠP, 1994, s. 27-30.
11. BULLA, J. – CHRENEK, P. – MICHALCOVÁ, A. – KRUPOVÁ, Z. – SZAREK, J. – BULLA, R. – LADYKOVÁ, M. – ADAMCZYK, K. 2007. Influence of kappa-casein and beta-lactoglobulin genes on milk yield, milk composition and technological properties of the different cattle breeds. In *Biotech.* 2007, vol. 54, 2007, p. 60.
12. BURDOVÁ, O – LAUKOVÁ, A – BARANOVÁ, M. 2004. Vplyv zdravotného stavu dojníc na hygienickú kvalitu mlieka. In *Mliekarstvo*, vol. 30, 2004, č. 8, s. 35 – 48.
13. CANO, R. J. – POINAR, H. N. – PIENIAZEK, N. J. – ACRA, A. – POINAR JR., G. O. 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120 – 135 million year old weevil. In: *Nature* 363, p. 536 – 538.
14. CREAMER, L. – PARRY, D. – MALCOLM, G. 1983. Secondary structure of β -lactoglobulin. In *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 227, 1983, p. 98 – 105.
15. ČANIGOVÁ, M. – MICHALCOVÁ, A – MATULOVÁ, K. – BENCZOVÁ, E. 1997. Príspevok k poznatkom o technologickej kvalite mlieka vyšľachteného slovenského strakatého dobytku. In *Aktuální problémy šlechtění, zdraví, růstu a produkce skotu*. Zbor. téz prednášok. České Budejovice: SPP, 1997, s. 52 – 55.
16. ČÍTEK, J. – NEUBANUEROVÁ, V. – ŘEHOUT, V. 2000. Polymorfizmus vybraných lotusů u populace skotu v ČR. In: *Acta fytotechnica et zootechnica*, roč. 3, 2000, s. 21 – 24. ISBN 80-7137-748-1.
17. ČUBOŇ, J – HAŠČÍK, P – MICHALCOVÁ, A. 2007. *Hodnotenie surovín a potravín živočíšneho pôvodu*. Nitra: SPU, 2007, s. 128 – 134. ISBN 978-80-8069-891-1.

18. DALGLEISH, D. G. 1995. Technical properties of milk protein variants. In *Bulletin IDF304*, 1995, s. 10.
19. DRYDEN, D. T – MURRAY, N. E. – RAO, D. N. 2001. Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes". *Nucleic Acids Research*. 29 (18), 2001, p. 3728 – 3741.
20. ETTELEROVÁ, K. 2007. Informace vědeckého výboru pro potraviny ve věci: Alergie na kravské mléko. Vědecký výbor pro potraviny, 2007. Dostupné na: http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/Info_2006_15_deklas_alergie%20mleko.pdf (on-line, 12.2.2011)
21. FERRETTI, L. – LEONE, P. – SGARAMELLA, U. 1990. Long range restriction analysis of the bovine casein gene. In *Nuc. Acids Res.*, vol. 18, 1990. p. 6829 – 6833.
22. FOLTYS, V. 1996. Kvalita surového kravského mlieka v Slovenskej republike. In *Úlohy vedy a výskumu v chove hospodárskych zvierat*. Nitra, VÚŽV, 1996, s. 176 – 179.
23. GÁBOR, M. 2009. *Genetické markery kvality mäsa hovädzieho dobytku a oviec*. Dizertačná práca, Katedra genetiky a plemenárskej biológie, 2009, Nitra: SPU.
24. GAJDUŠEK, S. 1997. Význam bílkovin mléka na výtěžnost při výrobě sýrů. In: *Mlékarstvo*, roč. 28, 1997, č. 4, s 26 – 28.
25. GAJDUŠEK, S. 2003. *Laktologie*. Brno: MZLU, 2003, s. 78 – 79. ISBN 80-7157-657-3.
26. GRIEGER, C. – HOLEC, J. – BURDOVÁ, O. – KRČÁL, Z. – LUKÁČOVÁ, J. – MATYÁŠ, Z. – PLEVA, J. 1990. *Hygienu mlieka a mliečnych výrobkov*. Bratislava: Príroda, 1990, s. 397. ISBN 80-07-00253-7.

27. HAMBLING, S. G. – MCALPINE, A.S. – SAWYER, L. 1992. Advanced Dairy Chemistry: 1. Proteins, chapter: Beta-lactoglobulin. In *Elsevier Applied Science*, vol. 62, 1992, p. 141 – 190.
28. HAYES, H. – PETIT, E. J. 1993. Mapping of the beta-lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M heavy chain-like sequence to homologous cattle, sheep and goat chromosomes. In *Mamm. Genome*, vol. 4, 1993, no. 10, p. 207 – 210.
29. HILL, J.P. 1993. The relationship between beta-lactoglobulin phenotypes and milk composition in dairy cattle. In: *J. Dairy Sci.*, vol. 76, 1993, p. 281 – 286.
30. HOLEC, J. a kolektiv. 1989. Hygiena a technologie mléka a mléčných výrobků. Praha, Spn, 1989, s. 362. ISBN 80-851-1460-7.
31. CHOBOTOVÁ, E. – DOBÁLOVÁ, M. – FOLTYS, V. 1998. Frekvencia genotypov štyroch polymorfných systémov mliečnych bielkovín u plemien slovenského strakatého a pinzgauského. In *Czech Anim. Sci.*, roč. 43, 1998, s. 497 – 501.
32. CHRENEK, P. – ŽITNÝ, J. – HALADOVÁ, D. – VAŠÍČEK, D. – BAUEROVÁ, M. – KÚBEK, A. – BULLA, J. 1996. Stanovenie κ -kazeínového a beta-laktoglobulinového genotypu dojníc analýzou DNA a bielkovín. In *J. Farm. Anim. Sci.*, roč. 29, 1996, s. 9-14.
33. CHRENEK, P. – VAŠÍČEK, D. – HALADOVÁ, D. 1997. Detekcia genetických markérov plemien hovädzieho dobytku importovaných plemien na Slovensko. In *Journal of farm animal science*, vol. 30, 1997. s 139 – 141.
34. CHUDÝ, J. – ČANIGOVÁ, M. – HORVÁTHOVÁ, V. 1998. *Hodnotenie surovín a potravín živočíšneho pôvodu*. 2. vydanie. Nitra: SPU, 1998, s. 149 – 150. ISBN 80-7137-443-1.
35. CHUDÝ, J. – ČANIGOVÁ, M. – HORVÁTHOVÁ, V. – LAGIN, L. – MICHALCOVÁ, A. 2000. *Hodnotenie surovín a potravín živočíšneho pôvodu*. Nitra: VES SPU, 2000, 105 – 106. ISBN 80-7137-692-2.

36. INGR, I. 2003. Zpracování zemědělských produktů. Brno: MZLU, 2003, s. 249. ISBN 80-715-7520-8
37. JAKOB, E. – PUHAN, Z. 1992. Technological properties of milk as influenced by genetic polymorphism of milk proteins. A review. In *Int. Dairy J.*, vol. 2, 1992, p. 157 – 178.
38. JAKOB, E. 1995. Effect of genetic polymorphism on milk protein composition. In: *Bulletin IDF304*, 1995, s. 7 – 9.
39. JANDUROVÁ, O. M. – ŠTÍPKOVÁ, M. – KOTTOVÁ, B. 2002. Polymorfizmus alel mléčných bílkovin u skotu a šlechtění na kvalitu mléčné bílkoviny. In: *Náš chov*, 2002, s. 27 – 30.
40. JOST, R. 1993. Functional characteristics of dairy proteins. In *Trends in Food Science & Technology*, vol. 4, 1993, p. 283 – 288.
41. KAŽIMÍR, L. – GEMERI, L. 1993. Návod na cvičenie z mliekarstva a hodnotenia živočíšnych produktov. Bratislava: Príroda, 1993, s. 179. ISBN 80-7137-256-3
42. KOLOŠTA, M. 2000. Zloženie mlieka dojnic na pastve. In: *Mliekarstvo*, roč. 31, 2000, č. 4, s. 6-15.
43. KONTOPIDIS, G. – HOLT, C. – SAWYER, L. 2004. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. In *J Dairy Sci*, vol. 87, 2004, p. 785 – 96.
44. KOPEČNÝ, M. – DVORÁK, J. – NEBOLA, M. 1996. Detekce genomových variant beta-laktoglobulínu skotu pomocí alelově specifické PCR. In: *Živočišná výroba*, roč. 41, 1996, č. 9, s. 423 – 424.
45. KUČEROVÁ, J. – MATĚJÍČEK, A. – JANDUROVÁ, O. M. – SORENSEN, P. – NĚMCOVÁ, E. – ŠTÍPKOVÁ, M. – KOTT, T. – BOUŠKA, J. – FRELICH, J. 2006.

- Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, *LGB* and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. In *Czech J. Anim. Sci.*, vol. 51, 2006, p. 241 – 247.
46. LUKÁŠOVÁ, J. 2001. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2001, 180 – 181. ISBN 80-7305-415-9
47. LUNDEN, A. – NISSON, M. – JANSON, L. 1997. Marked effect of β -Lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. In *Journal of Dairy Science*, vol. 80, 1997, p. 2996 – 3005.
48. MAO, I. L. – BUTTAZZONI, L. G. – ALEANDRI, R. 1992. Effects of polymorphic milk protein genes on milk yield and composition traits in Holstein cattle. In: *Acta Agric. Scand. Sect. A, Anim. Sci.*, vol. 42, 1992, p. 1542 – 1546.
49. MEISEL, A. – BICKLE, T. A. – KRÜGER, D. H. – SCHROEDER, C. 1992. Type III restriction enzymes need two inversely oriented recognition sites for DNA cleavage. In *Nature* 355, 1992, p. 467 – 469.
50. MEYER, R., HÖFELEIN, C. – LÜTHY, J. – CANDRIAN, U. 1995. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method of species identification in food. *J AOAC Int.*, 1995, 78, p. 1542 – 1546.
51. MICHALCOVÁ, A. – ČANIGOVÁ, M. 1997. Zloženie a vlastnosti mlieka dojnic slovenského straketého dobytká v závislosti od genetického variantu beta-laktoglobulínu. In: *Aktuálne úlohy vedy a praxe v chove hovädzieho dobytká*, Nitra: SPU, 1997, s. 61 – 63.
52. MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – GÁBOR, M. – 2009. *Genetické markery kvality mlieka a zdravia hovädzieho dobytká*. Nitra: SPU, 2009. 6 – 14 s. ISBN 978-80-552-0281-5
53. MURRAY, N. E. 2000. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2), 2000, p. 412 – 434.

54. NEUBANUEROVÁ, V. – ČÍTEK, J. – ŘEHOUT, V. – KOŠVANEC, K. 2000. Výsledky terénní genotypizace skotu a možnosti praktického použití. In: *Acta fytotechnica et zootechnica*, roč. 3, 2000, s. 85. ISBN 80-713-748-1.
55. NG-KWAI-HANG KF. 1998. Genetic polymorphism of milk proteins: relationship with production traits, milk composition and technological properties. In *Canadian Journal of Animal Science*, vol. 125, 1998. p. 131 – 147.
56. NOVÝ, J. – JAMRÍŠKA, M. – KÚBEK, A. 1998. Genetika, 2. vydanie. Bratislava: *Príroda*, 1998, s. 143 – 149.
57. OVESNÁ, J. – DRAŠNAROVÁ, Z. 2001. Identifikace trnasgenů v rostlinách, semenech a odvozených produktech. Osiov a sadba – V. odborný a vědecký seminář, Praha, 2001
58. PANICKE, L. – FREYER, G. – ERHARD, G. 1996. Effects of milk protein genotypes on milk production traits. In: *46th meeting of the european Association for Animal Production*, 1996.
59. PATEL, P. K. – ARCANGIOLI, B. – BAKER, S. P. – BENSIMON, A., RHIND, N. 2006. DNA replication origins fire stochastically in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 17, 2006, p. 312 – 316.
60. PERVAIZ S. – BREW, K. 1999. Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC. In *Science*, vol. 228, 1999, p. 335 – 338.
61. PINGOUD, A. – JELTSCH, A. 2001. Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*. 29, 2001, p. 3705 – 3727.
62. RÉDEI, GEORGE P. 2008. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*. 3rd Edition. vyd. [s.l.] : Springer, 2008. ISBN 978-1-4020-6753-2.
63. ROBITAILLE, G. – BRITTEN, M. – MORISSET, J. – PETITCLERC, D. 2002. Quantitative analysis of β -Lactoglobulin A and B genetic variants in milk of cows β -

- Lactoglobulin AB throughout lactation. In *Journal of Dairy Research*, vol. 69, 2002, p. 652 – 654.
64. SAIKI, R.K. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In *Science*, vol. 239, 1988, 487 – 491.
65. SAMBROOK, J. – FRITZ, E. F. – MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harb. Lab. Press, USA. vols. 1-3, 1989.
66. SAWYER, L. – KONTOPIDIS, G. 2000. The core lipocalin, bovine beta-lactoglobulin. In *Biochim Biophys Acta*, vol. 1482, 2000, p. 136 – 48.
67. SEMJAN, Š. 1994. *Mliekarstvo*. 2. vyd. Nitra: VES VŠP, 95, 1994, s. 69 – 77. ISBN 84-1725-489-5.
68. SCHAAFSAMA, G. 2008. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal* 18, 2008. p 458 – 465.
69. SCHAAR, J. – HANSSON, B. – PETTERSON, HE. 2007. Effect of genetic variants of kappa-casein and beta-lactoglobulin on cheese making. In *Journal of Dairy Science*, vol. 52, 2007, p. 429 – 437.
70. SUN, Y. L. – LIN, C. S. 2003. Establishment and application of a fluorescent polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identifying porcine, caprine and bovine meats. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 1772 – 1776.
71. ŠMARDA, J. – DOŠKAR, J. – PANTUČE, R. – RUŽIČKOVÁ, V. – KOPÍTKOVÁ, J. 2005. *Metody molekulární biologie*, 1. vyd. Masarykova univerzita v Brně, 2005, s 73 – 103.
72. TRAKOVICKÁ, A. – STRAPÁKOVÁ, E. – OSTERTÁG, I. 2002. Genetický polymorfizmus beta-laktoglobulínu a jeho vzťah k variabilite produkcie mlieka dojnic. In: *Hovädzí dobytok v novom tisícročí. Zborník referátov*. Nitra, 2002, s. 222.

73. UHRÍN, P. – VAŠÍČEK, D. – BAUEROVÁ, M. – CHRENEK, P. – HETÉNYI, L. – BULLA, J. 1994. Genotyping of different breeds of the cattle for kappa-casein and beta-lactoglobulin alleles. In: *45th meeting of the european Association for Animal Production*, 1994, p. 2.
74. UHRINOVA, S. – SMITH, M. H. – JAMESON, G. B. – UHRIN, D. – SAWYER, L. – BARLOW, P. N. 2000. Structural changes accompanying ph-induced dissociation of the beta-lactoglobulin dimer. In *Biochemistry*, vol. 39, 2000, p. 3564 – 3576.
75. URBAN, F. 1997. Chov dojeného skotu (reprodukcia, odchov, management, technologicie, výživa). Praha: Apros, 1997, s. 289. ISBN 80-901100-7-X.
76. VELÍŠEK, J. 2002. *Chemie potravin I*. 2. vydanie. Tábor: OSSIS, 2002, s. 331 – 332. ISBN 80-86659-00-3.
77. VERKAAR, E. L. C. – NIJMAN, I. J. – BOUTAGA, K. – LENSTRA, J. A. 2002. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci.*, 2002, p. 348 – 372.
78. VÍGLASKÝ, V. – ČÍKOŠ, Š. – PRISTAŠ, P. – JAVORSKÝ, P. 2000. Praktikum z biochemie nukleových kyselín. UPJŠ KE, 2000, s. 17 – 32.
79. ZADRAŽIL, K. 2002. *Mlékařství*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2002. 127 s. ISBN 80-7157-657-3.
80. ŽITNÝ, J. – TRAKOVICKÁ, A. – MICHALČÍKOVÁ, E. 1995. Polymorfizmus bielkovín mlieka a výskyt mastitídnych kráv slovenského strakatého plemena. In: *Acta zootechnica*, roč. 50, 1995, s. 79 – 86.
81. URL 1: <http://www.mlieko.sk> (on-line, 23.1.2011)
82. URL 2:
http://www.objavmlieko.sk/mladez/clanky/?articles_action_type=detail&articles_id=57
(on-line, 20.2.2011)

83. URL 3: http://www.vuchs.cz/akce/2009-11_2010-03-Vliv-vyzivy-hospodarskych-zvirat-na-kvalitu-zivocisnych-produktu/prezentace/Svobodova_Alergenni-latky-v-potravinach-zivocisneho-puvodu.pdf (on-line, 20.2.2011)
84. URL 4:
http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=3991&magazine_id=4 (on-line, 20.2.2011)
85. URL 5:
http://eso.vscht.cz/cache_data/1207/www.vscht.cz/tmt/studium/chemie_mleka/P404b_prn.pdf (on-line, 18.2.2011)
86. URL 6: www.lfhk.cuni.cz/kohler/vyuka/dzl/Vysetrovaci%20metody1.ppt (on-line, 24.10.2010)
87. URL 7: <http://www.pcrstation.com/aflp-pcr/> (on-line, 20.1.2011)
88. URL 8: <http://.genome.cshlp.org/content/4/4/S151.full.pdf> (on-line, 15.11.2010)

PRÍLOHY

Príloha č. 1	Termocyklér BIORAD
Príloha č. 2	Termocyklér MJ MINI
Príloha č. 3	Centrifúga HERMLE

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Fakulta biotechnológie a potravinárstva

2118306

Diplomová práca: Detekcia genetického polymorfizmu bovinného beta-laktoglobulínu
metódou PCR-RFLP

Príloha č. 1 Termocyklér BIORAD



Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Fakulta biotechnológie a potravinárstva

2118306

Diplomová práca: Detekcia genetického polymorfizmu bovinného beta-laktoglobulínu
metódou PCR-RFLP

Príloha č. 2 Termocyklér MJ MINI



Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Fakulta biotechnológie a potravinárstva

2118306

Diplomová práca: Detekcia genetického polymorfizmu bovinného beta-laktoglobulínu
metódou PCR-RFLP

Príloha č. 3 Centrifúga HERMLE

