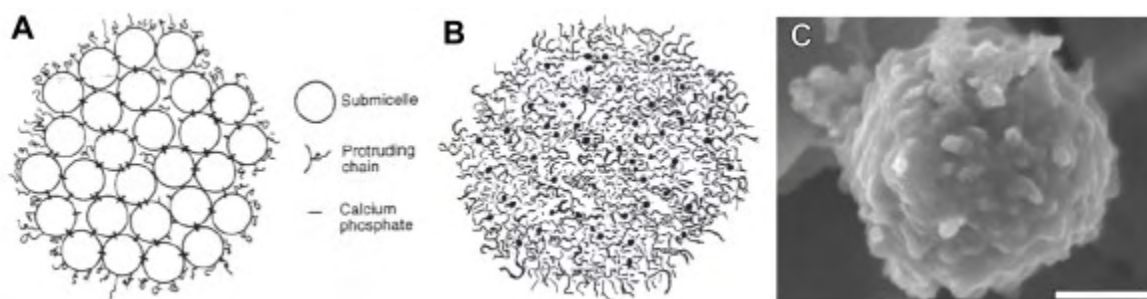


Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Επίπεδα πολυμορφισμού της καζεΐνης σε ελληνικές
αγελάδες Holstein



MARIA ΧΑΤΖΗΠΙΕΡΗ

2015

Επίπεδα πολυμορφισμού της καζεΐνης σε ελληνικές αγελάδες Holstein

Casein polymorphism in Greek Holstein cows

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Κατερίνα Μούτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Θεολογία Σαραφίδου, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακή Γενετική Ζωικών Πληθυσμών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Το θέμα της Μεταπτυχιακής μου διατριβής προτάθηκε από την κ. Κατερίνα Μούτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μούτου Κατερίνα, για τη βοήθεια, καθοδήγηση και συμβουλές της, οι οποίες και συνετέλεσαν στην ολοκλήρωση της πτυχιακής αυτής διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, την κ. Κατερίνα Μούτου, τον κ. Μαμούρη Ζήση και την κ. Θεολογία Σεραφίδου

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κωνσταντίνο Σταμάτη για την πολύτιμη βοήθειά του, αλλά και όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, Εξελικτικής & Συγκριτικής Βιολογίας.

Τέλος, Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου, που με στήριξε από την αρχή μέχρι το τέλος, σε όλο αυτό το δύσκολο ταξίδι, με αγάπη, κατανόηση και όλους τους λοιπούς δυνατούς τρόπους.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
Abstract	7
A. Εισαγωγή	8
1.1 Φυλή Αγελάδων Holstein.....	8
1.2 Ορισμός και Χαρακτηριστικά του γάλακτος	9
1.2.1 Καζεϊνικό γάλα.....	10
1.2.2 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος.....	11
1.3 Καζεΐνες γάλακτος (α s1-CN, α s2-CN , β -CN κ-CN)	13
1.3.1 α s1-CN γάλακτος.....	16
1.3.2 α s2-CN γάλακτος.....	16
1.3.3 β - Καζεΐνη	17
1.3.4 κ - Καζεΐνη	17
1.4 Πολυμορφισμοί Πρωτεϊνών.....	18
1.5 Επίδραση των γονιδιακών τύπων των πρωτεϊνών γάλακτος στα παραγωγικά χαρακτηριστικά	21
1.6 Επίδραση της Καζεΐνης στην τυροκόμηση.....	23
B. Σκοπός της παρούσας Μελέτης	25
Γ. Υλικά και μεθόδοι	26
2.1 Περιγραφή Μελέτης	27
2.1.1 Δειγματοληψία:	27
2.2.1 Απομόνωση του DNA	27
2.2.2 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα	29
2.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	29
2.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	32
2.3 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)	34
2.4 Αποδιάταξη και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR	36
2.4.1 Αλληλούχηση διαφορετικών προτύπων SSCP.....	37
2.4.2 Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης	39
Γ. Αποτελέσματα	40
3.1 Απομόνωση DNA	40
3.2 PCR:	40

3.3 SSCP:	41
3.4 Κατανομή προτύπων ανάλυσης SSCP στο σύνολο των δειγμάτων.....	41
3.5 Αλληλούχηση.....	42
Δ. Συζήτηση:	43
Βιβλιογραφία	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γάλα περιέχει πρωτεΐνες, οι οποίες διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στις πρωτεΐνες ορού και στις καζεΐνες σε ποσοστό 80% των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, μελετήσαμε την κ-καζεΐνη που βρίσκεται σε ποσοστό 0.3-0.4%. Ο προσδιορισμός της κ-καζεΐνης, είναι σημαντικός για την γαλακτοπαραγωγή, την ποιότητα του γάλακτος και την τυροκόμηση. Οι καζεΐνες παρουσιάζουν πολυμορφισμούς, οι οποίοι είναι σημαντικοί για τον σχηματισμό της λακτόζης, τη σύσταση του γάλακτος και τις τεχνολογικές τους ιδιότητες, όπως ο σχηματισμός των καζεϊνικών μυκηλίων και η απόδοση σε τυρί.

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί των πρωτεϊνών στο γάλα έχουν χρησιμοποιηθεί για μελέτες συσχέτισης με ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος, καθώς σε θέματα εξέλιξης και βιοποικιλότητας.

Έτσι, στόχος της μελέτης ήταν εύρεση των επιπέδων πολυμορφισμού της καζεΐνης του σε γαλακτοπαραγωγικά και αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά από ελληνικές αγελάδες της φυλής Holstein. Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από 94 αγελάδες, απομονώθηκε το DNA, ακολούθησε η διαδικασία με συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου με την μέθοδο της PCR με τους κατάλληλους εκκινητές και τελικώς τα αποδιαταγμένα δείγματα των προϊόντων της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδη σε θερμοκρασία δωματίου για 20-21 ώρες. Παρατηρήθηκε η εμφάνιση των ζωνών που αποκάλυψε 6 διαφορετικά πρότυπα. Ακολούθησε ο καθαρισμός των δειγμάτων που επιλέχθηκαν σαν τα κατάλληλα πρότυπα και στάλθηκαν για αλληλούχιση. Από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, προέκυψε ότι το μέγεθος του τμήματος του γονιδίου από όλα τα δείγματα ήταν 292bp. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης που είχαν τα 6 διαφορετικά πρότυπα των αγελάδων, χωρίστηκαν σε 3 ομόζυγα και 3 ετερόζυγα. Επίσης, βρέθηκαν 3 πολυμορφισμοί της κ-καζεΐνης, ο A, B και E.

Αναλυτικότερα, οι αγελάδες που παρουσίασαν γενότυπο: οι 40AA, οι 5BB, οι 2EE, και οι 40AB, οι άλλες 4AE και οι άλλες 3BE. Παρατηρήθηκε ότι το A αλληλόμορφο ήταν το πιο συχνά απαντώμενο, ακολούθησε το B και έπειτα το E. Επίσης, βρέθηκε ότι τα τρία αυτά αλληλόμορφα παρουσίασαν 3 πολυμορφισμούς, τον A, B και E.

Abstract

Milk contains proteins which are separated into two categories: the proteins of serum and the caseins that constitute 80% of the proteins. More specifically, we have studied the k-casein which exist in proportion of 0.3-0.4 %.The identification of k-casein is important for the milk production, the quality of the milk and cheese-making. Caseins show polymorphisms, which are important for the production of lactose, the content of milk and it's technological characteristics, like the formation of casein mycelia and the production of cheese.

The genetic polymorphisms of the proteins in the milk have been studied in comparison with the quantitative and qualitative characteristics of dairy production as well as for topics of evolution and biodiversity.

The purpose of the study was to determine the level of polymorphism of k-casein into the production of milk and fertilisation of cows in Greece of the race Holstein. For that reason, samples of blood from 94 cows were collected, DNA was isolated and exon of the gene was amplified with the method of PCR using the appropriate primers. Finally, the products of PCR were electrophoresed in thick acrylamide in room temperature for 20-21 hours. The revealed DNA zones fell within 6 different standards. Then, the appropriate samples were cleaned and they have been sent for sequencing. The results of the sequencing revealed that the size of the amplicon from all of the samples was 292 bp. The results of the sequencing of the 6 different patterns of the cows were separated into 3 homozygous and 3. Heterozygous Also, 3 polymorphisms of k-casein were found, A, B and E.

More specifically, the cows had genotype: 40AA, 5BB, 2EE and 40AB, 4AE and 3BE. The A allele was detected in high frequency B and then E were followed respectively. Also, it has been observed that those 3 alleles showed 3 polymorphisms, A, B and E.

A. Εισαγωγή

1.1 Φυλή Αγελάδων Holstein

Η φυλή Holstein-Friesian προέρχεται από διασταύρωση ζώων τα οποία έχουν τις γενεαλογικές τους ρίζες στην Ολλανδία, και συγκεκριμένα στην επαρχία της Φριςλανδίας (Εικόνα1). Η φυλή κατατάσσεται στην κατηγορία των βοοειδών διπλής παραγωγικής κατεύθυνσης. Είναι ζώα υψηλής γαλακτοπαραγωγής ικανότητας και με καλά κρεοπαραγωγικά χαρακτηριστικά. (Papaioannou et al., 2012).

Σύμφωνα με τα στοιχεία της Ένωσης Φυλής Χολστάιν Ελλάδας, οι αγελάδες στη χώρα μας παράγουν κατά μέσον όρο 8.510 κιλά γάλακτος σε 305 ημέρες. Η περιεκτικότητα σε λίπος, πρωτεΐνη και λακτόζη είναι 3.8%, 3.3% και 4.8% αντίστοιχα και ο μέσος αριθμός σωματικών κυττάρων είναι 396.000. Η ηλικία πρώτου τοκετού είναι 27,6 μήνες (2-3 έτη), η ηλικία απομάκρυνσης 54,6 μήνες (4,6 έτη), ο αριθμός των γαλακτικών περιόδων μέχρι την απομάκρυνση 2,9 έτη, η διάρκεια της παραγωγικής ζωής 27 μήνες (2,3 έτη), το μεσοδιάστημα τοκετών 451 ημέρες και το διάστημα ανοικτών ημερών (από τον τοκετό μέχρι τη σύλληψη) 159 ημέρες. Οι αποδόσεις αυτές είναι απόλυτα συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες αποδόσεις κτηνοτροφικά προηγμένων χωρών.



Εικόνα 1. Αγελάδα φυλής Holstein-Friesian

Οι αγελάδες της φυλής Holstein-Friesian αναγνωρίζονται αμέσως από τον χρωματισμό τους, που είναι κυρίως ασπρόμαυρος ενώ υπάρχουν και ζώα ασπροκόκκινα, τα οποία μπορούν να προκύψουν ως απόγονοι ασπρόμαυρων εξαιτίας της παρουσίας και στους δύο γονείς ενός υποτελούς γονιδίου που δίνει αυτό τον χρωματισμό μόνο σε ομοζύγωτη κατάσταση.

Στην Ελλάδα οι ασπροκόκκινες αγελάδες εκτρέφονται μέσα σε αγέλες με ασπρόμαυρα ζώα ενώ στο εξωτερικό υπάρχουν αγέλες με αποκλειστικά ασπροκόκκινα ζώα, όπου εκτιμώνται για τη μεγαλύτερη γενικά ανθεκτικότητά τους, εις βάρος όμως των υψηλών αποδόσεων. Το μέσο βάρος του ζώου είναι στα 650-700 κιλά. Είναι η σημαντικότερη φυλή της γαλακτοκομικής βιομηχανίας λόγω της μεγάλης γαλακτοπαραγωγικής δυνατότητάς τους, καθώς και της ανθεκτικότητάς τους στη ζέστη και το κρύο.

1.2 Ορισμός και Χαρακτηριστικά του γάλακτος

Το γάλα προέρχεται από αγελάδα ή άλλο ζώο και είναι πλήρες, νωπό, χωρίς καμία φάση αφυδάτωσης ή συμπύκνωσης και δεν περιέχει άλλες ουσίες που έχουν προστεθεί απ' έξω (Μάντης,2000).

Το γάλα περιέχει κύρια συστατικά τα οποία υπολογίστηκαν με συστηματικές φυσικοχημικές εξετάσεις και διαπιστώθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις στην αναλογία αυτών. Πολλοί παράγοντες επιδρούν και επηρεάζουν την αναλογία αυτή, μεταξύ των οποίων οι σημαντικότεροι η φυλή, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, η εποχή κτλ.

Η μέση χημική σύσταση του γάλακτος είναι: Νερό 87% , Λίπος 3,6% , Καζεΐνες 2,8%, Πρωτεΐνες ορού 0,6%, Λακτόζη 4,9% και Τέφρα (ανόργανα άλατα) 0,7%. (Zoulfos, 2010).

Από τα παλιά χρόνια το γάλα ήταν μια εξαιρετική τροφή για τον άνθρωπο για τις θρεπτικές ουσίες οι οποίες λειτουργούν ως πηγές ενέργειας. Το γάλα δημιουργείται στο αδενικό επιθήλιο του μαστικού αδένος και συγκεκριμένα στις αδενοκυψελίδες. Το αίμα μεταφέρει στο μαστό τις απαραίτητες δομικές ουσίες από τις οποίες τα επιθηλιακά κύτταρα (γαλακτικά κύτταρα) του μαστού συνθέτουν τα κυριότερα συστατικά του γάλακτος (λίπος, πρωτεΐνες, λακτόζη), ενώ ορισμένα περνούν στο γάλα χωρίς να υποστούν κανένα μετασχηματισμό στο μαστικό αδένος. Η γαλακτοφορία ξεκινάει αμέσως μετά τον τοκετό και συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. (Anifandakis, 2004).

Η ελληνική γαλακτοπαραγωγή ανέρχεται στους 800.000 τόνους γάλα αγελάδας και αποτελείται το 0.7% της ευρωπαϊκής παραγωγής, (FAOSTAT, 2002).

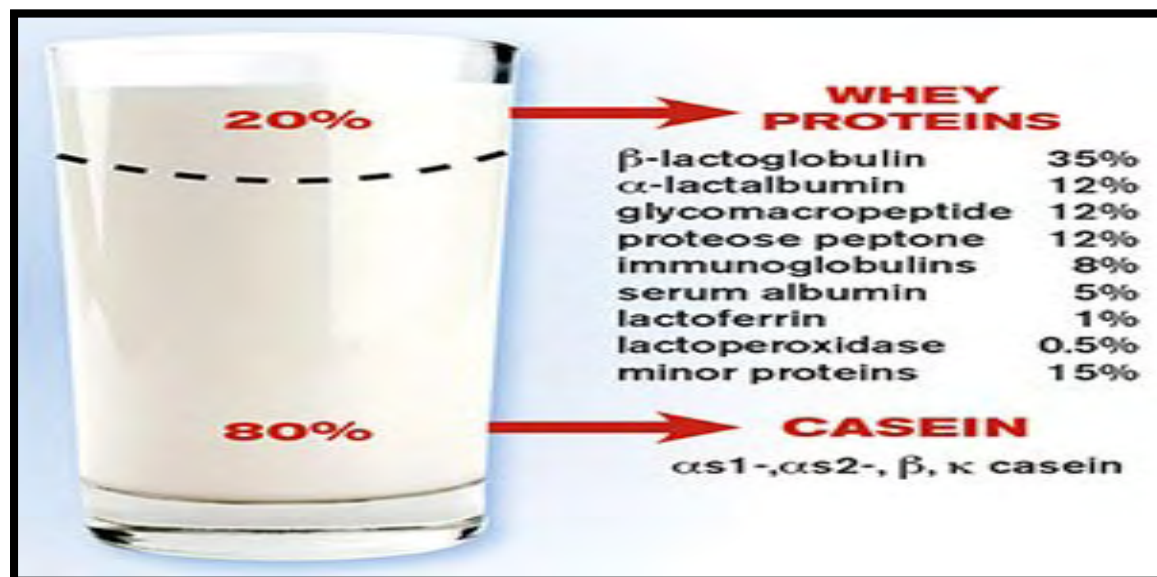
1.2.1 Καζεϊνικό γάλα

Στο καζεϊνικό γάλα, το 75% των πρωτεϊνών που περιέχει το αντιπροσωπεύει η καζεΐνη και το υπόλοιπο άλλες πρωτεΐνες (Εικόνα2). Για αυτό το λόγο ότι περιέχει 75% καζεΐνες ορίζεται σαν καζεϊνικό γάλα. Αν το ποσοστό καζεΐνης είναι <75% τότε ορίζεται ως αλβουμινικό γάλα.

Αλβουμινικό γάλα

Αλβουμινικό γάλα παράγουν, κατά κανόνα, τα φυτοφάγα ζώα που έχουν απλό στομάχι, τα παμφάγα, καθώς και τα σαρκοφάγα. Το γάλα αυτό περιέχει σχετικά μεγάλο ποσοστό από την πρωτεΐνη αλβουμίνη.

Τρεις είναι οι κύριες ομάδες των πρωτεϊνών: δομικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες με βιολογική δράση και διατροφικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες τροφίμων. Το γάλα περιλαμβάνεται στις διατροφικές πρωτεΐνες οι οποίες διακρίνονται από τη συμπεριφορά και τη μορφή τους. Κατά την επεξεργασία οι καζεΐνες στο γάλα έχουν γρήγορη καθίζηση με το ένζυμο ρεννίνη (πυτιά) ή σε χαμηλό pH, ενώ οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος είναι διαλυτές. Με ήπια θέρμανση οι σφαιρικές πρωτεΐνες μετουσιώνονται και σταθεροποιούνται οι καζεΐνες. Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης των λιποσφαιρίων είναι στην επιφάνεια και απελευθερώνονται με την εφαρμογή της μηχανικής δύναμης (Dairy Processing Handbook, Tetrapak, Sweden).



Εικόνα 2. Η πρωτεϊνική σύνθεση του γάλακτος

1.2.2 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος

Όταν απομακρυνθεί η καζεΐνη από το αποβουτυρωμένο γάλα με την επίδραση ανόργανων οξέων, αυτό που απομένει είναι διάλυμα πρωτεϊνών του ορού γάλακτος. Οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος εκτός από τις πρωτεΐνες του ορού στο γάλα αποτελούνται και από κομμάτια των μορίων των καζεϊνών χάρη στη δράση του ενζύμου ρεννίνη (πυτία) στο γάλα της τυροκόμησης. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι πολύ όμοιες με τις πρωτεΐνες του τυρογάλακτος για αυτό το λόγο και συχνά οι δυο όροι συγχέονται.

Οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος αποτελούν περίπου το 20% του πρωτεϊνικού κλάσματος του γάλακτος. Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής είναι πολύ διαλυτές και διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

- α- λακταλβουμίνη
- β- λακτοσφαιρίνη
- οροαλβουμίνη
- ανοσοσφαιρίνες
- διάφορες πρωτεΐνες και πολυπεπτίδια

α-λακταλβουμίνη

Αυτή η πρωτεΐνη είναι η χαρακτηριστική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος. Βρίσκεται στο γάλα όλων των θηλαστικών και έχει σημαντικό ρόλο στην σύνθεση της λακτόζης (Food-Info.net - Wageningen University, The Netherlands). Έχει μεγάλη βιολογική αξία. Η σύνθεση των αμινοξέων είναι πιο κοντά σε αυτή που θεωρείται σωστή από άποψη βιολογικής αξίας. Όμοια παράγωγα του ορού γάλακτος βρίσκονται στη βιομηχανία τροφίμων όπου και χρησιμοποιούνται. Οι πρωτεΐνες του ορού μετουσιώνονται κατά την υψηλή θερμοκρασία και έχουν συνέπεια τη συσσωμάτωσή τους με καζεϊνικά μυκήλια, (Food-Info.net - Wageningen University, The Netherlands).

Οροαλβουμίνη

Η οροαλβουμίνη θεωρείται ότι βρίσκεται στο γάλα από “διαροή” από το αίμα του ζώου

β-λακτοσφαιρίνη

Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται μόνο στα βοοειδή και είναι η κύρια πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος των αγελάδων. Με τη θέρμανση του γάλακτος στους 60 °C, αρχίζει η μετουσίωση των πρωτεϊνών του κατά την οποία η αντίδραση των θειούχων αμινοξέων της β-λακτοσφαιρίνη παίζει πρωταρχικό ρόλο. Σε αυξημένες θερμοκρασίες ελευθερώνονται θειούχες ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για την οσμή και γεύση του θερμασμένου γάλακτος, (Food-Info.net - Wageningen University, The Netherlands).

Ανοσοσφαιρίνες

Οι ανοσοσφαιρίνες έχουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του νεογέννητου ζώου ενάντια σε βακτήρια και ασθένειες, (Food-Info.net - Wageningen University, The Netherlands).

Λακτοφερίνη

Η λακτοφερίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στους μεταφορείς σιδήρου της οικογένειας των τρανσφερινών. Αρχικά απομονώθηκε από βόειο γάλα αλλά βρίσκεται και στο γάλα άλλων ζώων. Ακόμη, βρίσκεται στις εξωκρινείς εκκρίσεις των θηλαστικών πέρα από το γάλα. Η λακτοφερίνη θεωρείται ως πολυλειτουργική πρωτεΐνη που έχει διάφορους βιολογικούς ρόλους. Λόγω της ικανότητας της να αποθηκεύει το σίδηρο, πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην απορρόφηση του σιδήρου από το βλεννογόνο του εντέρου των θηλαζόντων βρεφών. Ακόμη φαίνεται ότι έχει αντιβακτηριακή, αντιϊκή, αντιμυκητιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και ανοσορρυθμιστική δράση. Αυτές οι δραστηριότητες της μελετώνται (Food-Info.net - Wageningen University, The Netherlands).

Λακτοπεροξειδάση

Η λακτοπεροξειδάση έχει αναγνωριστεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας στο γάλα, το σάλιο και τα δάκρυα. Είναι ένα φυσικό σύστημα άμυνας εναντίον των βακτηρίων μέσω της οξείδωσης των θειοκυανικών ιόντων (SCN-) από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Τα τελευταία δύο είναι παρόντα στα βιολογικά υγρά και μαζί με τη λακτοπεροξειδάση αποτελούν το σύστημα της λακτοπεροξειδάσης (LP-s) (Food-Info.net - Wageningen University, The Netherlands).

1.3 Καζεΐνες γάλακτος (α s1-CN, α s2-CN, β -CN, κ -CN)

Με την παραγωγή των προϊόντων αποικοδόμησης η καζεΐνη από αδιάλυτη μορφή μετατρέπεται σε διαλυτή πριν από τη βιοχημική δράση.

Η αποικοδόμησή της ακολουθεί την εξής πορεία:

Παρακαζεΐνη \rightarrow πρωτεόζες \rightarrow πεπτόνες \rightarrow αμινοξέα \rightarrow {αμμωνία και πτητικά οξέα, οξικό, προπιονικό και άλλα}

Οι πρωτεόζες και οι πεπτόνες δεν έχουν άρωμα, τα αμινοξέα και τα οξέα που προκύπτουν από την τελική διάσπαση τους μαζί με τα οξέα που προκύπτουν από τη διάσπαση του λίπους, προσδίδουν άρωμα, γεύση και όσο πιο προχωρημένη είναι η αποικοδόμηση της καζεΐνης τόσο πιο έντονα είναι (Kiriakopoulos, 1995).

Οι καζεΐνες είναι αυτές που δημιουργούν πήγμα κατά τη τυροκόμηση, βέβαια έχοντας ενσωματωμένες μικρές ποσότητες πρωτεϊνών του ορού γάλακτος όπως η α -λακταλβουμίνη και β -λακτοσφαιρίνη οι οποίες δεν έχουν σημαντικό βαθμό ωρίμανσης αφού δεν μεταβάλλονται, (Anifandakis, 1993).

Οι καζεΐνες διακρίνονται σε τέσσερις ομάδες: α s-, α s2-, β - και κ -καζεΐνες (Εικόνα 4). Οι ομάδες είναι ετερογενείς και περιλαμβάνει η καθεμία 2-8 διαφορετικές γενετικές παραλλαγές. Αυτές οι παραλλαγές έχουν μικρή διαφορά στον αριθμό των αμινοξέων. Οι ομάδες α - και β -καζεΐνες έχουν ομοιότητα στο ότι τα αμινοξέα τους εστεροποιούνται σε φωσφορικό οξύ που δένεται με το ασβέστιο και σχηματίζει δεσμούς μεταξύ και εντός μορίων.

Με τον τρόπο αυτό αρχίζει η δημιουργία πολυμερών καζεϊνών τα οποία σχηματίζονται από πολλαπλά ίδια ή διαφορετικά μόρια καζεϊνών. Λόγω της αφθονίας φωσφορικών ομάδων και υδρόφοβων περιοχών στο καζεϊνικό μόριο, τα πολυμερή των καζεϊνών είναι ιδιόμορφα και σταθερά. Αποτελούνται από χιλιάδες μόρια σχηματίζοντας ένα κολλοειδές διάλυμα το οποίο έχει το λευκό χρώμα του γάλακτος. Αυτά τα μοριακά σύμπλοκα είναι τα γνωστά καζεϊνικά μυκήλια. Τα καζεϊνικά μυκήλια, όπως φαίνεται στη Εικόνα 3, αποτελούνται από ένα σύμπλοκο υπομυκηλίων, διαμέτρου 10 έως 15 nm (1 nm = 10^{-9} μέτρα). Ένα μυκήλιο μεσαίου μεγέθους αποτελείται από περίπου 400 με 500 υπομυκήλια και μπορεί να φθάσει σε μήκος τα 0.4 μ m (Food-Info.net - Wageningen University, The Netherlands, 1999).

Όσο αφορά τις φωσφορικές ομάδες της καζεΐνης ρόλος τους είναι:

- επειδή στο pH 6.7 - 6.8 του γάλακτος απαντώνται σε μορφή ανιόντος, μπορούν και σχηματίζουν άλας (καζεϊνικό ασβέστιο) με τα ιόντα του ασβεστίου που υπάρχουν στο περιβάλλον τους.
- η παρουσία των φορτίων στα φωσφορικά ανιόντα σε μια από τις πολλές μορφές καζεΐνης στο γάλα (την κ-καζεΐνη) προκαλεί τη δημιουργία μυκηλίων, χάρη στα οποία οι καζεΐνες είναι τελικά διαλυτές και γιαυτό το λόγο γάλα δεν περιέχει ίζημα (δηλαδή είναι ένα σταθερό γαλάκτωμα).

Όταν προστεθεί στο γάλα μια ποσότητα οξέος (υδροχλωρικού, οξικού, κλπ.) αρχίζουν και πρωτονιώνονται οι φωσφορικές ομάδες, δηλαδή καταστρέφεται το άλας του καζεϊνικού ασβεστίου, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ηλεκτρική ισορροπία στα μόρια της πρωτεΐνης, οπότε εμφανίζεται έλξη μεταξύ τους. Αυτός είναι ο λόγος που «κόβει» το γάλα όταν προσθέσουμε οξύ.

Η σπουδαιότητα της κ-καζεΐνης και των ομάδων υδατανθράκων της γίνεται ορατή κατά την παρασκευή τυριού. Η ρεννίνη που χρησιμοποιείται στο πρώτο στάδιο της τυροκόμησης, διασπά τους υδατάνθρακες από το μόριο της κ-καζεΐνης στην επιφάνεια των μυκηλίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μυκήλια να παύουν να είναι διαλυτά και να αρχίζουν να συσσωματώνονται σχηματίζοντας το τυρόπηγμα (Food-Info.net - Wageningen University, The Netherlands, 1999).

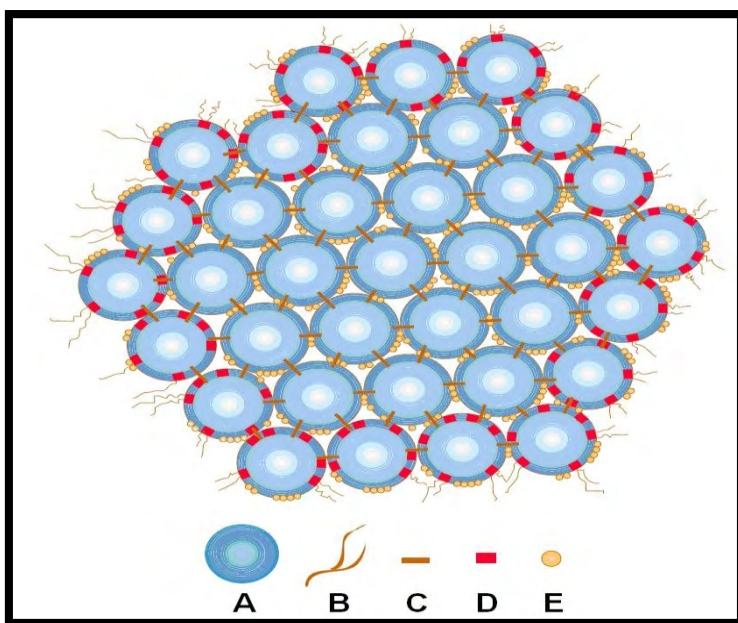
Σε χαμηλή θερμοκρασία η δομή του μυκηλίου αποδυναμώνεται καθώς οι αλυσίδες της κ-καζεΐνης αρχίζουν να αποσυνδέονται και το υδροξυφωσφορικό ασβέστιο αφήνει το μυκήλιο. Η εξήγηση αυτού του φαινομένου βασίζεται στο ότι η β-καζεΐνη είναι η πιο υδρόφοβη καζεΐνη και στο ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αποδυναμώνονται με την μείωση της θερμοκρασίας. Η υδρόλυση της β-καζεΐνης σε γ-καζεΐνη και σε πρωτεόζες-πεπτόνες (προϊόντα διάσπασης) σημαίνει χαμηλότερη απόδοση σε τυρόπηγμα κατά την παρασκευή τυριού γιατί τα κλάσματα των πρωτεοζών-πεπτονών χάνονται στο τυρόγαλα.

Η χρήση άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων είναι επίσης δυνατή για την παρασκευή τυροπήγματος αλλά συχνά η δράση αυτών δεν είναι εξειδικευμένη. Τυρί το οποίο είναι παρασκευασμένο χωρίς τη χρήση ρεννίνης, με φυτικής προέλευσης πρωτεάσες (για

χορτοφάγους), έχει συχνά διαφορετική γεύση ενώ η απόδοση σε τυρόπηγμα κατά την παρασκευή του είναι μειωμένη (Food-Info.net - Wageningen University, The Netherlands, 1999).

Πρωτεάση -Καζεϊνικά Μυκήλια

- Πρωτεάση τύπου σερίνης: διαλύει τα συσσωματώματα αίματος. Άριστες συνθήκες δράσης: pH 7.5, T=37°C. Υψηλή εξειδίκευση για πεπτιδικούς δεσμούς Arg, Lys στο C-τελικό άκρο [β -καζεΐνη, πλασμίνη \rightarrow γ -καζεΐνες (ίζημα) + πρωτεόζες πεπτόνες (ορός)].
- Υδρολύει επίσης την α s2- και στη συνέχεια την α s1-καζεΐνη. Συμμετέχει στην εξέλιξη της πρωτεόλυσης (δηλαδή στη μετατροπή των καζεϊνών σε πολυπεπίδια) κατά την ωρίμαση των τυριών.
- Η καθελψίνη B \rightarrow υδρολύει τις β - και α s1-cn σε θέσεις όμοιες ή παρόμοιες με της πλασμίνης. Προέρχεται από τα σωματικά κύτταρα. Η δράση της είναι παρόμοια με της χυμοσίνης: υδρολύει την κ-καζεΐνη προς παρα-κ-καζεΐνη και υδρολύει με όμοιο τρόπο τις α s1- και β -καζεΐνες. Συνθήκες αδρανοποίησης: 70 °C / 10 min.
- Στο γάλα είναι η ανενεργή προκαθελψίνη D. Είναι πρωτεάση τύπου ασπαρτικού οξέος. Προέρχεται από τα σωματικά κύτταρα. Η ποσότητά της στο αγελαδινό γάλα είναι ~ 0,4 g/mL. Βρίσκεται κυρίως στον ορό και το $\frac{1}{4}$ της ενεργότητάς της εντοπίζεται στα καζεϊνικά μικκύλια. Έχει όξινο άριστο pH ~ 4,0. (Moatsou)



Εικόνα 3. Καζεϊνικό μυκήλιο

A : ένα υπομυκήλιο.

B : προεξέχουσα αλυσίδα.

C : Φωσφορικό ασβέστιο.

D : κ-καζεΐνη

E : φωσφορικές ομάδες

1.3.1 *as1*-CN γάλακτος

Η *as1*-CN με 1,2-1,5% αποτελεί τη μεγαλύτερη αναλογία των συστατικών του γάλακτος. Αποτελείται από 199 αμινοξέα με υπολογισμένο μοριακό βάρος 23.615 daltons (Mercier et al., 1971). Οι παραλλαγές A,B,C έχουν 8 φωσφορικές ομάδες και η D εννέα, (Mercier et al., 1971, Eigel et al., 1984). Είναι ευαίσθητη στα ιόντα ασβεστίου και καταβυθίζεται με χλωριούχο ασβέστιο 0,4 M, σε pH 7,0 και θερμοκρασία 40°C, ενώ δεν περιέχει κυστεΐνη ή σάκχαρα (Anifantakis, 1994).

Οι παραλλαγές της *as1*-CN έχουν ταυτοποιηθεί. Στα γερμανικά μαύρα και άσπρα βοοειδή βρέθηκε το *as1*-CN F (Erhardt, 1993), η *as1*-CN G ανακαλύφθηκε σε ιταλικές καφέ αγελάδες (Mariani et al., 1995 & Mahe et al., 1999). Η παραλλαγή A που βρέθηκε σε Holstein Friesian, Κόκκινες Holstein, (Ng-Kwai-Hang et al., 1984, Grosclaude, 1988, Erhardt, 1993). Η παραλλαγή B είναι η κυρίαρχη παραλλαγή για *Bos taurus* (Eigel et al., 1984). Η παραλλαγή C σε *Bos indicus* και *Bos grunniens* (Eigel et al., 1984). Η παραλλαγή A σε διάφορες φυλές στη Γαλλία (Grosclaude, 1988) και στην Ιταλία (Mariani & Russo, 1975) καθώς και σε Jersey στην Ολλανδία (Corradini, 1969) και η παραλλαγή E σε *Bos grunniens* (Grosclaude et al., 1976). Οι νέες παραλλαγές είναι F, G, και H.

1.3.2 *as2*-CN γάλακτος

Η *as2*-καζεΐνη αποτελεί το 0,3-0,4% των συστατικών του γάλακτος. Αποτελείται από 207 αμινοξέα με υπολογιζόμενο μοριακό βάρος 25.226 daltons και διαθέτει 10-13 φωσφορικές ομάδες (Brignon et al., 1977). Περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα φωσφόρου σε σχέση με τις υπόλοιπες καζεΐνες (Anifantakis, 1994). Είναι η λιγότερο υδρόφοβη καζεΐνη (Rollema, 1992).

Η *as2*-καζεΐνη περιέχει δύο κατάλοιπα κυστεΐνης που εμπλέκονται στις δισουλφιδικές αλυσίδες (Rasmussen et al., 1994). Τέσσερις γενετικές παραλλαγές έχουν περιγραφεί A έως D και δεν έχουν σημαντικά τροπο-κατιόντα όπως αναφέρθηκαν μετά την αναθεώρηση από Caroli et al. (2009), εκτός από την υποκατάσταση Ser / Phe που παρατηρήθηκε σε θέση 8 (S8F) στη παραλλαγή B, με αποτέλεσμα την απώλεια μιας δυνητικής θέσης της φωσφορυλίωσης (Ibeagha-Awemu et al., 2007). Η παραλλαγή C διαφέρει σε τρεις θέσεις από την παραλλαγή A (Mahe & Grosclaude, 1982). Τέλος, η εσωτερική απαλοιφή οκτώ καταλοίπων που κωδικοποιούνται από το εξώνιο 8 (Bouniol et al., 1993a, b), έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ενός ολόκληρου συμπλέγματος φωσφορυλιωμένων σερινών. (Paul L. McSweeney, Patrick F. Fox Editors., 2013).

1.3.3 β- Καζεΐνη

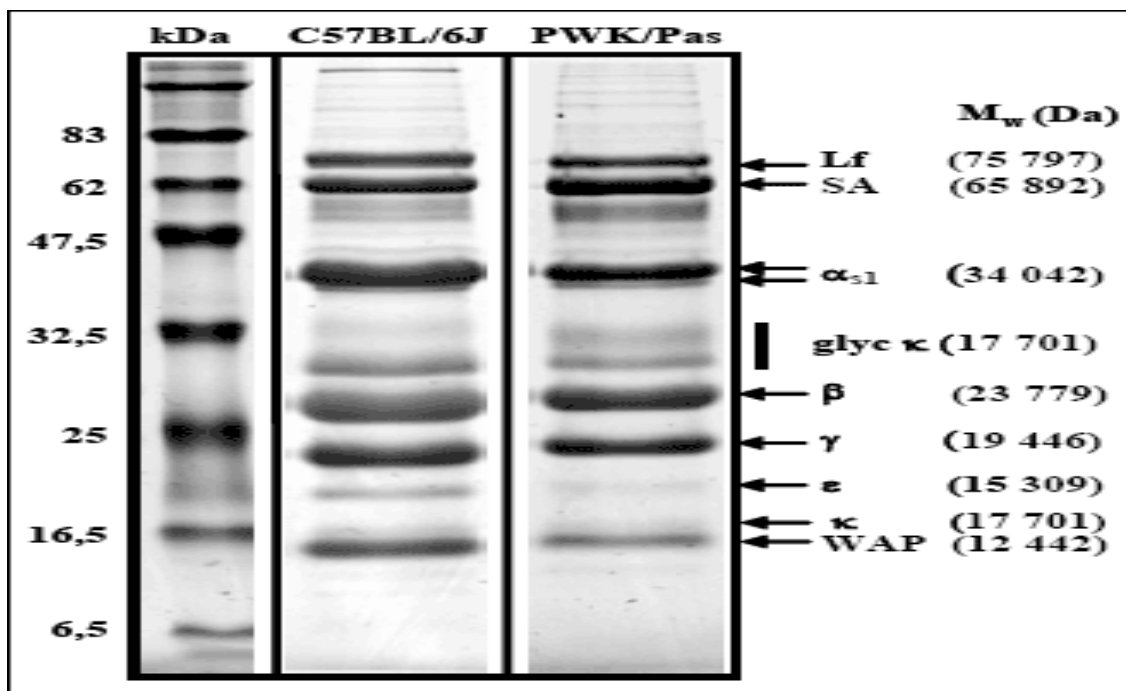
Η β-καζεΐνη αποτελεί το 0,9-1,1% των συστατικών του γάλακτος. Είναι η περισσότερο υδρόφοβη καζεΐνη (Rollema, 1992). και αποτελείται από 209 αμινοξέα (Ribadeau-Dumas et al.,1972, Grosclaude et al.,1973). Σε θερμοκρασίες μικρότερες των 10°C δεν καταβυθίζεται παρουσία ιόντων ασβεστίου και παραμένει διαλυτή. Ωστόσο, θερμοκρασίες υψηλότερες των 20°C προκαλούν σημαντικές αλλαγές στη δομή της, με αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση της στα ιόντα ασβεστίου (Anifantakis, 1994). Η ακολουθία της β-καζεΐνης ήταν η πρώτη που καθορίστηκε σε επίπεδο πρωτεΐνης (Ribadeau Dumas et al.,1972, Carles et al.,1988), χρησιμοποιώντας νέα μέθοδο για τον πρωτογενή προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών.

1.3.4 κ- Καζεΐνη

Η κ-καζεΐνη αποτελεί το 0,3-0,4 %, περίπου των συστατικών του γάλακτος. Απαντά με τη μορφή πολυμερών κ-καζεϊνών που συνδέονται με διθειικούς δεσμούς. Είναι διαλυτή παρουσία ιόντων ασβεστίου σε οποιαδήποτε θερμοκρασία, ενώ θεωρείται ότι συντελεί στη σταθεροποίηση του σχήματος των καζεϊνών μηκυλίων. Είναι η μόνη από τις κύριες καζεΐνες που περιέχει στο μόριο της υδατάνθρακες (γαλακτόζη 1,3%, γαλακτοζαμίνη 1,4% και αμινοακετυλονευραμινικό οξύ 2,0%). Αποτελείται από 169 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 19.000 daltons. (Mercier et al., 1973). Ο δεσμός φαινυλαλανίνης – μεθειονίνης, στη θέση 105-106, προσβάλλεται από τη ρεννίνη κατά την πήξη του γάλακτος και έτσι, παράγεται η παρα-κ-καζεΐνη και ένα γλυκομακροπεπτίδιο (Mantis, 1993).

Οι δύο κοινές γενετικές παραλλαγές χαρακτηρίζονται Α και Β (Neelin, 1964, Woychik,1964). Η παραλλαγή Α τείνει να είναι κυρίαρχη στις περισσότερες φυλές αγελάδων οι οποίες δίνουν γάλα για γαλακτοκομικά προϊόντα, με εξαίρεση την φυλή Jersey (Thompson & Farrell,1974, Bech & Kristiansen,1990 Ng-Kwai-Hang & Grosclaude,2003). Επιπλέον, 9 άλλες γενετικές παραλλαγές έχουν αναφερθεί. Η C διαφέρει από την Α με υποκατάσταση His97 για Arg 97, η E διαφέρει από την Α με υποκατάσταση Gly 155 για Ser 155.

Τέλος, η S104A τροποποίηση στην παραλλαγή Ι μεταβάλλει την -Ser-Phe-Met-Ala-χυμοσίνη ευαίσθητη περιοχή που περιγράφεται από τον (Visser et al.,1976), και μπορεί έτσι να επηρεάσει την πυτιά επαγόμενη πήξη του γάλακτος.



Εικόνα 4. Μεγέθη των καζεϊνών

1.4 Πολυμορφισμοί Πρωτεϊνών

Ο πολυμορφισμός χαρακτηρίζει τις 6 κύριες πρωτεΐνες γάλακτος που κωδικοποιούνται από τα πολυμορφικά γονίδια και έχουν πολλές συνώνυμες και μη-συνώνυμες μεταλλάξεις (47 διαφορετικές πρωτεΐνες). Πάνω από 30 χρόνια παρακολουθείται η σχέση του συμπλέγματος καζεΐνης, εφαρμόζοντας το στην ανατροφή του ζώου για αρκετά χρόνια. Οι επιδράσεις της καζεΐνης στην παραγωγικότητα ερευνήθηκαν με βάση τις πληροφορίες για όλα τα συμπλέγματα. Οι πολυμορφισμοί πρωτεϊνών του γάλακτος είναι αναγκαίοι για το σχεδιασμό εκτροφής, για τις φυλογενετικές μελέτες κ.α.

Σε ποσοστό < 95% των πρωτεϊνών στο γάλα του ζώου κωδικοποιούνται από 6 γονίδια (Martin et al.,2002 (Εικόνα 5.). Όσο αφορά στα γονίδια της καζεΐνης είναι τα 4 που βρίσκονται συνδεδεμένα μέσα σε 250Kb συμπλέγματος (Ferretti et al,1990 Threadgill & Womack,1990) και είναι τοποθετημένα στο χρωμόσωμα 6 (Hayes et al,1993, Popescu et al,1996).

Τα γονίδια αυτά είναι: CSN1S1, CSN2, CSN1S2 και CSN3 που κωδικοποιούν αs1-CN, β- CN, αs2- CN και κ-CN αντίστοιχα. Οι 2 κύριες πρωτεΐνες του ορού γάλακτος, α-LA και β-LG κωδικοποιούνται από το LAA και LGB γονίδια και εντοπίζονται στα χρωματοσώματα 5 (Hayes et al.,1993) και 11 (Hayes & Petit,1993), αντίστοιχα. (A. M. Caroli et al,2009).

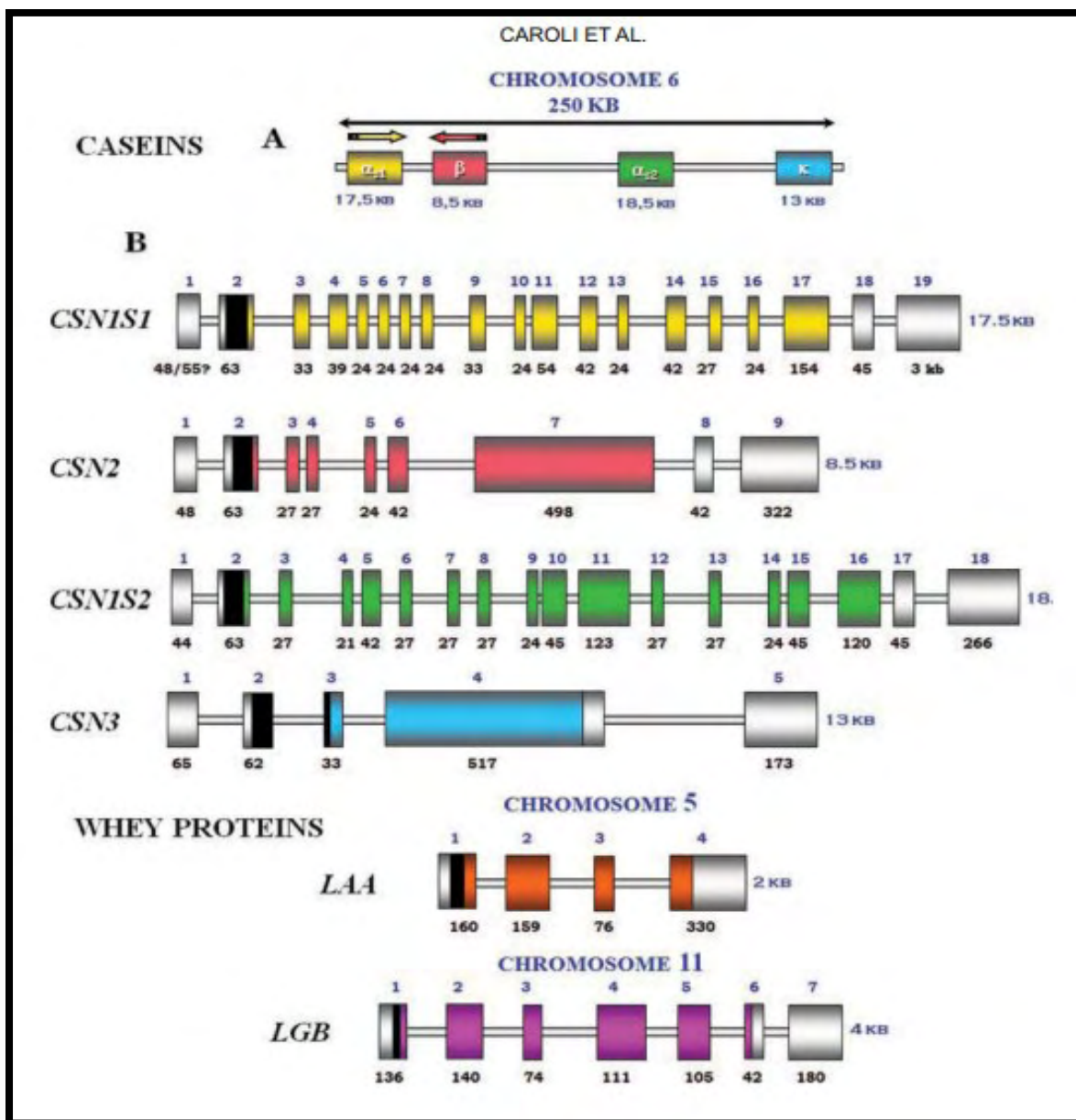
Οι επιδράσεις που έχουν σχέση με τις λειτουργικές αλλαγές της πρωτεΐνης, με τις ανταλλαγές στο AA γονίδιο, επηρεάζουν τις βιολογικές ιδιότητες της κωδικοποιημένης πρωτεΐνης. Επιπλέον, οι παραλλαγές πρωτεΐνης στο γάλα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών της φυλής (Moazami-Goudarzi et al.,2001, Ceriotti et al,2004), τις μελέτες για τη βιοποικιλότητα (Lien et al,1999, Mahe et al,1999) και επίσης μελέτες εξέλιξης των γονιδίων πρωτεΐνης του γάλακτος (Jann et al,2004, Ibeagha- Awemu et al.,2007).

Η σύνθεση των πρωτεϊνών του γάλακτος ελέγχεται από γονίδια. Ένα τμήμα από το DNA αποτελεί ένα γονίδιο που μεταγράφεται σε αγγελιοφόρο RNA και μεταφράζεται σ'ένα πολυπεπτίδιο. Εφόσον αυτό το πολυπεπτίδιο εξακολουθούν να το τροποποιούν, οδηγείται σε σχηματισμό κάθε μιας από τις πρωτεΐνες του γάλακτος (Mantis,1993).

Οι Aschaffenburg και Drewry (1955) διαπίστωσαν την ύπαρξη του γενετικού πολυμορφισμού πρωτεϊνών στο γάλα και συγκεκριμένα στη β-λακτοσφαιρίνη.

Αυτή τους η ανακάλυψη έδωσε το έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού της β-λακτοσφαιρίνης, αλλά και διερεύνηση της ύπαρξης γενετικού πολυμορφισμού για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες ορού και τις διαφορετικές καζεΐνες. Έτσι άρχισε η μελέτη σε διάφορες φυλές βοοειδών όμως δεν άργησε να υπάρξει ενδιαφέρον διεθνώς για την εύρεση των γονιδιακών τόπων, τα οποία έχουν σχέση με τα παραγωγικά χαρακτηριστικά στο γάλα.

Από τότε μέχρι και σήμερα το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε σε μελέτες πάνω στα γονίδια που ελέγχουν την σύνθεση των τεσσάρων καζεϊνών (αs1, αs2, β- CN , K- CN) καθώς και της β-λακτοσφαιρίνης, (Anastasios S. Tsiaras, 2005).



Εικόνα 5. 'Δομική οργάνωση των μονάδων μεταγραφής που κωδικοποιούν τις 6 κύριες πρωτεΐνες γάλακτος. Καζεΐνες: α s1-CN (CSN1S1), β -CN (CSN2), α s2-CN (CSN1S2), και κ -CN (CSN3). Πρωτεΐνες ορού γάλακτος: α -LA (LAA) και β -LG (LGB). Α) Γονιδιοματική οργάνωση της βόειας καζεϊνικής θέσης. Β) Δομή της οργάνωσης των 6 μονάδων μεταγραφής πρωτεϊνών γάλακτος. Ράβδοι αντιπροσωπεύουν τα ιντρόνια. Τα εξώνια απεικονίζονται από μεγάλες, γκρι (5' και 3' αμετάφραστες περιοχές), μαύρο (μέρος του εξωνίου που κωδικοποιεί το σηματοδοτικό πεπτίδιο), και χρωματισμένο (εξώνια και τμήμα των εξωνίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ωρίμανσης) κουτιά. Το μέγεθος των εξωνίων είναι δεδομένο, σε ζεύγη βάσεων, κάτω από κάθε εξώνιο με τον αριθμό του αναγράφεται στην κορυφή. ' (A. M. Caroli et al., 2009)

1.5 Επίδραση των γονιδιακών τύπων των πρωτεϊνών γάλακτος στα παραγωγικά χαρακτηριστικά

Ο γενετικός πολυμορφισμός στο γονιδιακό τόπο της β-λακτοσφαιρίνης ανακαλύφθηκε πριν από 60 χρόνια περίπου (Aschafferbung & Drewry.,1955), ωστόσο η πλήρης αμινοξική αλληλουχία των πρωτεϊνών του γάλακτος που παράγονται παρουσιάστηκε από τους Grosclaude et al.,1972 & Mercier et al.,1973. Ακολούθησαν έπειτα πολλές μελέτες για τον προσδιορισμό της επίδρασης των γενοτύπων της κ-καζεΐνης και της β-λακτοσφαιρίνης σε χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την ποιότητα στο γάλα και την γαλακτοπαραγωγή. Ωστόσο τα αποτελέσματα για την επίδραση των γενοτύπων της κ-καζεΐνης και β-λακτογλοβουλίνης υπήρξαν αντικρουόμενα. Παρά το γεγονός ότι είχε θετική επίδραση το αλληλόμορφο Β της κ-καζεΐνης στη παραγωγή πρωτεΐνης (Ng-Kwai-Hang et al.,1984, Van Eenennaam & Medrano,1991) και στη περιεκτικότητα πρωτεΐνης στο γάλα (Gonyonet al.,1987, Ng-Kwai-Hang et al.,1990, Van Eenennaam & Medrano,1991, Bovenhuis et al.,1992, Vander Berg et al.,1992), τις πιο πολλές φορές τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά σε ότι αφορά στις σχέσεις μεταξύ του πολυμορφισμού της κ-καζεΐνης και των άλλων χαρακτηριστικών της γαλακτοπαραγωγής.

Τα αποτελέσματα των μελετών σχετικά με την επίδραση των γενοτύπων της β-λακτοσφαιρίνης σε γαλακτοκομικά χαρακτηριστικά είναι περισσότερο ομοιόμορφα. Ο γενότυπος ΑΑ της β-λακτοσφαιρίνης φαίνεται να έχει ευνοϊκή επίδραση στην παραγωγή πρωτεΐνης (Ng-Kwai-Hang et al.,1984, Aleandri et al.,1990, Bovenhuis et al.,1992), ενώ αναφέρθηκε και η θετική επίδραση του ΒΒ γενότυπου στη λιποπεριεκτικότητα (McLean et al.,1984, Ng-Kwai-Hang et al.,1984, 1986, Aleandri et al.,1990, Borenhuis et al.,1992, Hill, 1993).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των γενοτυπικών επιδράσεων της β-λακτοσφαιρίνης στη γαλακτοπαραγωγή, μια ομάδα επιστημονικών δημοσιεύσεων δεν αναφέρει καμία επίδραση (Mc Lean et al.,1984, Ng-Kwai-Hang et al.,1984, Lin et al.,1986 & 1989, Van Eenennaam & Medrano,1991, Lunder et al.,1997, Ojala et al.,1997). Υπάρχει και μια ομάδα ερευνητών που αναφέρουν την θετική επίδραση του ΑΑ γενοτύπου (Aleandri et al.,1990, Borenhuis et al.,1992), του ΑΒ γενοτύπου (Purkova 1980, Car dak.,2005) και τη σύνδεση του ΒΒ γενοτύπου με το ύψος της γαλακτοπαραγωγής (Jairam & Nair,1983, Badola et al.,2003).

Σε αντίθεση με τις πολυάριθμες μελέτες για τις επιδράσεις γενετικού πολυμορφισμού της πρωτεΐνης γάλακτος στα χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγής, μόνο μερικές αναφορές έχουν δημοσιευθεί όσον αφορά τη σχέση τους με την αναπαραγωγική δραστηριότητα. Οι Hargrove et al.,1980 Ronda & Perez- Bcato 1983 δεν βρήκαν σημαντικές συσχετίσεις, ενώ οι Jairam & Nair,1983 ανέφεραν ότι οι μοσχίδες με γενότυπο AB της β-λακτοσφαιρίνης σε συνδυασμό με AB γενότυπο της κ-καζεΐνης είχαν μικρότερη ηλικία στον 1^ο τοκετό, σχετικά με άλλους συνδυασμούς. Ακόμη Lin et al.,1987 βρήκαν ότι οι αγελάδες με γενότυπο AB της β-λακτοσφαιρίνης είχαν μεγαλύτερη διάρκεια κύησης σε σύγκριση με τις αγελάδες AA και BB γενοτύπους.

Η γενοτυπική επίδραση των πρωτεϊνών στο γάλα κατά το διάστημα μεταξύ τοκετού και της πρώτης σπερματέγχυσης ανά σύλληψη αναφέρθηκε από του Ng-Kwai-Hang et al.(1990), αλλά χωρίς καμία σημαντικά στατιστική συσχέτιση. Καμία μελέτη δεν έχει εντοπιστεί που να ερευνά τις επιδράσεις του πολυμορφισμού των γενοτύπων της κ-καζεΐνης και β-λακτοσφαιρίνης ταυτόχρονα σε παραγωγικά και αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής ή κάποιου άλλου είδους ζώου.

Τα αποτελέσματα παραμένουν συγκεχυμένα πιθανώς εξαιτίας της διατροφής, των συστημάτων εκτροφής, των διαφορετικών φυλών, στους αριθμούς των ζώων που πάρθηκαν τα δείγματα. Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθούν οι επιδράσεις των γενοτύπων της κ-καζεΐνης σε γαλακτοπαραγωγικά και αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά σε μια μεγάλη κτηνοτροφική εκμετάλλευση αγελάδων φυλής Holstein, (Boscós,2004). Για οικονομικούς λόγους οι πιο πολλές από τις προσπάθειες επικεντρώνονται στις επιπτώσεις της επεξεργασίας του γάλακτος κυρίως στη τυροκομία.

1.6 Επίδραση της Καζεΐνης στην τυροκόμηση

Η πήξη του γάλακτος γίνεται με πυτιά και με οξέα

A) Πήξη με πυτιά:

Η πυτιά βρίσκεται σε υγρή μορφή και αρχίζει η προετοιμασία, έτσι προστίθεται στο γάλα σε ποσότητα αντίστοιχη της δύναμης που έχει να πήξει. Συνήθως η ποσότητα είναι 1,0-3,0g πυτιάς, πηκτική δύναμη 1:100.000/100 λίτρα γάλα σε 30-35° C και με χρόνο ολοκλήρωσης 30-60min.

Στο μηχανισμό πήξεως οι καζεΐνες είναι στο γάλα με την μορφή μυκηλίων αποτελούμενες από πολυμοριακά συμπλέγματα των αs, των β και κ-καζεϊνών. Στην επιφάνεια του μυκηλίου λόγω του σφαιρικού σχήματος τους βρίσκονται υδρόφιλες γλυκοπεπτιδικές αλυσίδες της κ-καζεΐνης. Κατά αυτό το τρόπο διατηρούνται τα μυκήλια σε φάση κολλοειδούς διασποράς. Θεωρητικά η πήξη του γάλακτος με την δράση της πυτιάς ορίζεται σε δύο φάσεις, (Kosikowski & Mistry, 1997, Scott, 1986).

- **Πρώτη φάση είναι:** η επίδραση της ρεννίνης που έχει την ικανότητα να διασπά την κ-καζεΐνη στη θέση 105(Phe) & 106(Met) όταν παράγεται μη-διαλυτή παρα-κ-καζεΐνη και ένα διαλυτό γλυκομακροπεπτίδιο.
- **Δεύτερη φάση είναι:** η φάση στη οποία παρατηρείται η πήξη του γάλακτος όμως για να επιτύχθει αυτό χρειάζεται ευνοϊκή θερμοκρασία και επαρκή ιόντα ασβεστίου. Υπάρχουν μη-σταθεροποιημένα μυκήλια τα οποία σταθεροποιούνται με ιόντα Ca και δημιουργούν πρωτεϊνικό πλέγμα και παγιδεύονται τα άλλα συστατικά που υπάρχουν στο γάλα, δίνοντας έτσι την μορφή πήγματος στο γάλα.

Για το χρονικό διάστημα μέχρι να γίνει η πήξη λόγο έχουν και άλλοι παράγοντες όπως:

- **Η θερμοκρασία του γάλακτος:**
Η κατάλληλη θερμοκρασία για την πήξη του γάλακτος είναι οι 30-35°C. Στους 40°C ή στους 25°C, το χρονικό διάστημα για την επίτευξη της πήξης είναι μεγαλύτερο, αλλά και ο σχηματισμός συνεκτικού πήγματος.

➤ To pH:

Κατάλληλο pH για την γρήγορη πήξη θεωρείται το pH <5,8. Όμως, στην πράξη επιτυγχάνεται σε pH 6,2-6,5.

➤ Περιεκτικότητα σε ιόντα Ca:

Έχει διαπιστωθεί ότι μία περιεκτικότητα 0,07% CaCl₂, επιταχύνει την πήξη.

➤ Η αναλογία λίπους προς Στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (ΣΥΑΛ):

Όταν το γάλα περιέχει αρκετό λίπος, το πήγμα που δημιουργείται είναι μαλακό.

➤ Μετουσίωση πρωτεϊνών ορού:

Με την αύξηση της θερμοκρασία του γάλακτος, οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες του ορού αντιδρούν με την κ-καζεΐνη και έτσι εμποδίζουν τη διάσπαση της από τη ρεννίνη. Υπάρχει καθυστέρηση και μη-ολοκλήρωση της πήξης

➤ Πρωτεόλυση της κ-καζεΐνης:

Πέρα από την Phe105 και Met106 διασπάται η κ-καζεΐνη ή αντιδράει με τα αμινοξέα επηρεάζοντας τη πήξη

➤ Άλλοι παράγοντες:

Τέλος, επιβράδυνση ή αναστολή της πήξης προκαλείται από διάφορους παράγοντες, όπως από την υγεία του ζώου, την υγιεινή του μαστού, τη γαλακτική περίοδο, την εποχή (Mantis,2000).

B) Πήξη με οξέα:

Σε μερικά τυριά η πήξη του γάλακτος γίνεται με οργανικά οξέα (π.χ τρυγικό, οξικό, γαλακτικό) και σε κάποια άλλα με αυξημένη δοσολογία οξυγαλακτικής καλλιέργειας η οποία περιέχει μεγάλη ποσότητα γαλακτικού οξέος (Mantis.,2000).

B. Σκοπός της παρούσας Μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση των επιπέδων πολυμορφισμού της καζεΐνης από ελληνικές αγελάδες της φυλής Holstein. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί του εξωνίου 4 της κ-καζεΐνης (292 ζεύγη βάσεων από το σύνολο των 517 ζεύγη βάσεων του συγκεκριμένου εξωνίου).

Απώτερος στόχος της παρούσας έρευνας ήταν να μελετηθούν οι επιδράσεις των γενοτύπων της κ-καζεΐνης σε γαλακτοπαραγωγικά και αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά αγελάδων της φυλής Holstein, στη συγκεκριμένη κτηνοτροφική μονάδα.

Γ. Υλικά και μεθόδοι

Αντιδραστήρια:

1. ACRYLAMIDE
2. AGAROSE
3. CHLOROFORM
4. NaCl
5. SDS
6. dNTP'S
7. ETHIDIUM BROMIDE
8. GLYCEROL
9. FORMALDEHYDE
10. $MgCl_2$
11. BUFFER
12. PHENOL
13. LADDER
14. TETRAMETHYLENEDIAMINE
15. METHYLENEBISACRYLAMIDE
16. APS
17. ACETIC ACID
18. $AgNO_3$ (Νιτρικός άργυρος)
19. NaOH (Καυστικό νάτριο)
20. $NaBH_4$
21. Primers

Πολυμεράσες DNA

Taq (Bioline)

2.1 Περιγραφή Μελέτης

Στη συγκεκριμένη μελέτη, μας ενδιέφερε ο εντοπισμός των επιπέδων πολυμορφισμού της κ-καζεΐνης στις ελληνικές αγελάδες της φυλής Holstein. Για το σκοπό αυτό επεξεργάστηκαν 94 δείγματα αίματος από διαφορετικά ζώα της φυλής συγκεκριμένης κτηνοτροφικής μονάδας της Λάρισας. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση DNA από τα δείγματα αίματος, ενισχύθηκε συγκεκριμένο τμήμα του εξωνίου 4 της κ-καζεΐνης και πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος των πολυμορφισμών του συγκεκριμένου τμήματος με την μέθοδο SSCP. Τα δείγματα, που εμφάνισαν διαφορετικό πρότυπο, αλληλουχήθηκαν και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής με σκοπό τον εντοπισμό των πολυμορφισμών του εξωνίου 4 της κ-καζεΐνης.

2.1.1 Δειγματοληψία:

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 94 δείγματα της φυλής Holstein που είναι κυρίως γαλακτοπαραγωγής από συγκεκριμένη κτηνοτροφική μονάδα της Λάρισας. Τα δείγματα που συλλέχτηκαν ήταν αίματα και συντηρήθηκαν στους 4°C στο Εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής & Συγκριτικής Βιολογίας, μέχρι την διαδικασία απομόνωσης του DNA.

2.2.1 Απομόνωση του DNA

Ο εντοπισμός του πολυμορφισμού των πρωτεϊνών της κ-καζεΐνης έγινε αρχικά με την απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Budowle (1990).

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση του DNA είναι τα εξής:

- Ξεπάγωμα αίματος σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 1 ml δείγματος σε eppendorfs των 2 ml
- Προσθήκη 1 ml διαλύματος 1x SSC και ανάδευση σε vortex
- Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13 000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα
- Προσθήκη 1 ml από 1x SSC
- Ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13 000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου

- Απομάκρυνση του υπερκείμενου, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα
- Προσθήκη 0,6 ml οξικού νατρίου (CH_3COONa)
25 μL SDS 10%
15 μL διαλύματος πρωτεΐνης K (10 mg / ml)
- Επώαση στους 55° C για 2 ώρες υπό ανάδευση
- Προσθήκη 1 ml φαινόλης (PhOH) ανάδευση σε vortex
- Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 13 000 στροφές στους 4° C
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorfs
- Προσθήκη 1 ml χλωροφόρμιο / ισομυλικής αλκοόλης (24 : 1) και ανάδευση σε vortex
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13 000 στροφές στους 4° C
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorfs
- Προσθήκη 1 ml ισοπροπανόλης
- Επώαση για 20 λεπτά (το πιο λίγο) στους -20° C
- Φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στις 13 000 στροφές στους 4° C για κατακρύμνιση του DNA
- Αφαίρεση του υπερκείμενου, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα
- Προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70%
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13 000 στροφές στους 4° C
- Αφαίρεση του υπερκείμενου, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα
- Επώαση στους 50° C μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη
- προσθήκη 100 μL dd H_2O στο DNA
- Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20° C

Το οξικό νάτριο προστέθηκε μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, για την λύση των κυττάρων και τον έλεγχο της ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης του κυττάρου για να διασπάει τις κυτταρικές μεμβράνες και για ομογενοποίηση του ιστού.

Το SDS χρησιμοποιείται επειδή είναι ιονικό απορρυπαντικό και συμβάλλει στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης, παρέχοντας προστασία στο DNA από τις νουκλεάσες, και αποδιατάσει τις πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνωση K προστίθεται διότι αποικοδομεί τις πρωτεΐνες.

Η φαινόλη συμμετέχει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα της φαινόλης έχει pH>7 για να διατηρείται κατανεμημένο το DNA στην επάνω υδατινή φάση.

Το χλωροφόρμιο είναι υπεύθυνο για τον διαχωρισμό των φάσεων λόγω της μεγάλης του πυκνότητας, καθώς είναι υπεύθυνο για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών και την αφαίρεση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατινή φάση.

Η κατακρήμνιση του DNA πραγματοποιείται στο τελευταίο στάδιο με ισοπροπανόλη και γίνεται έκπλυσή του με αιθανόλη 70%. διότι είναι αδιάλυτα στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες.

2.2.2 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα

Μετά την απομόνωση του DNA γίνεται ένας ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος είτε με φωτομέτρηση είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% w/v.

2.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση του συγκεκριμένου τμήματος της κ-καζεΐνης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1

Πίνακας 1. Εκκινητές ενίσχυσης τμήματος του εξωνίου 4 της κ-καζεΐνης

Εκκινητής	Αλληλουχία
CSN3_ex4b.fw2	GCCAAGTCCTGCCAAGC
CSN3_ex4b.rv2	CTGCGTTGTCTTCTTTGATGT

Πίνακας 2. Συστατικά αντίδρασης PCR (Εικόνα 6)

Εκμαγείο DNA	2 μl
dNTPs (10mM each)	1 μl
MgCl₂ (50mM)	2 μl
Buffer 10x	5 μl
Εκκινητής Fw	1 μl
Εκκινητής Rv	1 μl
Taq DNA Polymerase	0,2 μl
ddH₂O	38 μl
Συνολικός όγκος	50 μl

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου ήταν:

Step 1^ο → Αρχική αποδιάταξη: 95° C για 4 min

Step 2^ο → Αποδιάταξη: 95° C για 40 sec

Υβριδοποίηση: 52° C για 40 sec

Επιμήκυνση: 72° C για 40 sec

} x 35 κύκλοι

Step 3^ο → Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

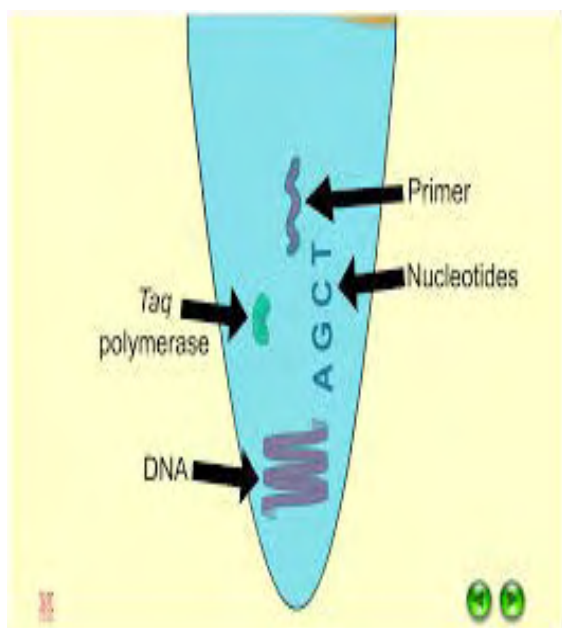
Συγκεκριμένα σε κάθε βήμα συμβαίνουν τα εξής:

1. Η θέρμανση στην θερμοκρασία των 95°C συμβάλλει στην αρχική αποδιάταξη του DNA και στη διάσπαση ειδικών πρωτεϊνικών μορίων, των ιστονών με τις οποίες συνδέονται τα μόρια του DNA και οι οποίες διατηρούν τα μόρια DNA στη συμπαγή τους μορφή. Το στάδιο αυτό

είναι πολύ σημαντικό για να πετύχει η αντίδραση της PCR διότι από την ολική αποδιάταξη του DNA στόχου θα εξαρτηθεί η συγκέντρωση του προϊόντος που παράγεται σε κάθε κύκλο.

2. Με τη θέρμανση στους 95°C για 45 sec επιτυγχάνεται το σπάσιμο των διπλών και τριπλών δεσμών μεταξύ των δίκλωνων αλυσίδων των μορίων DNA και η μετατροπή τους από τη δίκλωνη στη μονόκλωνη μορφή. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία της αρχικής αποδιάταξης όσο και της αποδιάταξης είναι υψηλή και θα πρέπει να μη διαρκεί περισσότερο χρόνο γιατί ελαττώνεται η ενεργότητα του ενζύμου.
3. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας η οποία μπορεί να κυμαίνεται από 50°C έως 65°C. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται πρόσδεση- υβριδισμός των εκκινητών (primers) με τις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA (μητρικά μόρια). Αυξάνοντας τη θερμοκρασία σταδιακά αυξάνεται και η ειδικότητα του τελικού προϊόντος με αποτέλεσμα να περιορίζεται η υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων σε μη ειδικές περιοχές.
4. Στη συνέχεια η μικρή άνοδος της θερμοκρασίας στους 72°C και για 30sec εμποδίζει την προσκόλληση επιπλέον εκκινητικών μορίων και επιτρέπει την Taq polymerase να προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο, παρουσία $MgCl_2$ και dNTPs επεκτείνοντας την συμπληρωματική αλυσίδα του μορίου που συντίθεται. Τέλος ακολουθεί τελική επέκταση στους 70-78°C.

Τα βήματα 2-5 της διαδικασίας PCR επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους (Εικόνα 7). Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων κύκλων καθορίζει τη συγκέντρωση του προϊόντος που ενισχύεται καθώς και την απόδοση της PCR η οποία εξαρτάται από τη διατήρηση σταθερών των συνθηκών της. Αν ο αριθμός των κύκλων είναι μεγαλύτερος τότε αυξάνεται ο αριθμός των μη ειδικών προϊόντων ενώ αν ο αριθμός των κύκλων είναι μικρότερος τότε ο αριθμός των παραγόμενων προϊόντων είναι μικρότερος γεγονός που δεν ευνοεί την ανίχνευσή τους σε επόμενο στάδιο.



Εικόνα 6. (photo credit: Plant and Soil

Εικόνα 7. Μηχάνημα PCR

Science eLibrary)

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική. Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μακρομορίων (νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών). Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το ηλεκτρικό φορτίο των μορίων και το μοριακό τους βάρος μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε κατάλληλη πηκτή. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται πηκτές αгарόζης και πολυακρυλαμίδης. Επομένως είναι εύκολος ο διαχωρισμός δύο ή και περισσότερων τμημάτων DNA διαφορετικού μεγέθους. Σύμφωνα με το παρόν πρωτόκολλο χρησιμοποιούνται και τα δύο είδη πηκτών. Σε πρώτη φάση για την ανίχνευση των ενισχυμένων προϊόντων του DNA στόχου που προέκυψε από την αντίδραση της PCR χρησιμοποιείται η πηκτή αгарόζης.

Για την παρασκευή πηκτής αгарόζης 2% χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- Ⓢ 30ml TAE 1X (Tris-Acetic-EDTA).
- Ⓢ 0,6gr αгарόζης
- Ⓢ 2,5μl βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

Ζυγίζουμε και τοποθετούμε 0,6g αгарόζης σε κωνική φιάλη των 100ml αφού έχουμε προσθέσει προηγουμένως 30ml TAE. Το μίγμα αгарόζης - TAE θερμαίνεται κατάλληλα για τη διάλυση της αгарόζης και ακολούθως αφού αφεθεί σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί προσθήκη 2,5 μl βρωμιούχου αιθιδίου, η οποία πραγματοποιείται σε απαγωγό εστία επειδή το τοξικό βρωμιούχο αιθίδιο λόγω και της πτητικότητάς του καθίσταται ακόμη πιο επιβλαβές. Στη συνέχεια γίνεται έκχυση του διαλύματος σε ειδικό πιάτο που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση στο οποίο τοποθετούνται ειδικές χτένες για τη δημιουργία πηγαδιών. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει μέσα στην συσκευή και να σταθεροποιηθεί για 20-30 λεπτά περίπου.

Το TAE είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως για την παρασκευή της πηκτής αгарόζης και για TAE 50X η περιεκτικότητα του κάθε συστατικού είναι:

1.-Tris base 121g

2.-Acetic acid 28,5ml

3.-EDTA 0,5M 50ml

Για TAE 1X buffer χρειάζεται να γίνει ανάμιξη 20ml του 50X TAE με 980ml ddH₂O.

Φόρτωση των Δειγμάτων σε πηκτή Αγαρόζη

Για τη φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε:

Ⓢ 2,5μl loading buffer 6X

Ⓢ 5μl PCR προϊόν

Ⓢ 2μl DNA ladder (100bp)

Το παραπάνω διάλυμα περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης, γλυκερόλη και Tris. Το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι ένα αλογονωμένο παράγωγο της φαινόλης το οποίο έχει την ιδιότητα λόγω φορτίου, να δεσμεύει όξινα μόρια, στην προκειμένη περίπτωση τα μόρια του DNA στόχου. Έτσι, δείγματα που περιέχουν αρκετή ποσότητα DNA μετά την αντίδραση PCR ανιχνεύονται στο πήκτωμα κάτω από UV. Η γλυκερόλη συμβάλλει στην καθίζηση του δείγματος μέσα στα πηγαδάκια του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης, ενώ το Tris είναι ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για τη ρύθμιση του pH του κάθε διαλύματος. Το διάλυμα αυτό περιέχει αλληλουχίες μορίων DNA γνωστού μήκους 100 βάσεων.

Συνήθεις εργαστηριακές συνθήκες για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης είναι η εφαρμογή τάσης των 100Volt σε θερμοκρασία 25°C (Εικόνα 8). Τα δείγματα τρέχουν στο πήκτωμα για χρόνο ίσο μέχρι να διανύσουν τα 2/3 της διαδρομής του πηκτώματος και αφού διανύσουν την πιο πάνω απόσταση ελέγχονται κάτω από ακτίνες UV. Τα δείγματα που δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται στην ανάλυση SSCP.



Εικόνα 8. Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης πηκτής αгарόζης

2.3 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας

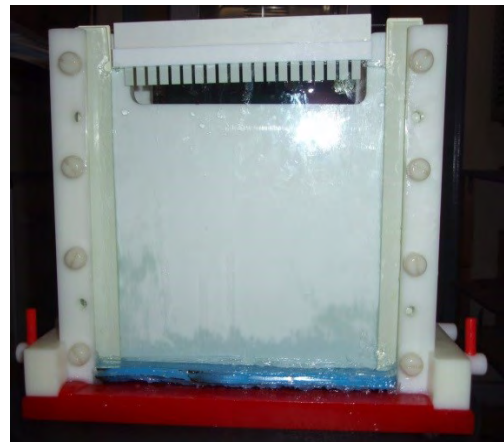
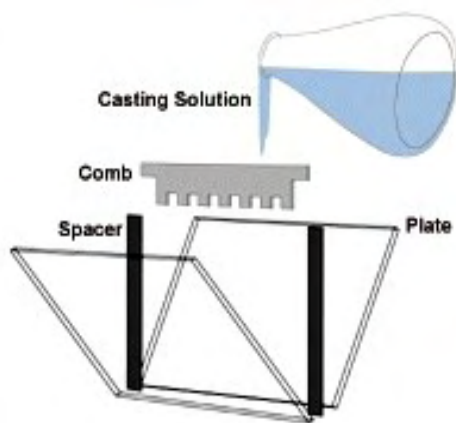
Ανάλογα με το πόσο γρήγορα είναι επιθυμητό να τρέξουν τα δείγματα και κατά πόσο ακριβή αποτελέσματα (ανίχνευση ζωνώσεων) θέλουμε να έχουμε, χρησιμοποιούνται διαφορετικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης με συγκεντρώσεις 6%, 8% και 10%. Όσο πιο μικρό σε μήκος- αριθμό βάσεων- είναι το τμήμα του εξεταζόμενου δείγματος (μονόκλωνο μόριο DNA) για SSCP, τόσο πιο πυκνό θα πρέπει να είναι το πηκτωμα πολυακρυλαμίδης για να επιτευχθεί καλύτερη ανίχνευση των αποτελεσμάτων.

Η ανάλυση SSCP πραγματοποιείται σε 3 στάδια:

- Την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR
- Την ηλεκτροφόρηση σε ακρυλαμίδα
- Την χρώση της για ανάδειξη των αποτελεσμάτων

Για την παρασκευή της πηκτής ακρυλαμίδης ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια (Εικόνα 9):

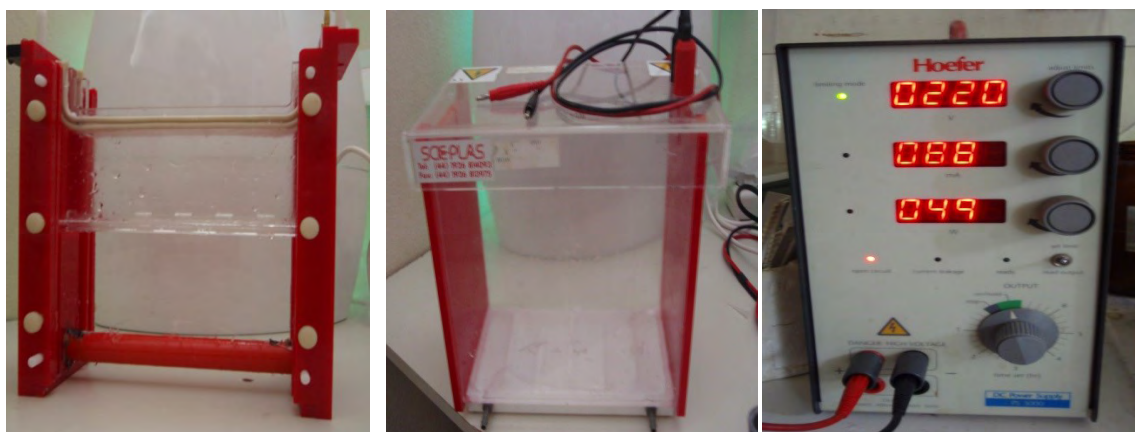
- Προσθήκη 6,2 g Acrylamide
- 0,16 g Methyleneis-acrylsimide
- 5 μ L TBE 10X
- 6 ml γλυκερόλη 50%
- Τοποθέτηση στον αναδευτήρα
- Διήθηση και πλήρωση H₂O μέχρι να φτάσει στα 63 ml
- Προστέθηκε 63 μ L TEMED (Tetramethylenediamine)
- 400 μ L APS 20% (Ammnium Persulfate)
- Καλή ανάδευση
- Τοποθέτηση του διαλύματος ανάμεσα στις δύο πλάκες



Εικόνα 9. Συσκευή παρασκευής πηκτής ακρυλαμίδης

2.4 Αποδιάταξη και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Από τα θετικά δείγματα που προέκυψαν μετά την ανίχνευση σε πηκτή αгарόζης αφαιρέθηκαν 7μL και έγινε προσθήκη 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (denaturation buffer), το οποίο αποδιατάσσει τα δίκλινα μόρια του PCR προϊόντος. Μετά την αποδιάταξη πραγματοποιείται φυγοκέντρηση (spin) για λίγα δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια με εφαρμογή ενός προγράμματος της PCR για 8 λεπτά στους 96°C πραγματοποιείται πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Τα δείγματα προς το τέλος του 7^{ου} λεπτού εξέρχονται της συσκευής PCR και τοποθετούνται αμέσως σε πάγο προκειμένου να μην συμβεί επανασύνδεση των μονόκλωνων μορίων DNA. Ακολούθως τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% με γλυκερόλη για SSCP. Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, τα αποδιατεταγμένα δείγματα ηλεκτροφορούνται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x (Εικόνα 10). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 220 volts σε θερμοκρασία δωματίου, για 20-21 ώρες περίπου.



Εικόνα 10. Συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτής ακρυλαμίδης

Πίνακας 3. Διαλύματα Χρώσης των πηκτών πολυακρυλαμίδη με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

<u>Διάλυμα 1 (400ml)</u>	<u>Διάλυμα 2 (200ml)</u>	<u>Διάλυμα 3 (200ml)</u>
Acetic Acid 0,5ml ddH ₂ O ως τα 400ml	Διάλυμα AgNO ₃ 1g/lt	NaOH 3g NaBH ₄ 0,01g Formaldehyde 1ml ddH ₂ O έως τα 200ml

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης γίνεται εμβάπτιση της πηκτής ακρυλαμίδης σε αναδευόμενο διάλυμα 400ml dd H₂O και 0,5ml οξικού οξέως (Acetic Acid) το οποίο χωρίζεται σε δύο φάσεις και ανάδευση για 3 min. Το διάλυμα απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των πηκτών με αποσταγμένο νερό για 1-2 min.

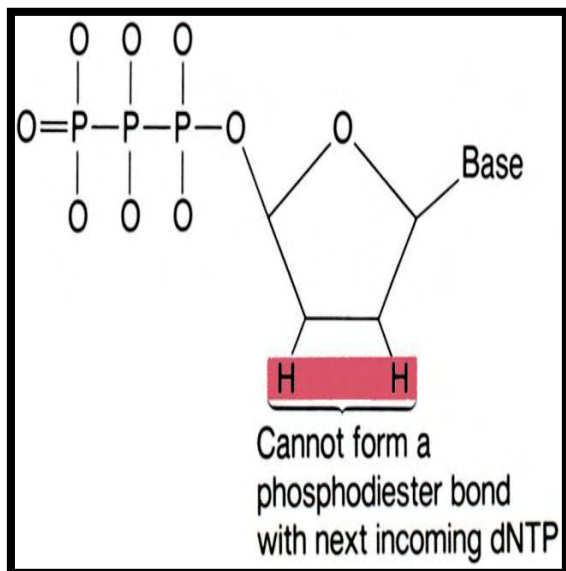
Στο δεύτερο στάδιο προσθέτουμε 200ml νιτρικό άργυρο (AgNO₃) και αναδεύεται για 8min. Ακολούθως πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με αποσταγμένο νερό για 1-2 min η κάθε μία.

Στο τρίτο στάδιο προσθέτουμε το αναδευόμενο διάλυμα που περιέχει 3g καυστικού νατρίου (NaOH), φορμαλδεύδη 1ml και 0,01g βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH₄) πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι να γίνουν ορατές οι ζώνες στις πηκτές. Αφού γίνουν ορατές οι ζώνες στο τζελ, ξεπλένουμε με αποσταγμένο νερό για 1-2 λεπτά.

2.4.1 Αλληλούχηση διαφορετικών προτύπων SSCP

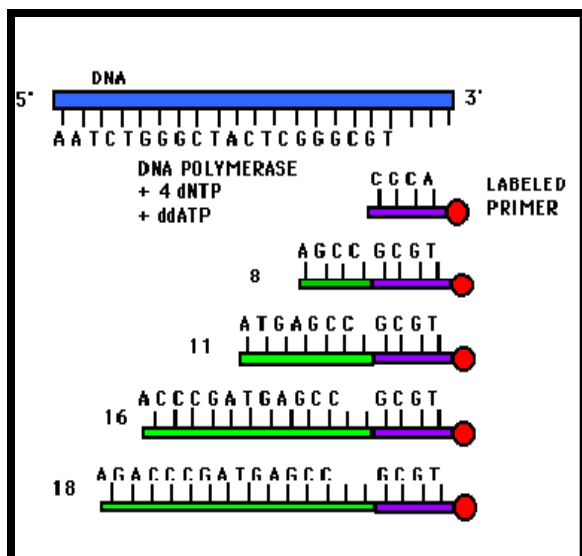
Μετά την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα, συγκρίνονται τα πρότυπα των διαφορετικών ατόμων, ώστε να προσδιοριστούν ποια άτομα φέρουν κοινά πρότυπα και ποια διαφέρουν μεταξύ τους. Μετά την ομαδοποίηση των ατόμων, επιλέγονται 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάθε ομάδας.

Γι' αυτό το λόγο, τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit ώστε να απαλλαχθούν από την παρουσία παραπροϊόντων, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε τις επιθυμητές αλληλουχίες των διαφορετικών προτύπων SSCP που επιλέχθηκαν.



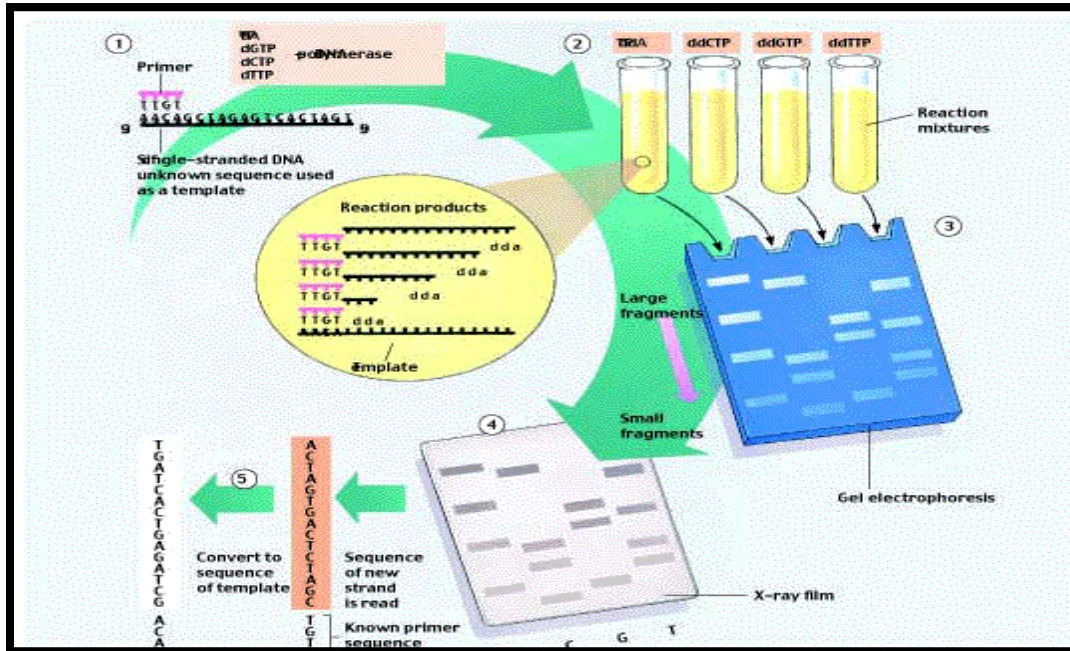
Εικόνα 11:

Δομή ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου.
<http://www.cas.muohio.edu/~wilsonkg/gene2005/manipulation/geneengineering/tools/f14p23.jpg>



Εικόνα 13. :

Απεικόνιση σε PAGE της αλληλούχησης τμήματος DNA με τη μέθοδο Sanger



Εικόνα 14. : Η μέθοδος αλληλούχισης του DNA, βάση της τεχνικής κατά

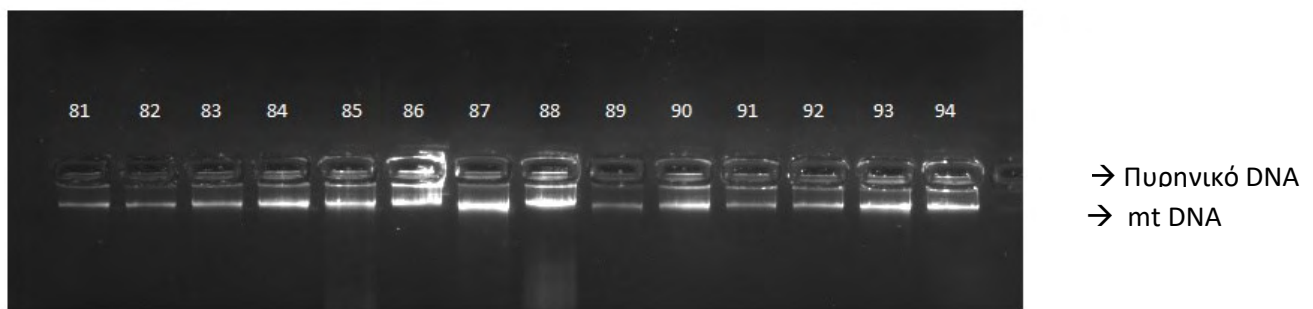
2.4.2 Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχισης

Το πρόγραμμα BioEdit είναι υπεύθυνο για αυτή την ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχισης. Στο γράφημα εμφανίζονται 4 καμπύλες διαφορετικών χρωμάτων, που η κάθε μια καμπύλη αντιστοιχεί σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Το χρώμα που βρίσκεται στη κορυφή της καμπύλης μπορεί να μας κατευθύνει για πιο νουκλεοτίδιο ψάχνουμε. Η αλληλούχιση πραγματοποιείται και για τις δύο αλυσίδες όμως με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μία. Στη συνέχεια οι αλληλουχίες που έχουν προκύψει ερευνούνται με συστήματα προγραμμάτων βιοπληροφορικής (ClustalX), για τυχόν λάθη που προέκυψαν κατά την διαδικασία αυτή (Thompson et al.,1997). Αφού τελειώσουμε με τα τυχόν λάθη έχουμε την πλήρη αλληλουχία του τμήματος που μας ενδιαφέρει και ενισχύσαμε.

Γ. Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση DNA

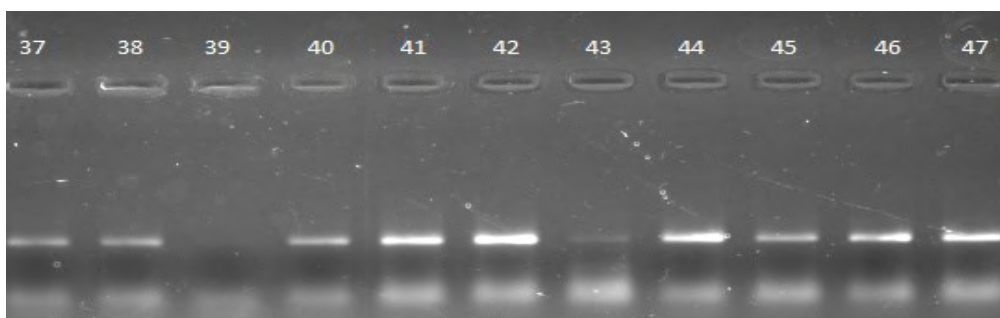
Η απομόνωση DNA παρείχε υψηλής ποιότητας DNA, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200ng/μl και τιμές A^{260}/A^{280} κοντά στο 2. Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αгарόζης 1% εμφάνισε 2 διακριτές ζώνες: η μια ζώνη βρίσκεται ψηλότερα και είναι το πυρηνικό DNA, το οποίο είναι μεγάλου μεγέθους και εμφανίζεται περίπου μέσα στο πηγάδι της πηκτής, και η δεύτερη ζώνη, εμφανίζεται χαμηλότερα και είναι το μιτοχονδριακό DNA (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση μιτοχονδριακού DNA

3.2 PCR:

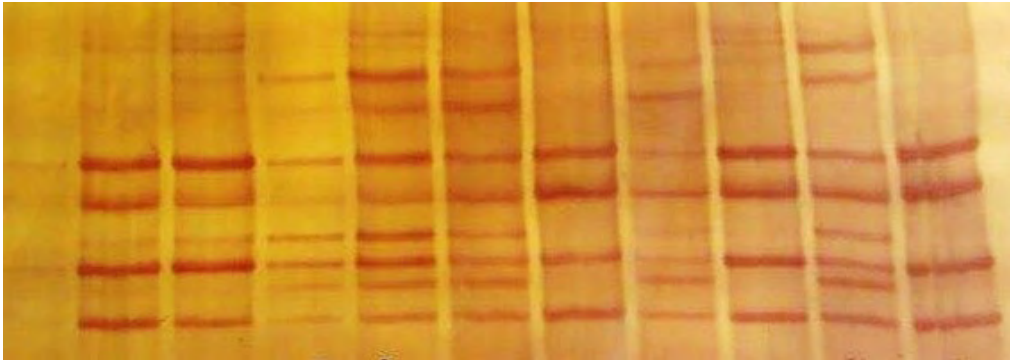
Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών ενισχύθηκε το τμήμα των εξωνίου 4. Για την επαλήθευση της επιτυχίας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR παρουσία ενός μάρτυρα τμημάτων γνωστού μοριακού βάρους (ladder), για να υπολογιστεί το μήκος του τμήματος που ενισχύθηκε. Με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο, τα τμήματα που ενισχύθηκαν είχαν μήκος περίπου 290 ζευγών βάσεων. (Εικόνα 15)



Εικόνα 15. : ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

3.3 SSCP:

Τα αποδιαταγμένα δείγματα των προϊόντων PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδα 10% σε θερμοκρασία δωματίου για 20-21 ώρες. Η εμφάνιση των ζωνών μετά το τέλος της διαδικασίας αποκάλυψε 6 διαφορετικά πρότυπα (Εικόνα 16). Η ομαδοποίηση των συγκεκριμένων προτύπων στο σύνολο των δειγμάτων παρουσιάζεται στον πίνακα .



Εικόνα 16. Ενδεικτικά πρότυπα ανάλυσης SSCP

3.4 Κατανομή προτύπων ανάλυσης SSCP στο σύνολο των δειγμάτων

Πίνακας 1.: Ομαδοποίηση των 94 εξεταζόμενων ατόμων στα 6 διαφορετικά πρότυπα

πρότυπο 1 (2 άτομα)	92,94
πρότυπο 2 (5 άτομα)	1,5,6,17,67
πρότυπο 3 (40 άτομα)	7,10,12,13,15,16,20,22,23,24,26,29,32,33,34,35,36,37,38,42,44,46, 47,48, 52,53, 63,68,69,72,76,77,81,82,84,86,87,88,89,90
πρότυπο 1 + 2 (3 άτομα)	45,11,91
πρότυπο 1 + 3 (4 άτομα)	3,4,18,27
πρότυπο 2 + 3 (40 άτομα)	2,6,8,9,14,19,21,28,31,39,40,41,43,49,50,51,54,55,56,57,58,59,60, 61,62, 64,65,66,70,71,73,74,75,78,79,80,83,85,91,93

3.5 Αλληλούχηση

Για μεγαλύτερη σιγουριά στα αποτελέσματα της αλληλούχησης, χρησιμοποιήθηκαν δύο εκκινητές. Τα δύο χρωματογραφήματα που πάρθηκαν για το κάθε ένα δείγμα διαφορετικά αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το πρόγραμμα ClustalX όπου και είχαμε τα τελικά αποτελέσματα για την αλληλούχηση του κάθε δείγματος. Το μέγεθος του τμήματος που προέκυψε για όλα τα δείγματα, μετά την αλληλούχηση, ήταν 292bp. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν αντιστοιχούν στα 6 διαφορετικά πρότυπα και προέρχονται από τρία διαφορετικά αλληλόμορφα με τις ακόλουθες αλληλουχίες:

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
allele_1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCCAAAGTCCTGCCAAGCCCAGCCAACTACCATGGCACGTACCCACACCCACATTTATCATTATGGCCATTCCACCAAA
allele_2  .....
allele_3  .....

      90     100     110     120     130     140     150     160
allele_1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GAAAAATCAGGATAAAACAGAAATCCCTACCATCAATACCATTGCTAGTGGTGAGCCTACAAGTACACCTACCACCGAAG
allele_2  .....T....
allele_3  .....

     170     180     190     200     210     220     230     240
allele_1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CAGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAAGATTCTCCAGAAGTTATTGAGGGCCACCTGAGATCAACACAGTCCAAGTT
allele_2  .....C.....A.....
allele_3  .....A.....

     250     260     270     280     290
allele_1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACTTCAACTGCAGTCTAAAACTCTAAGGAGACATCAAAGAAGACAACGCAG
allele_2  .....G.....T.....
allele_3  .....
```

Τα πρότυπα 1,2,3 αντιστοιχούν σε αλληλουχίες ομοζυγωτικών ατόμων που προέκυψαν μετά την αλληλούχηση, ενώ τα πρότυπα 1+2, 1+3, 2+3 αντιστοιχούν σε αλληλουχίες ετεροζυγωτικών ατόμων που προκύπτουν από τις τρεις ομόζυγες αλληλουχίες. Τα ετεροζυγωτικά άτομα, στο πρόγραμμα που εκτελεί ομοπαράθεση, διακρίνονται από τα ομοζυγωτικά επειδή στην νουκλεοτιδική αλληλουχία οι βάσεις που δεν διαβάζονται ευδιάκριτα [εμφανίζονται στο χρωματογράφημα με δύο κορυφές (peak)] και συμβολίζονται με N.

Δ. Συζήτηση

Η επιλογή των κατάλληλων αγελάδων για αναπαραγωγή, γίνεται κυρίως με βάση ποσοτικούς παράγοντες των προγόνων τους, όπως η απόδοση τους σε γάλα, λίπος και πρωτεΐνη γάλακτος. Τα χαρακτηριστικά αυτά, επηρεάζονται από πολλά γονίδια, γι' αυτό και είναι δύσκολη η γενετική βελτίωση των χαρακτηριστικών αυτών. Κάθε γονίδιο των προγόνων επιδρά διαφορετικά σε αυτά. Παράλληλα, επηρεάζουν και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Η γνώση όσο το δυνατόν περισσότερων γενετικών παραμέτρων, όπως η κληρονομικότητα, συνεισφέρει στη γενετική πρόοδο και την αποτελεσματικότητα ως προς την επιλογή του κατάλληλου ζώου και την βελτίωση των χαρακτηριστικών του γάλακτος. Η παρατήρηση της βελτιωμένης, δηλαδή της μεγαλύτερης παραγωγής γάλακτος, αλλά και των χαρακτηριστικών του, διαπιστώνεται πάντα στους απογόνους (Vohra et al., 2006)

Η καζεΐνη η οποία αποτελεί το 80% των πρωτεϊνών του γάλακτος είναι γνωστή για το ρόλο της στην ποιότητα και στην περιεκτικότητα του γάλακτος (Scheepers et al., 2010, Patel et al., 2007). Σχηματίζεται από τους μαστικούς αδένες των αγελάδων (Azevedo et al., 2008) και είναι πηγή μεταλλικών στοιχείων και αμινοξέων για τα βοειδή. Παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη θρόμβωση των πρωτεϊνών και στην πήξη του γάλακτος (Patel et al., 2007).

Η κ-καζεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο CSN3 (Hayes et al., 1993). Διάφορες μελέτες συσχετίζουν τους πολυμορφισμούς της κ-καζεΐνης με τον σχηματισμό της λακτόζης, την περιεκτικότητα του γάλακτος και τις τεχνολογικές του ιδιότητες, όπως απόδοση σε γάλα και σε τυρί (Stojčević-Maletić et al., 2012, Hallen et al., 2008, Alipanah et al., 2005, Kastolina et al., 2004, Denisenko & K alashnikova, 2004, Konovalova et al., 2004, Celik., 2003), παίζοντας ρόλο στην δομή και το σχηματισμό των καζεϊνικών μικκυλίων (Farrell, et al., 1996). Γενικότερα, ο πολυμορφισμός των πρωτεϊνών παίζει ρόλο στο γενετικό διαχωρισμό και χαρακτηρισμό των φυλών των βοειδών. (Golijow et al., 1996. Kemenes et al., 1999, Caroli et al. 2004, De Marchi et al., 2008).

Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν να ταυτοποιηθούν οι πολυμορφισμοί της κ-καζεΐνης δειγμάτων αίματος από αγελάδες της φυλής Holstein. Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκε DNA από αίματα 94 αγελάδων, Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA (Budowle., 1990), από τα δείγματα αίματος, ενισχύθηκε το συγκεκριμένο τμήμα του εξωνίου 4 της κ-καζεΐνης και

πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος των πολυμορφισμών του συγκεκριμένου τμήματος με την μέθοδο SSCP. Τα δείγματα, που εμφάνισαν διαφορετικό πρότυπο, στάλθηκαν για αλληλούχιση (μέθοδος Sanger et al.,1977) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών του εξωνίου 4 της κ-καζεΐνης

Έτσι, από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το μέγεθος του τμήματος για όλα τα δείγματα, μετά την αλληλούχιση, ήταν 292bp. Επίσης, τα δείγματα από τις 94 αγελάδες της φυλής Holstein χαρακτηρίζονται από 6 διαφορετικούς γενότυπους και 3 διαφορετικά αλληλόμορφα. Οι 3 γενότυποι αντιπροσωπεύουν ομόζυγες αγελάδες, ενώ οι άλλοι τρεις ετερόζυγες. Αναλυτικότερα, 40 αγελάδες παρουσίασαν γενότυπο AA, 5BB, 2EE, και 40AB, 4AE και άλλες 3BE. Παρατηρήθηκε ότι το A αλληλόμορφο ήταν το πιο συχνά απαντώμενο, ακολουθεί το B και έπειτα το E. Επίσης, βρέθηκε ότι τα τρία αυτά αλληλόμορφα παρουσίασαν 3 πολυμορφισμούς, τον A, B και E.

Τα αλληλόμορφα A, B είναι τα πιο συχνά απαντώμενα στο γένος Bos (Neelin.,1964, Woychik.,1964). Έχουν βρεθεί και στην φυλή γαλακτοπαραγωγής Vojvodina Holstein-friesian, στη φυλή Brazilian cattle (Azevedo et al.,2008), στη φυλή Holstein στην Κίνα (Golijow et al.,1999), στη φυλή γαλακτοπαραγωγής Bulgarian Rhodopean και Shorthorn Rhodopean. Ο πολυμορφισμός E απαντάται πιο σπάνια και έχει βρεθεί στην φυλή γαλακτοπαραγωγής της Βουλγαρίας (Hristov et al., 2012).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Hristov και των συνεργατών του 2012, οι ετερόζυγες φυλές AB, έχουν συνδεθεί με υψηλότερη παραγωγή γάλακτος και περιεκτικότητα σε λίπος, από ότι οι ομόζυγες BB και λιγότερο από τις ομόζυγες AA. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν την αυξημένη επίδραση του A αλληλόμορφου στην παραγωγή του γάλακτος, αλλά και στην περιεκτικότητά του σε λίπος. Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, τα ομόζυγα AA εμφάνισαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα πρωτεΐνης στο γάλα, ακολουθεί το ετερόζυγο AB και τέλος το BB. Και οι Bovenhuis et al, 1992, υποστηρίζουν με τα αποτελέσματά τους ότι το ομόζυγο BB επιφέρει μειωμένη παραγωγή γάλακτος, σε σύγκριση με τον ετερόζυγο AA.

Γενικότερα, το αλληλόμορφο B έχει συνδεθεί με την θερμοανθεκτικότητα της πρωτεΐνης, μικρότερο χρόνο πήξης, καλύτερη πήξη και σχηματισμό μυκηλίων και τυροκόμησης (Patel et al.,2007). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το γάλα με A πολυμορφισμούς της κ-καζεΐνης

απαιτεί περισσότερο χρόνο για την προσθήκη πυτιάς (Lunden et al, 1997, Kubarsepp et al., 2005) και έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερη απόδοση σε τυρί και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (Braunschweig et al, 2000, Mazeikiene et al., 2005, Molina et al., 2006). Η απόδοση σε τυρί από αγελαδινό με γονότυπο BB ήταν 10% υψηλότερες σε σύγκριση με τις αγελάδες AA (Azevedo et al., 2008, Vidović et al., 2013).

Συμπερασματικά, οι πολυμορφισμοί της κ-καζεΐνης αποτελούν γενετικούς παράγοντες οικονομικής σημασίας, αφού από την επιλογή του κατάλληλου γενότυπου αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, η παραγωγή του γάλακτος γίνεται ελεγχόμενη ως προς ποσοτική και ποιοτική αποτελεσματικότητα.

Βιβλιογραφία

Ελληνική βιβλιογραφία

A. Mantis, 1986. Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των πρωτεϊνών του. Εκδ. Οικ. Αδ. Κυριακίδη, 2η έκδ.

A. Mantis 1993. Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των πρωτεϊνών του. Εκδ. Οικ. Αδ. Κυριακίδη, 3η έκδ.

Ανυφαντάκης Ε. 1994. Χημεία και Ανάλυση του γάλακτος εκδ. Σταματούλης κεφ. Πρωτεΐνες του γάλακτος.

Δρ. Κωνσταντίνος Ζούλφος 2010 Τεχνολογία Γάλακτος

ΕΝΩΣΗ ΦΥΛΗΣ ΧΟΛΣΤΑΙΝ ΕΛΛΑΔΑΣ*, 2010

Papaioannou Georgios, Pelekanou Aggela, Stauros Xatzilois, Elena Grigoriou, Kostas Nikolaou., 2012, ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΑΓΕΛΑΔΟΤΡΟΦΙΑΣ, ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΓΕΩΡΓΙΑΣ, ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, Λευκωσία – Κύπρος

Σπύρος Τσιάπος 2011 Θεσσαλονίκη. Εκτίμηση της πεπτικότητας πρωτεϊνών γάλακτος από διαφορετικές πηγές με in vitro τεχνικές.

Σ. ΚΑΜΙΝΑΡΙΔΗΣ & Γ. ΜΟΑΤΣΟΥ (2009). Γαλακτοκομία. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Αγγλική βιβλιογραφία

A. M. Caroli, S. Chessa, G. J. Erhardt, American Dairy Science Association, 2009. J. Dairy Sci. 92:5335-5352. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and nutrition.

A. M. Tsiaras, G. G. Bargouli, G. Banos, M. Boscov, American Dairy Science Association, 2005. J. Dairy Sci. 88:327-334. Effect of kappa – Casein and Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows.

Aleandri, R., L. Buttazzoni, J. C. Schneider, A. Caroli, and R. Davoli. 1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. J. Dairy Sci. 73:241-255.

Arave CW, Lamb RC and Hines HC, 1971. Blood and milk protein polymorphisms in relation to feed efficiency and production traits of dairy cattle. J. Dairy Sci. 54:106-112.

Aschaffenburg R and Drewry J, 1955. Occurrence of different beta-lactoglobulins in Cow's milk. Nature 176: 218-219.

Aschaffenburg, R. and Drewry, J. (1957). Genetics of the β -lactoglobulins of cows' milk.

Bobenhuis H and Van Arendonk JAM and Korver S, 1992. Associations Between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J Dairy Sci.* 75: 2549-2559.

Bouniol, C., Printz, C. and Mercier, J.C. (1993a). Bovine α S2 -casein D is generated by exon VIII skipping. *Gene* .128.

Bouniol, C., Brignon, G., Mahé, M.-F. and Printz, C. (1993b). Characterization of goat allelic α s2 – caseins A and B: further evidence of the phosphorylation code of caseins. *Protein Seq. Data Anal* . 5.

Caroli, A.M., Chessa, S. and Erhardt, G.J. (2009). Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J. Dairy Sci* . 92 , 5335–5352.

Chamberlain, J.S., et al. 1990. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M.A. Innis, et al., eds.). Academic Press, New York, pp. 272-281.

Dairy Processing Handbook, Tetrapak, Sweden

Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K. and Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule material. *Int. Dairy J.* 18 , 436–457.

Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F. and Swaisgood, H.E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk— sixth revision. *J. Dairy Sci.* 87.

Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F. and Swaisgood, H.E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk— sixth revision. *J. Dairy Sci.* 87 ,

Food-Info.net - Wageningen University, The Netherlands, 1999.

Kerstens, H.H., Crooijmans, R.P., Dibbits, B.W., Vereijken, A., Okimoto, R. and Groenen, M.A. (2011). Structural variation in the chicken genome identified by paired-end next-generation DNA sequencing of reduced representation libraries. *BMC Genomics* 12 , 94

Gilad, Y., Pritchard, J.K. and Thornton, K. (2009). Characterizing natural variation using next-generation sequencing technologies. *Trends Genet* . 25.

Grosclaude, F., Mahé, M.F., Mercier, J.C. and Ribadeau Dumas, B. (1972). Caractérisation des variants génétiques des caséines α s1 et β bovines. *Eur. J. Biochem* . 26.

Grosclaude, F., Mahé, M.F. and Ribadeau Dumas, B. (1973). Structure primaire de la caseine α s1 et de la caseine β -bovine. *Eur. J. Biochem* 40.

- Gonyon, D. S., R. E. Mather, H. C. Hines, G. F. W. Haenlein, C. W. Arave, and S. N. Gaunt. 1987. Associations of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits: Holsteins. *J. Dairy Sci.* 70: 2585-2598.
- Grosclaude, F., M. F. Mahe, J. C. Mercier, and B. Ribadeau-Dumas. 1972. Localisation des substitutions d'acides amines différenciant les variants A et B de la caseïne k bovine. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 63:1154-1166.
- H. M. Farrell, Jr., R. Jimenez – Flores, G. T. Bleck. E. M. Brown, J. E. Butler, L. K. Creamer, C. L. Hollar, K. F. Ng – Kwai – Hang, H. E. Swaisgood, , American Dairy Science Association, 2004. *J. Dairy Sci.* 87: 1641- 1674 . Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk – Sixth Revision.
- Han, S.K., Shin, Y.C. and Byun, H.D. (2000). Biochemical, molecular and physiological characterization of a new b -casein variant detected in Korean cattle. *Anim. Genet.* 31.
- Hill, J. P. 1993. The relationship between β -lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 76:281-286.
- Ibeagha-Awemu, E.M., Prinzenberg, E.-M., Jann, O.C., Lühken, G., Ibeagha, A.E., Zhao, X. and Erhardt, G. (2007). Molecular characterization of bovine CSN1S2B and extensive distribution of zebu specific milk protein alleles in European cattle. *J. Dairy Sci.* 90.
- Jairam, B. T., and P. G. Nair. 1983. Genetic polymorphisms of milk proteins and economic characters in dairy animals. *Indian J. Dairy Sci.* 53:1-8.
- Lin, C. Y., A. J. McAllister, K. F. Ng- Kwai-Hang, J. F. Hayes, T. R. Batra, A. J. Lee, G. L. Roy, J. A. Vesely, J. M. Wauthy, and K. A. Winter. 1987. Association milk protein types with growth and reproductive performance of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 70:29-39.
- Lin, C. Y., A. J. McAllister, K. F. Ng- Kwai-Hang, J. F. Hayes, T. R. Batra, A. J. Lee, G. L. Roy, J. A. Vesely, J. M. Wauthy, and K. A. Winter. 1989. Relationships of milk protein types to lifetime performance. *J. Dairy Sci.* 72:3085-3090.
- Lunder, A., M. Nilsson, and L. Janson. 1997. Market effect of β -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *J. Dairy Sci.* 80:2996-3005.
- Mercier, J.C., Grosclaude, F. and Ribadeau Dumas, B. (1971). Structure primaire de la caséine a s1 bovine. Sequence complete. *Eur. J. Biochem.* 23.
- Lühken, G., Caroli, A., Ibeagha-Awemu, E.M. and Erhardt, G. (2009). Characterization and genetic analysis of bovine as1 -casein I variant. *Anim. Genet.* 40.
- Mariani, P., Summer, A, Anghinetti, A., Senese, C., Di Gregorio, P., Rando, P. and Serventi, P. (1995). Effects of the a s1-CN G allele on the percentage distribution of caseins a s1 -, a S2 -, b -, and k - in Italian Brown cows. *Ind. Latte* 31.

- Mahé, M.F. and Grosclaude, F. (1982). Polymorphisme de la caséine α_2 des bovins: Characterization du variant C du yak (*Bos grunniens*). *Ann. Genet. Sel. Anim* . 14.
- Mahé, M.F., Queval, R., Bado, A., Za fi ndrajaona, P.S. and Grosclaude, F. (1999). Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations. Characterization of variants α_1 -casein H and κ -Cn *J. Genet. Sel. Evol* . 31.
- Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262: 56-65.
- McLean, D. M., E. R. B. Graham, and R. W. Ponzoni. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Res.* 51:531–546.
- Mercier, J. C., G. Brignon, and B. Ribadeau-Dumas. 1973. Structure primaire de la case'ine κ B bovine. Sequence complete. *Eur. J. Biochem.* 35:222–235.
- Nagao, M., Maki, M., Sasaki, R. and Chiba, H. (1984). Isolation and sequence analysis of bovine α_1 – casein cDNA clone. *Agric. Biol. Chem* . 48.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., J. F. Hayes, J. E. Moxley, and H. G. Monardes. 1984. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins milk, fat, and protein production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 67:835–840.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., J. F. Hayes, F. E. Moxley, and H. G. Monardes. 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 69:22–26.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., H. G. Monardes, and J. F. Hayes. 1990a. Association between genetic polymorphism of milk proteins and parameters of reproduction in Holstein cows. Research Report, Department of Animal Science, MacDonald College, McGill University, Montreal, Canada.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., H. G. Monardes, and J. F. Hayes. 1990b. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *J. Dairy Sci.* 73:3414–3420.
- Ng-Kwai-Hang, K.F. and Grosclaude, F. (1992) Genetic polymorphism of milk proteins, in, *Advanced Dairy Chemistry, Vol 1: Proteins*, P.F. Fox ed., Elsevier Applied Science, New York, NY.
- Ng-Kwai-Hang, K.F. and Grosclaude, F. (2003). Genetic polymorphism of milk proteins, in, *Advanced Dairy Chemistry , Volume 1: Proteins , 3rd edn.*, P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Ojala, M., T. R. Famula, and J. F. Medrano. 1997. Effects of milk production genotypes on the variation of milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. *J. Dairy Sci.* 80:1776–1785.
- Paabo, S., R.G. Higuchi, and A.C. Wilson. 1989. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *Journal of biological Chemistry* 264:9709-9712.

Pisano, A., Packer, N.H., Redmond, J.W., Williams, K.L. and Gooley, A.A. (1994). Characterization of O-linked glycosylation motifs in the glycopeptide domain of bovine κ -casein. *Glycobiology* 4.

Pupkova, G. V. 1980. Milk protein polymorphism and milk production of Estonian Black Pied cows. Dairy Sci. Abstr. 45:6620. Ron, M., O. Yoffe, E. Ezra, J. F. Medrano, and J. I. Weller. 1994. Determination of effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holsteins. J. Dairy Sci. 77:1106–1113.

Paul L.H. McSweeney, Patrick F. Fox Editors. Advanced Dairy Chemistry., 2013.

Prinzenberg, E.M., Anglade, P., Ribadeau Dumas, B. and Erhardt, G. (1998). Biochemical characterization of bovine α 1-casein F and genotyping with sequence specific primers. J. Dairy Res. 65.

Prinzenberg, E.-M., Jianlin, H. and Erhardt, G. (2008). Genetic variation in the κ -casein gene (CSN3) of Chinese yak (*Bos grunniens*) and phylogenetic analysis of CSN3 sequences in the genus Bos. J. Dairy Sci. 91.

Rando, A., Di Gregorio, P., Ramunno, L., Mariani, P., Fiorelle, A., Sense, C., Marletta, D. and Masina, P. (1998). Characterization of the CSN1AG allele of the bovine α 1-casein locus by the insertion of a relic of a long interspersed element. J. Dairy Sci. 81.

Rasmussen, L.K., Højrup, P. and Petersen, T.E. (1994). Disulphide arrangement in bovine caseins: localization of intrachain disulphide bridges in monomers of κ - and α 2-casein from bovine milk. J. Dairy Res. 61.

Ribadeau Dumas, B., Brignon, G., Grosclaude, F. and Mercier, J.C. (1972). Structure primaire de la caséine b bovine. Eur. J. Biochem 25.

Ronda, R., and O. Perez-Beato. 1983. Relationship between polymorphic proteins and production and reproductive characters in Redand-White Holstein cows. 2. Milk proteins. Anim. Breed. Abstr. 51:808.

Senocq, D., Mollé, D., Pochet, S., Léonil, J., Dupont, D. and Levieux, D. (2002). A new bovine b-casein genetic variant characterized by a Met93 > Leu93 substitution in the sequence A2. Lait 82.

Stranger, B.E., Forrest, M.S., Dunning, M., Ingle, C.E., Beazley, C., Thorne, N., Redon, R., Bird, C.P., Grassi, A.D., Lee, C., Tyler-Smith, C., Carter, N., Scherer, S.W., Tavaré, S., Deloukas, P., Hurles, M.E. and Dermitzakis, E.T. (2007). Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. Science 315, 848–853.

Stewart, A.F., Willis, I.M. and Mackinlay, A.G. (1984). Nucleotide sequence of bovine α 1- and κ -casein cDNAs. Nucleic Acid Res. 12.

Stewart, A.F., Bonsing, J., Beattie, C.W., Shah, F., Willis, I.M. and Mackinlay, A.G. (1987). Complete nucleotide sequences of bovine α 2- and b-casein cDNAs: Comparisons with related sequences in other species. Mol. Biol. Evol. 4.

Van den Berg, G., J. T. M. Escher, P. J. De Koning, and H. Bovenhuis. 1992. Genetic polymorphism of κ -casein and beta-lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. *Neth. Milk Dairy J.* 46:145–168.

Van Eenennaam, A., and J. F. Medrano. 1991. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74:1730–1742.

Visser, S., van Rooijen, P.J., Schattenkerk, C. and Kerling, K.E.T. (1976). Peptide substrates for chymosin (rennin). Kinetic studies with peptides of different chain length including parts of the sequence 101–112 of bovine κ -casein. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Enzymology.* 438.

Zhang, F., Gu, W., Hurles, M.E. and Lupski, J.R. (2009). Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10 , 451–481.

Zhang, Z.D., Du, J., Lam, H., Abyzov, A., Urban. A.E., Snyder. M. and Gerstein. M. (2011). Identification of genomic indels and structural variations using split reads. *BMC Genomics* 12 , 375.

Ιστοσελίδες

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X64903250?np=y>

[http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/356587B3B92CA4CFC2257B2600386C7E/\\$file/EpiskopisiAgeladotrofia2011.pdf?OpenElement](http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/356587B3B92CA4CFC2257B2600386C7E/$file/EpiskopisiAgeladotrofia2011.pdf?OpenElement)

http://holstein.gr/index.php?q=holstein_breed

<http://www.food-info.net/gr/protein/milk.htm>

<http://www.extension.org/pages/32364/the-polymerase-chain-reaction-pcr#.VYFD8vmqqkr>

<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresis.htm>

<http://invenio.lib.auth.gr/record/131236/files/GRI-2013-10006.pdf?version=1>

