



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της α_{s1} -καζεΐνης του
γάλακτος, σε ελληνική εκτροφή αγελάδων Holstein»

ΚΑΛΥΒΑ ANNA

Λάρισα, 2016

~ 1 ~

Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της α_{s1} -καζεΐνης
του γάλακτος, σε ελληνική εκτροφή αγελάδων
Holstein

Μεταπτυχιακή διατριβή της φοιτήτριας

Καλυβά Άννας

Τριμελής Επιτροπή:

Επιβλέπουσα: Σαραφίδου Θεολογία, *Επικ. Καθ. Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Οργανισμών*

Μέλη συμβουλευτικής

Επιτροπής : Μαμούρης Ζήσης, *Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών*
Μούτου Αικατερίνη, *Αναπλ. Καθ. Βιολογίας Σπονδυλωτών*

Ευχαριστίες

Μέσα από αυτή τη σελίδα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια μου κ. Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο, για την συνεχή παρακολούθηση της, την συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη της κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Σταμάτη Κων/νο, μέλος Ε.ΔΙ.Π. του Εργαστηρίου Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για τις πολύτιμες υποδείξεις του, τη συνεχή καθοδήγηση που συνέβαλε ουσιαστικά για την διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και σε όλους τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, που με βοήθησαν κατά την παραμονή μου σε αυτό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος του πολυμορφισμού του εξωνίου 9, της α_{s1} -καζεΐνης (CSN1S1) του γάλακτος των βοοειδών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε DNA, το οποίο απομονώθηκε από 94 δείγματα αίματος αγελάδων. Τα ζώα ανήκουν στη φυλή Holstein-Friesian η οποία είναι η πιο διαδεδομένη στη χώρα μας, στον τομέα της γαλακτοπαραγωγής.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής του εξωνίου 9 (33bp) με την μέθοδο PCR σε περιοχή που αποτελείται από 154 ζεύγη βάσεων του γονιδίου CSN1S1. Τα προϊόντα PCR αναλύθηκαν με τη μέθοδο SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Τέλος, ακολούθησε αλληλούχιση των PCR προϊόντων, έτσι ώστε να βρεθεί η ακριβής δομή της αλληλουχίας των βάσεων και να αποκαλυφθεί πιθανός πολυμορφισμός του εξωνίου 9 της α_{s1} -καζεΐνης.

Από τα αποτελέσματα της SSCP ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε, αποκαλύφθηκε ένα μόνο πρότυπο. Η αλληλουχία που προέκυψε από το πρότυπο SSCP μεταφράζοντάς την σε αμινοξική αλληλουχία, είναι παρόμοια με αυτή που παρουσιάζουν οι περισσότερες παραλλαγές της α_{s1} -καζεΐνης στη συγκεκριμένη περιοχή του εξωνίου 9, με εξαίρεση την παραλλαγή I.

Summary

The purpose of this study was to check the polymorphism of exon 9 of *as1*-casein (CSN1S1) of bovine milk. For this purpose DNA was isolated from 94 samples of cow blood. These animals belong to the Holstein-Friesian breed, which is the most widespread in our country, in the dairy sector.

PCR amplification of a 154 bp fragment, including exon 9 (33bp) of the CSN1S1 gene were performed. The PCR products were analyzed by the SSCP method (Single Strand Conformation Polymorphism), in a polyacrylamide gel. Finally, sequencing of PCR products was performed, in order to reveal the exact DNA sequence and the possible polymorphism of exon 9 of *as1*-casein.

The results of PCR-SSCP analysis showed one electrophoretic pattern. The sequence of the SSCP pattern, after translation to amino acid sequence, was similar to the majority of the *as1*-casein variants at the specific location of exon 9, except I variant.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
<u>Γενικό μέρος</u>	
<u>Κεφάλαιο 1: Γάλα</u>	11
1.1.Συστατικά.....	11
1.1.1.Συστατικά του γάλακτος.....	11
1.1.2.Παράγοντες που επηρεάζουν τα συστατικά του γάλακτος.....	12
1.1.3.Πρωτεΐνες του γάλακτος.....	12
1.1.4.Καζεΐνες.....	13
1.1.5.Πρωτεΐνες του ορού γάλακτος.....	15
1.1.6.Λακτόζη και άλατα γάλακτος.....	15
1.2.Βοοτροφία στην Ελλάδα.....	17
1.2.1.Η φυλή Holstein-Friesian.....	18
<u>Κεφάλαιο 2: Γενετικός Πολυμορφισμός</u>	19
2.1.Ιστορική ανασκόπηση του γενετικού πολυμορφισμού των πρωτεϊνών του γάλακτος.....	19
2.2.Γενετικός πολυμορφισμός των πρωτεϊνών του γάλακτος.....	20
2.3.Γενετικός πολυμορφισμός των καζεϊνών του γάλακτος.....	20
2.3.1.Η α_{s1} - καζεΐνη.....	21
2.3.2.Η α_{s2} - καζεΐνη.....	22
2.3.3.Η β -καζεΐνη.....	23
2.3.4.Η κ -καζεΐνη.....	24
2.4.Η επίδραση του γενετικού πολυμορφισμού των καζεϊνών σε παραγωγικά χαρακτηριστικά του γάλακτος.....	24
<u>Κεφάλαιο 3: Σκοπός</u>	26

Ειδικό μέρος

<u>Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι</u>	27
4.1.Απομόνωση DNA.....	27
4.2.Ενίσχυση γονιδίου CSN1S1 με PCR.....	28
4.3.Ανάλυση single strand conformation polymorphism (SSCP).....	31
4.4.Καθαρισμός των προϊόντων PCR	32
<u>Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα και συζήτηση</u>	33
5.1.Απομόνωση DNA.....	33
5.2.Ενίσχυση DNA με PCR.....	34
5.3.Ανάλυση SSCP (Single strand conformation polymorphism).....	35
5.4.Αλληλούχηση.....	36
5.5.Συζήτηση.....	38
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	40
Ξένη Βιβλιογραφία.....	40

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες ο γενετικός πολυμορφισμός των πρωτεϊνών του γάλακτος έχει προκαλέσει διεθνές ερευνητικό ενδιαφέρον εξαιτίας της πιθανής συσχέτισής του με ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος. Απόρροια αυτού του ενδιαφέροντος είναι ένα πλήθος επιστημονικών δημοσιεύσεων με αντικείμενο το γενετικό πολυμορφισμό των πρωτεϊνών του γάλακτος των βοοειδών και ιδιαίτερα της κ-καζεΐνης και της β-λακτογλοβουλίνης. Οι μελέτες αυτές αφορούν σε ένα, δύο ή πολλαπλά γονίδια των βοοειδών, με τεχνικές ανίχνευσης στο επίπεδο του DNA που μελετούν την επίδραση των πολυμορφισμών σε διάφορα χαρακτηριστικά όπως:

- το ύψος της γαλακτοπαραγωγής
- τις συγκεντρώσεις των διαφόρων τύπων πρωτεϊνών και του λίπους στο γάλα
- τη σταθερότητα του γάλακτος στη θερμική επεξεργασία
- τις δυνατότητες τυροκόμισης του γάλακτος
- τη δομή του τυροπήγματος μετά από την κατακρήμνιση της καζεΐνης
- τις ομάδες αίματος των βοοειδών
- την επίδραση της αυξητικής ορμόνης
- την ανθεκτικότητα των αγελάδων κατά της μαστίτιδας με κριτήριο τον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο γάλα κ.ά.

Ωστόσο, τα συμπεράσματα των μελετών είναι συχνά αντικρουόμενα και δεν αποσαφηνίζουν τη σχέση του γενετικού πολυμορφισμού της κ-καζεΐνης και της β-λακτογλοβουλίνης με τα παραγωγικά χαρακτηριστικά. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι τα αποτελέσματα δεν είναι συγκρίσιμα επειδή οι μελέτες αφορούν σε διαφορετικά δείγματα πληθυσμού (αριθμός ζώων, φυλή, κ.ά.) και χρησιμοποιούν διαφορετικές μεθόδους δειγματοληψιών και μετρήσεων των παραγωγικών χαρακτηριστικών καθώς και διαφορετικές μεθόδους στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων.

Στην Ελλάδα δεν έχει μελετηθεί ο γενετικός πολυμορφισμός της κ-καζεΐνης και της β-λακτογλοβουλίνης σε πληθυσμούς αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. Η ιδιαιτερότητα του κλίματος αλλά και των συνθηκών εκτροφής των ζώων στον ελληνικό χώρο

δημιουργεί εύλογο ενδιαφέρον για την αξιολόγηση της επίδρασης των γενοτύπων των συγκεκριμένων γονιδίων στις αγελάδες που εκτρέφονται στις συγκεκριμένες συνθήκες. Επίσης, σε διεθνές επίπεδο υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες που περιλαμβάνουν συσχετίσεις των γενοτύπων της κ-καζείνης και της β-λακτογλοβουλίνης με παραμέτρους οικονομικής και βιολογικής σημασίας όπως για παράδειγμα, με την αναπαραγωγική ικανότητα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αξία του γάλακτος ως διατροφικό προϊόν για τον άνθρωπο έχει αναγνωριστεί από αρχαιοτάτων χρόνων. Από το θηλασμό των νεογνών μέχρι και τη δημιουργία γαλακτοκομικών προϊόντων, το γάλα αποτελούσε πάντα μέρος της ανθρώπινης καθημερινότητας και ήταν συνυφασμένο με την ευμάρεια και τη μητρική φροντίδα καθώς αποτελεί πηγή ενέργειας, θρεπτικών ουσιών αλλά και δομικών συστατικών για τον οργανισμό.

Με τη σειρά του, το τυρί, του οποίου η πρώτη δημιουργία χρονολογείται περίπου 8.000 χρόνια πριν λόγω της υψηλής διατροφικής του αξίας και των εξαιρετικών οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι δύο κυριότερες εκδοχές που έχουν αναφερθεί για τη δημιουργία του πρώτου τυριού αφορούν, η πρώτη, στην τυχαία παρασκευή του κατά τη μεταφορά γάλακτος μέσα σε ένα ασκό από στομάχι προβάτου, ενώ η δεύτερη αναφέρει ότι η πρώτη παρασκευή γάλακτος δεν ήταν τυχαία αλλά αποτέλεσμα προσπάθειας του ανθρώπου να ανακαλύψει τρόπους διατήρησης των συστατικών του γάλακτος, όπως η ξήρανσή του σε αβαθή πήλινα ή ξύλινα δοχεία στον ήλιο. Και στις δυο περιπτώσεις πάντως υπήρξε η δημιουργία πήγματος, είτε λόγω της δράσης των ενζύμων του στομάχου του προβάτου είτε λόγω της ανάπτυξης βακτηριών αντίστοιχα (Anifantakis, 2004, Kaminaridis & Moatsou, 2009)

Σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως το αγελαδινό και δευτερευόντως το πρόβειο και το κατσικίσιο γάλα στη γαλακτοκομεία. Η σύστασή του διαφέρει ανάμεσα στα θηλαστικά, χωρίς να παύει να αποτελεί από τις πιο πλήρης και απλές φυσικές τροφές ανεξάρτητα της πηγής του.

Η παρούσα μελέτη χωρίζεται σε Γενικό και Ειδικό μέρος. Στο πρώτο παραθέτονται κάποιες γενικές πληροφορίες για το γάλα και τα συστατικά του, για την καζεΐνη των βοοειδών και τον πολυμορφισμό όπως έχει προκύψει από άλλες μελέτες. Στο δεύτερο μέρος αναπτύσσεται ο τρόπος εκτέλεσης του πειράματος που αναφέρθηκε παραπάνω, γίνεται η παρουσίαση των αποτελεσμάτων καθώς και η συζήτησή τους.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Γάλα

1.1. Συστατικά

Το γάλα είναι μία πολύ πλούσια υψηλής θρεπτικής αξίας τροφή. Περιέχει πολλά θρεπτικά συστατικά, μερικά από τα οποία είναι τόσο σπάνια, ώστε δεν υπάρχουν πουθενά αλλού στη φύση. Δεν είναι τυχαίο λοιπόν, ότι το γάλα έχει σαν προορισμό να χρησιμεύει ως πρώτη, αλλά και μοναδική, τροφή για το νεογέννητο. Η μεγάλη θρεπτική του αξία οφείλεται όχι μόνο στις πρωτεΐνες αλλά και σε άλλες θρεπτικές ύλες όπως είναι το ασβέστιο, ο φώσφορος, διάφορες βιταμίνες, υδατάνθρακες και πολλά άλλα τα οποία αναφέρονται παρακάτω (Κεχαγιάς, 1997).

1.1.1.Συστατικά του γάλακτος

Το γάλα από τα διάφορα είδη ζώων (αγελαδινό, πρόβειο, κατσικίσιο) παρουσιάζει μόνο ποσοτικές διαφορές ως προς τη σύσταση. Τα συστατικά που βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 (Κεχαγιάς, 1997):

Πίνακας 1: Συστατικά γάλακτος που βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες

Συστατικό	Περιεκτικότητα
Νερό	88%
Λίπος	3,70%
Πρωτεΐνες	3,20%
Λακτόζη	4,70%
Ανόργανα άλατα	0,75%

1.1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τα συστατικά του γάλακτος

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν ποσοτικά ή ποιοτικά τα συστατικά του γάλακτος είναι (Κεχαγιάς, 1997):

- Το είδος και η φυλή του ζώου
- Το κληρονομικό δυναμικό του ζώου
- Ο αριθμός των αμέλξεων ανά εικοσιτετράωρο
- Η περίοδος της ημέρας
- Η σωματική κατάσταση του ζώου
- Η διάρκεια της ξηρής περιόδου
- Η συχνότητα των τοκετών
- Ο οργανισμός
- Η ηλικία του ζώου
- Η κόπωση και η συμπεριφορά του ανθρώπου στα ζώα
- Η υγιεινή κατάσταση του ζώου
- Οι συνθήκες διατροφής
- Το στάδιο της γαλακτικής περιόδου
- Η θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Ο τρόπος άμελξης

1.1.3. Πρωτεΐνες γάλακτος

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούνται από δυο κύριες ομάδες, τις καζεΐνες και τις οροπρωτεΐνες. Η διακύμανση της περιεκτικότητας του γάλακτος σε ολικές πρωτεΐνες εκτιμάται μεταξύ 3,3 g/100ml και 3,9 g/100ml.

Κατά μέσο όρο, το πρωτεϊνικό κλάσμα αποτελείται κατά 75-80% από καζεΐνες και κατά 20-25% από οροπρωτεΐνες (Mantis, 1993). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η σύσταση των πρωτεϊνών του αγελαδινού πρόβειου και αίγειου γάλακτος.

Πίνακας 2: Σύσταση των πρωτεϊνών του αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος (Borkova & Snaselova, 2005)

Συστατικό (g/100 g)	Αγελαδινό γάλα	Πρόβειο γάλα	Αίγειο γάλα
Ολική πρωτεΐνη	3,2	4,6	3,2
Καζεΐνες	2,6	3,9	2,6
Πρωτεΐνες του ορού	0,6	0,7	0,6

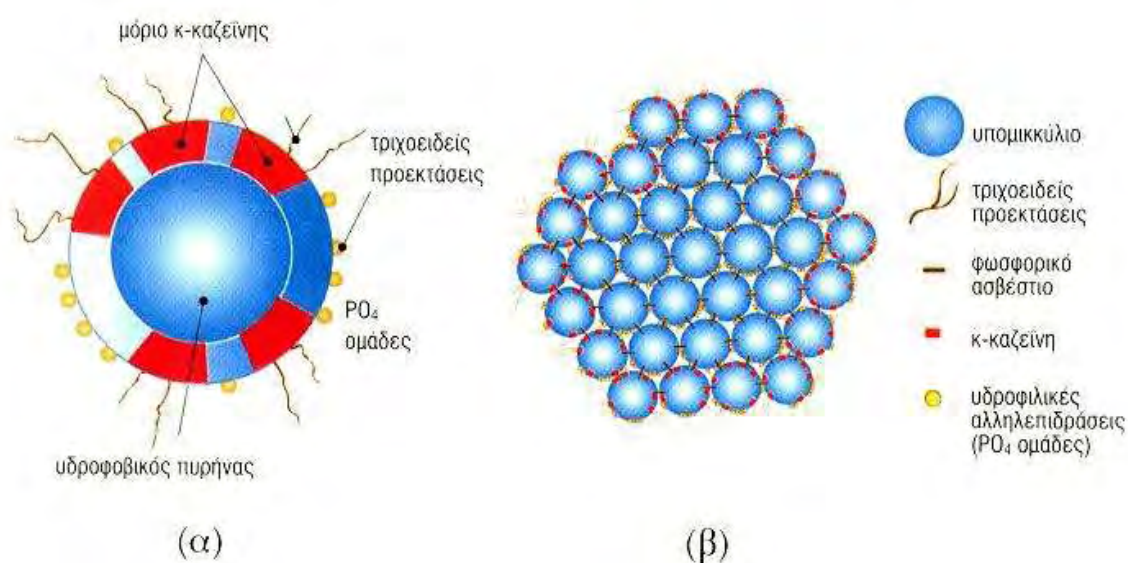
1.1.4 Καζεΐνες

Το αγελαδινό γάλα περιέχει περίπου 3,3% w/v πρωτεΐνες. Από αυτές περίπου 80 % είναι καζεΐνες και περίπου 20% πρωτεΐνες του ορού. Σε pH 4,6 (ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών) καταβυθίζεται η καζεΐνη ενώ οι πρωτεΐνες του ορού παραμένουν διαλυτές (Sweeney & Fox, 2013). Οι κύριες καζεΐνες του γάλακτος (αγελαδινού) είναι οι α_{s1} -CN (38%) , α_{s2} -CN (10%) , β -CN (36%) και οι κ -CN (13%). Επίσης, στα πρόβατα, βρίσκονται και οι γ -καζεΐνες (3%) που προκύπτουν από υδρόλυση της β -καζεΐνης με δράση της πλασμίνης (φυσική πρωτεϊνάση του γάλακτος).

Περίπου το 95% του καζεϊνικού κλάσματος του γάλακτος είναι υπό την μορφή μεγάλων κολλοειδών συσσωματωμάτων, γνωστά ως μικκύλια. Αυτά είναι έντονα ενυδατωμένα, ενσωματώνοντας περίπου 2.0–4.0 g H₂O ανά γραμμάριο πρωτεΐνης. Το άνυδρο μέρος των μικκυλίων αποτελείται από 94% πρωτεΐνη (καζεΐνες, ένζυμα) και, κατά 6%, από ασβέστιο και φωσφόρο (κυριότερα) αλλά και μαγνήσιο (Fox et al., 2015). Η βιολογική λειτουργία του μικκυλίου είναι να μεταφέρει μεγάλες ποσότητες αδιάλυτου κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου στα νεογνά σε υγρή μορφή και να σχηματίζει πήγμα στο στομάχι για πιο αποτελεσματική διατροφή (De Kruif & Holt, 2003).

Η γνώση της δομής των μικκυλίων των καζεϊνών είναι σημαντική γιατί αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε αυτά είναι βασικές για πολλές διεργασίες παραγωγής προϊόντων γάλακτος, με κυριότερη την τυροκομία. Όπως περιγράφουν πολλοί ερευνητές, η μονάδα αυτού του καζεϊνικού μικκυλίου μπορεί να προσδιοριστεί ως μια σφαιροειδής κατασκευή που αποτελείται και από τα υπομικκύλια, τα οποία

συγκρατούνται μεταξύ τους με γέφυρες κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου, υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου. Κάθε υπομικκύλιο, το οποίο αποτελείται από 10-100 καζεϊνικά κλάσματα, έχει υδρόφοβο πυρήνα και ένα περίβλημα κυρίως από το υδρόφιλο καρβοξυτελικό άκρο της κ-καζεΐνης. Όσον αφορά στις γέφυρες κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου, φαίνεται ότι πρόκειται για ηλεκτροστατικές δράσεις μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων της καζεΐνης και των συσσωματωμάτων $\text{Ca}_9(\text{PO})_6$, τα οποία φορτίζονται θετικά προσροφώντας δύο Ca^{2+} από το περιβάλλον. Στην Εικόνα 1 φαίνεται η δομή του μικκυλίου και υπομικκυλίου των καζεϊνών.



Εικόνα 1: Δομή υπομικκυλίου (α) και μικκυλίου καζεΐνης (β) (Πηγή: Ανυφαντάκης, 2004)

1.1.5. Πρωτεΐνες του ορού γάλακτος

Το πλάσμα γάλακτος ή άπαχο γάλα χωρίς την καζεΐνη ονομάζεται ορός γάλακτος. Όπως προαναφέρθηκε, το πρωτεϊνικό κλάσμα αποτελείται κατά 20-25% από οροπρωτεΐνες (Μάντης, 1993). Οι πρωτεΐνες του ορού είναι κυρίως σφαιρικές πρωτεΐνες και βρίσκονται στο γάλα ως μονομερή ή ολιγομερή.

Οι οροπρωτεΐνες, με βάση τη διαλυτότητά τους σε διάφορα μέσα, ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες, τις γαλακταλβουμίνες (που περιλαμβάνουν τη β-λακτοσφαιρίνη, την α-λακταλβουμίνη και την οροαλβουμίνη), τις γαλακτοανοσοσφαιρίνες (που περιλαμβάνουν την IgG1, την IgG2, την IgA και την IgM) και τις πρωτεόζες-πεπτόνες (Fox et al., 2015).

Στο γάλα, εκτός από τις κατηγορίες των πρωτεϊνών που αναφέρθηκαν υπάρχουν και άλλες, σε σημαντικά όμως μικρότερη αναλογία. Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η γαλακτοσιδερίνη, η λακτολίνη, οι πρωτεΐνες της μεμβράνης των λιποσφαιρίων και διάφορα ένζυμα (Anifantakis, 2004).

1.1.6. Λακτόζη και άλατα γάλακτος

Στα υδατοδιαλυτά συστατικά του γάλακτος ανήκουν η λακτόζη, τα άλατα, οι βιταμίνες και διάφορες άλλες ενώσεις μικρού ΜΒ. Η λακτόζη, το χαρακτηριστικό σάκχαρο του γάλακτος, είναι διζαχαρίτης D-γλυκόζης και D-γαλακτόζης, με β- (1-4) γλυκοζιτικό δεσμό και υδρολύεται από το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Το αγελαδινό και το πρόβειο γάλα περιέχουν περίπου 4,8 % λακτόζη και το γίδινο περίπου 4,3 % (Belitz et al., 2012).

Η λακτόζη θεωρείται σάκχαρο αναγωγικό, εφόσον η ημιακεταλική ομάδα της γλυκόζης είναι ελεύθερη. Στο γάλα υπάρχει με τους α- και β- ανωμερικούς τύπους (διαφέρουν ως προς τη θέση του -OH και του -H του C-1) σε ισορροπία. Με ήπια αναγωγή η ελεύθερη αλδεϋδομάδα της λακτόζης μετατρέπεται σε αλκοολική, και παράγεται η λακτιτόλη. Η λακτιτόλη έχει σχετικά γλυκιά γεύση, δεν μεταβολίζεται

και βρίσκει εφαρμογή ως γλυκαντικό σε τρόφιμα χαμηλών θερμίδων (Walstra & Jenness, 1984).

Η λακτόζη έχει μικρότερη γλυκύτητα από τη γλυκόζη και τη σακχαρόζη και ζυμώνεται (μεταβολίζεται) εύκολα από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως τα γαλακτικά βακτήρια, που τη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας. Από τις ζυμώσεις παράγονται ενώσεις με μικρότερο MB. Η πιο σημαντική ζύμωση στη γαλακτοκομία είναι η γαλακτική (ομογαλακτική και ετερογαλακτική), με σχηματισμό γαλακτικού οξέος. Το γαλακτικό οξύ μπορεί, επίσης, να ζυμωθεί από βακτήρια. Με την προπιονική ζύμωση μετατρέπεται σε προπιονικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο συγκεντρώνεται στη μάζα του τυριού και δημιουργεί χαρακτηριστικές οπές. Με την βουτυρική ζύμωση παράγεται βουτυρικό οξύ που έχει ανεπιθύμητη οσμή και αέρια διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο που δημιουργούν φουσκώματα στα τυριά (Kaminaridis & Moatsou, 2009).

Επίσης, σε προϊόντα γάλακτος συμβαίνει και αλκολική ζύμωση της λακτόζης, όπως στο κεφίρ και το κουμίζ, κατά την οποία σχηματίζεται αλκοόλη μέχρι 2 % (Anifantakis, 2004).

Τα άλατα του γάλακτος είναι ανόργανα και οργανικά, απλά ή σύμπλοκα, μερικά ιονισμένα. Μεταξύ αυτών κύρια είναι τα φωσφορικά, κιτρικά, χλωριούχα, θειικά, ανθρακικά και δισανθρακικά άλατα K, Na, Ca και Mg.

Ως κύρια συστατικά του γάλακτος θεωρούνται οι πρωτεΐνες, το λίπος, η λακτόζη και τα άλατα καθώς αυτά κυρίως καθορίζουν τη διατροφική και εμπορική του αξία. Ως δευτερεύοντα συστατικά του γάλακτος θεωρούνται διάφορα λιπίδια εκτός από τα τριγλυκερίδια, μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις, βιταμίνες, ένζυμα, αέρια, και άλλα ενώ επιπλέον, στο γάλα βρίσκονται διάφοροι μικροοργανισμοί, όπως και σωματικά κύτταρα από τα ζώα.

1.2. Βοοτροφία στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα εκτρέφονται περίπου 730.000 βοοειδή, εκ των οποίων τα 200.000 περίπου είναι γαλακτοπαραγωγής, τα 430.000 είναι κρεατοπαραγωγής και τα υπόλοιπα 100.000 είναι μικτής παραγωγής. Από αυτά παράγονται περίπου 700.000 τόνοι αγελαδινού γάλακτος και 65.000 τόνοι βόειου-μοσχαρίσιου κρέατος. Η πλειονότητα του ζωικού κεφαλαίου αποτελείται από εγχώριες βελτιωμένες αγελάδες σε ποσοστό 64% του συνόλου των αμελγόμενων αγελάδων, το 27% του συνόλου είναι γενετικά βελτιωμένες, προέλευσης από άλλες ευρωπαϊκές χώρες και μόλις το 9% του συνόλου είναι εγχώριες αβελτίωτες (ΥΠΙΑΑΤ, 2009).

Όσον αφορά στον κλάδο της γαλακτοπαραγωγικής αγελαδοτροφίας, κύριο χαρακτηριστικό του είναι η ταχεία αύξηση του μεγέθους των μονάδων και η αντίστοιχη μείωση του αριθμού των παραγωγών.

Αν και ο πληθυσμός παρουσίασε σημαντική πτώση για πολλά χρόνια, η παραγωγή αγελαδινού γάλακτος αυξήθηκε σημαντικά γεγονός που οφείλεται στην αύξηση της μέσης απόδοσης γάλακτος των αγελάδων. Παρόλα αυτά η μέση απόδοση γάλακτος ανά αγελάδα στη χώρα μας εξακολουθεί να παραμένει σχετικά χαμηλή σε σχέση με το μέσο όρο της Ε.Ε. (6.100 λίτρα/έτος) (www.gaiapedia.gr).

Στην Ελλάδα εκτρέφονται εγχώριες φυλές (κοινή Βραχυκερατική, Τήνου, Κατερίνης, Συκιάς), γαλακτοπαραγωγικές φυλές, κυρίως της φυλής Ασπρόμαυρη (Holstein .Friesian), κρεοπαραγωγικές φυλές κυρίως Λιμουζέν και Μπλοντ ντ' Ακιτέν (Blonde d.Aquitaine) και μικτής απόδοσης (Φαιά των Άλπεων και Σίμενταλ).

Στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε το επίπεδο πολυμορφισμού στο γονίδιο CSN1S1 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Alpha-S1-casein σε 94 δείγματα αγελάδων της φυλής Holstein από μία κτηνοτροφική μονάδα στην περιοχή της Λάρισας. Παρακάτω θα ακολουθήσει μία σύντομη περιγραφή της φυλής Holstein που είναι η κύρια γαλακτοπαραγωγική φυλή που εκτρέφεται στην Ελλάδα.

1.2.1. Η φυλή Holstein-Friesian

Η φυλή αυτή προέρχεται από διασταύρωση ζώων τα οποία έχουν τις γενεαλογικές τους ρίζες στην Ολλανδία, και πιο συγκεκριμένα στην επαρχία της Φριςλανδίας. Η φυλή κατατάσσεται στην κατηγορία των βοοειδών διπλής παραγωγικής κατεύθυνσης. Είναι ζώα υψηλής γαλακτοπαραγωγής και με καλά κρεατοπαραγωγικά χαρακτηριστικά. Διακρίνονται από τον ασπρόμαυρο χρωματισμό του τριχώματός τους και τη μεγάλη σωματική τους διάπλαση. Το βάρος των ενηλίκων ζώων κυμαίνεται στα 600 κιλά για τα θηλυκά και στα 1000 κιλά για τα αρσενικά, ενώ το βάρος των νεογέννητων μοσχαριών κυμαίνεται στα 40 κιλά. Ωριμάζουν γενετικά σε ηλικία 16-18 μηνών και όταν έχουν βάρος περίπου 500 κιλά. Η γαλακτοπαραγωγή κατά μέσο όρο για 3 γαλακτικές περιόδους, φθάνει στα 7600 λίτρα άλλα αυξομειώνεται ανάλογα με τη διαχείριση της μονάδας αφού η φυλή παρουσιάζει περισσότερες δυνατότητες. Παράλληλα η φυλή Holstein-Friesian έχει και την άσπρο-καφέ παραλλαγή, τα ζώα της οποίας είναι πιο μικρόσωμα σε σύγκριση με τα ασπρόμαυρα και έχουν χαμηλότερες αποδόσεις (www.moa.gov.cy)

Κεφάλαιο 2: Γενετικός Πολυμορφισμός

2.1. Ιστορική ανασκόπηση του γενετικού πολυμορφισμού των πρωτεϊνών του γάλακτος

Η ύπαρξη γενετικού πολυμορφισμού στις πρωτεΐνες του γάλακτος διαπιστώθηκε για πρώτη φορά από τους Aschaffenburg & Drewry το 1955 και αφορούσε τη β-λακτογλοβουλίνη. Οι παραπάνω ερευνητές παρατήρησαν ότι τα δείγματα γάλακτος από διαφορετικές αγελάδες που υφίσταντο ηλεκτροφόρηση (σε φίλτρο χάρτου με ρυθμιστικό διάλυμα βαρβιτόνης και pH 8,6, σε τάση 16V, για 16 ώρες), παρήγαγαν μία ή δύο διαφορετικές ηλεκτροφορητικές ζώνες ή ένα μείγμα τους που προσδιορίστηκαν ως β1 και β2, με σειρά μειωμένης κινητικότητας. Δύο χρόνια αργότερα, όταν ανακαλύφθηκε ότι η σύνθεση των δύο διαφορετικών τύπων της β-λακτογλοβουλίνης βρισκόταν υπό γενετικό έλεγχο, μετονομάστηκαν σε Α και Β αντίστοιχα (Aschaffenburg & Drewry το 1957).

Η ανακάλυψη των Aschaffenburg & Drewry αποτέλεσε το έναυσμα έντονης ερευνητικής δραστηριότητας με στόχο την περαιτέρω μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού όλων των πρωτεϊνών του γάλακτος. Αρχικά οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν στη διαμόρφωση μεθόδων προσδιορισμού των αλληλόμορφων των πρωτεϊνών του γάλακτος, στη μελέτη του τρόπου με τον οποίο κληρονομούνται, καθώς και στη διακύμανση των συχνοτήτων των αλληλόμορφων των πρωτεϊνών του γάλακτος στις διάφορες φυλές των βοοειδών. Σύντομα το διεθνές ενδιαφέρον στράφηκε στην εύρεση των γονιδιακών τόπων που σχετίζονται με τα παραγωγικά χαρακτηριστικά του γάλακτος. Μέχρι σήμερα οι περισσότερες από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν επικεντρώνονται στα γονίδια που ελέγχουν τη σύνθεση των τεσσάρων καζεϊνών (as1, as2, β, κ) καθώς, και της β-λακτογλοβουλίνης.

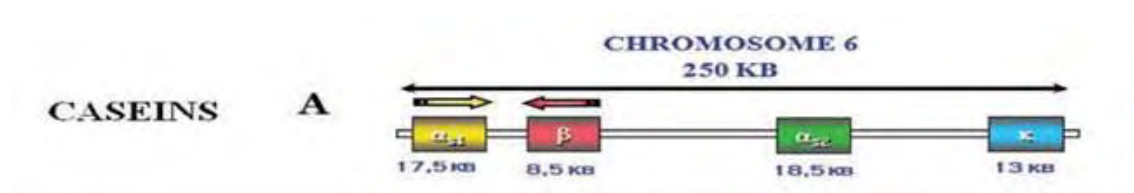
2.2. Γενετικός πολυμορφισμός των πρωτεϊνών του γάλακτος

Η σύνθεση των πρωτεϊνών του γάλακτος ελέγχεται από γονίδια. Το τμήμα του DNA που αποτελεί ένα γονίδιο μεταγράφεται σε αγγελιοφόρο RNA και μεταφράζεται σε ένα πολυπεπίδιο, το οποίο με επιπλέον τροποποίηση, οδηγεί στο σχηματισμό μιας πρωτεΐνης. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται και για τον σχηματισμό κάθε μίας από τις πρωτεΐνες του γάλακτος (Μάντης, 1993).

Μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους η μορφολογία των χρωμοσωμάτων παρουσιάζει εξαιρετική ομοιομορφία στα ζεύγη τους. Ωστόσο, σε τμήματα των χρωμοσωμάτων που αντιπροσωπεύουν τμήματα γονιδίων μπορεί να υφίσταται κάποια παραλλακτικότητα στην αλληλουχία των βάσεων του DNA. Αυτή η παραλλακτικότητα μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία γονιδίων με περισσότερες από μια μορφές, που ονομάζονται αλληλόμορφα. Όπου η γενετική παραλλαγή απαντάται συχνά (π.χ. τουλάχιστον 5% αλληλόμορφων διαφέρει από αυτό που παρατηρείται συνήθως) τότε αναφερόμαστε στην παρουσία του φαινομένου του γενετικού πολυμορφισμού. (Swaisgood,1992).

2.3. Γενετικός πολυμορφισμός των καζεϊνών του γάλακτος

Περισσότερο από το 95% των πρωτεϊνών που προέρχονται από το γάλα των βοοειδών κωδικοποιούνται από 6 γονίδια (Martin et al., 2002). Τα τέσσερα καζεϊνικά γονίδια συνδέονται στενά σε ένα σύμπλεγμα μήκους 250-kb (Ferretti et al., 1990; Martin et al., 2002) (Εικόνα 2) και χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 6 (Hayes et al., 1993; Popescu et al., 1996).



Εικόνα 2: Οργάνωση του γενετικού τύπου των καζεϊνών στα βοοειδή. (προσαρμογή από Martin et al., 2002)

Στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής ο γενετικός πολυμορφισμός των πρωτεϊνών του γάλακτος οφείλεται, είτε σε υποκατάσταση αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, είτε στο έλλειμμα ενός αμινοξέος από αυτή. Οι μεταβολές αυτές είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων στην αλληλουχία των μορίων DNA που αποτελούν το γονιδιακό τόπο των πρωτεϊνών (Swaisgood, 1992). Οι αλλαγές στην αλληλουχία του DNA είναι δυνατόν να εντοπιστούν στο τμήμα του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση ή σε περιοχές του DNA όπου ρυθμίζεται η έκφραση του γονιδίου (Moioli et al., 1998).

2.3.1. Η α_{s1} -Καζεΐνη

Αποτελείται από 199 αμινοξέα και έχει μέγεθος 23,614 κίλο dalton (kDa). Οι 5 γενετικές παραλλαγές της α_{s1} -καζεΐνης του γένους *Bos* είναι οι: A, D, B, C και E από τις οποίες η κύρια είναι η B-8P και ο όρος α_{s0} -καζεΐνη B, έχει αντικατασταθεί από τον α_{s1} -καζεΐνη B-9P. Έχει υψηλό αρνητικό φορτίο και υψηλή περιεκτικότητα σε φώσφορο κι επομένως είναι, ευαίσθητη στην παρουσία ιόντων ασβεστίου. Η α_{s1} -καζεΐνη αποτελείται από ένα κύριο και ένα δευτερεύον συστατικό τμήμα, που και τα δυο έχουν την ίδια αμινοξική ακολουθία. Το δευτερεύον μέρος προκύπτει από την περιστασιακή φωσφορυλίωση στη Ser41 (της α_{s1} -καζεΐνης B-9P). Η α_{s1} -καζεΐνη D περιλαμβάνει ένα υπόλειμμα φωσφοθρεονίνης (ThrP 53), η οποία ονομάζεται α_{s1} -καζεΐνη D-9P και το δευτερεύον συστατικό αυτής της γενετικής παραλλαγής έχει 10 μόρια φωσφόρου και ονομάζεται α_{s1} -καζεΐνη D-10P.

Στην α_{s1} -καζεΐνη των βοοειδών έχει βρεθεί η γενετική παραλλαγή A στις φυλές *Holstein Friesians*, *Red Holsteins* και *German red*, η B που είναι μία κοινή παραλλαγή του είδους *Bos taurus*, η C που είναι η κυρίαρχη παραλλαγή στα είδη *Bos indicus* και *Bos grunniens*, η παραλλαγή D που βρέθηκε σε διάφορες φυλές *Bos taurus* της Γαλλίας και της Ιταλίας και η παραλλαγή E στο είδος *Bos grunniens*. Επίσης έχουν χαρακτηριστεί τρεις νέες παραλλαγές οι F, G και H (Farrell et al., 2004) (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Διαφορές στις γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής α_{s1} -καζεΐνης (Farrell et al., 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη					192
		14-26	53	51-58	59	66	
α_{s1} -CN (199 αμινοξέα)	A	Απαλοιφή					Glu
	B		Ala		Gln	SerP	Glu
	C						Gly
	D		ThrP				Glu
	E				Lys		Gly
	F					Leu	Glu
	G						Glu
	H				Απαλοιφή		Glu

2.3.2. Η α_{s2} -Καζεΐνη

Εκτός από την πιο κοινή παραλλαγή CSN1S2*A, η οποία έχει βρεθεί σε όλα τα είδη του γένους *Bos*, άλλες τρεις παραλλαγές αυτής της πρωτεΐνης είναι γνωστές, η B, η C, και η D (Πίνακας 4). Οι παραλλαγή B που είναι κοινή για τα είδη *Bostaurus*, *Bosindicus* και *Bosgrunniens*, η C που έχει ταυτοποιηθεί στη φυλή zebu (*Bosgrunniens*) της Μογγολίας (Grosclaudeetal., 1976, 1978, 1982), ενώ η παραλλαγή D που έχει βρεθεί με χαμηλή συχνότητα σε ορισμένες Ευρωπαϊκές φυλές (*Bostaurus*) και στη φυλή Namchi (*Bostaurus*) της Αφρικής (Grosclaudeetal, 1979; Jannetal., 2004; Ibeagha-Awemuetal., 2005a). Η παραλλαγή A είναι η πιο συχνή σε όλες τις φυλές που έχουν διερευνηθεί μέχρι τώρα και επιπλέον είναι η πιο σταθερή στις περισσότερες δυτικές φυλές.

Πίνακας 4: Διαφορές στις γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής α_{s2} -καζεΐνης (Farrell et al., 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη			
		33	47	51-59	130
α_{s2} -CN (207 αμινοξέα)	A	Glu	Ala		Thr
	B	Η ολοκληρωμένη αλληλουχία δεν έχει καθοριστεί			
	C	Gly	Thr		Ile
	D			Απαλοιφή	

2.3.3. Η β-Καζεΐνη

Η παραλλαγή Α είναι η κυρίαρχη σε όλα τα είδη *Bos* που έχουν μελετηθεί, ενώ οι παραλλαγές C και D έχουν μια λιγότερη φωσφορική ομάδα από τις υπόλοιπες (Eigeletal., 1984) (Πίνακας 5). Κύριο χαρακτηριστικό της β-καζεΐνης είναι ότι όλες οι παραλλαγές της προκύπτουν από γενετικό πολυμορφισμό, ο οποίος ευθύνεται και για τροποποίηση της φωσφορυλίωσης στις παραλλαγές C και D (Visser et al., 1995).

Πίνακας 5: Διαφορές στις γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής β- καζεΐνης (Farrell et al., 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη													
		18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	122	137/138	152	?
β-CN (209 αμινοξέα)	A ¹						His								
	A ²	SerP	Arg	SerP	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	His	Ser	Leu/Pro	Pro	Gln
	A ³										Gln				
	B						His					Arg			
	C			Ser		Lys	His								
	D	Lys													
	E				Lys										
	F						His								Leu
	G						His						Leu		
	H ¹		Cys							Ile					
	H ²								Glu		Leu				Glu
I										Leu					

2.3.4. Η κ-Καζεΐνη

Οι πιο κοινές γενετικές παραλλαγές έχουν χαρακτηριστεί ως Α και Β, με την Α να τείνει να είναι κυρίαρχη στις περισσότερες γαλακτοκομικές φυλές βοοειδών (Farrelletal., 2004) (Πίνακας 6). Στο είδος *Bosindicus*, έχουν βρεθεί επιπλέον οι παραλλαγές C και E (Ng-Kwai-Hang&Grosclaude, 1992). Οι νέες γενετικές παραλλαγές έχουν χαρακτηριστεί ως F¹, F², G¹, G², H, I και J (Farrelletal., 2004).

Πίνακας 6: Διαφορές στις γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής κ- καζεΐνης (Farrell et al., 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη						
		10	97	104	135	136	148	155
κ-CN (169 αμινοξέα)	A	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Ser
	B					Ile	Ala	
	C		His					
	E							Gly
	F ¹						Val	
	F ²	His				Ile	Ala	
	G ¹			Cys		Ile	Ala	
	G ²						Ala	
	H						Ile	
	I				Ala			
	J						Ile	Ala

2.4. Η επίδραση του γενετικού πολυμορφισμού των καζεϊνών σε παραγωγικά χαρακτηριστικά του γάλακτος.

Στα μηρυκαστικά, έχει πραγματοποιηθεί πλήρης χαρτογράφηση των γονιδίων των πρωτεϊνών του γάλακτος και έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί αξιοσημείωτες γενετικές παραλλαγές, με μεγάλη οικονομική σημασία για την κτηνοτροφία συνδέονται άμεσα με την απόδοση των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, όσον αφορά την ποσότητα γάλακτος, τα θρεπτικά χαρακτηριστικά και τα χαρακτηριστικά τυροκόμησης. (Grosclaude, 1988; Di Stasio and Mariari 2000; Martin et al., 2002).

Οι παραλλαγές, επίσης, των πρωτεϊνών του γάλακτος εμπλέκονται σε διάφορες πτυχές της ανθρώπινης διατροφής. Η παρουσία αλληλομόρφων που σχετίζονται με μειωμένη περιεκτικότητα των καζεϊνών και των πρωτεϊνών ορού γάλακτος θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για την παραγωγή γάλακτος με ειδικές θρεπτικές ιδιότητες. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το υποαλλεργικό γάλα. Από την άλλη πλευρά, η συχνότητα αυτών των αλληλομόρφων, που σχετίζονται με τη μείωση της περιεκτικότητας του γάλακτος σε πρωτεΐνες, θα μπορούσε να μειωθεί με επιλογή των κατάλληλων γεννητόρων, μετά από μία απλή ανάλυση DNA, αυξάνοντας έτσι την περιεκτικότητα σε καζεΐνη στο γάλα που χρησιμοποιείται για τυροκόμηση.

Παραλλαγές στην φυλή Holstein – Friesian

Ο Boettcher et al. (2004), παρατήρησε σημαντική επίδραση διαφόρων παραλλαγών των γονιδίων των καζεϊνών στην περιεκτικότητα των πρωτεϊνών του γάλακτος σε Ιταλικά βοοειδή της φυλής Holstein και Brown.

Ο σύνθετος γενότυπος B-A1-B (με σειρά CSN1S2- CSN2- CSN3), συσχετίστηκε με αυξημένα ποσοστά λίπους και πρωτεϊνών στο γάλα της φυλής Ayrshire στην Φιλανδία (Ikonen et al., 2001) και στις φυλές Holstein και Brown στην Ιταλία (Boettcher et al., 2004). Ο απλότυπος C-A2-B συσχετίστηκε με μειωμένη απόδοση γάλακτος και υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών (Boettcher et al., 2004).

Μια πρόσφατη έρευνα σε ολλανδικό πληθυσμό Holstein κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η επιλογή του σύνθετου γενότυπου A2-B-B για τα γονίδια CSN2-CSN3-LGB οδηγεί σε αγελάδες που παράγουν γάλα με βελτιωμένα χαρακτηριστικά τυροκόμησης (Heck et al., 2009).

Κεφάλαιο 3: Σκοπός

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη του πολυμορφισμού στο γονίδιο της α_1 -καζεΐνης του γάλακτος, σε ελληνική εκτροφή αγελάδων Holstein. Συγκεκριμένα μελετήσαμε το επίπεδο του πολυμορφισμού στο εξώνιο 9 (33bp) του γονιδίου CSN1S1, για τυχόν παραλλαγές, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη α_1 -casein, σε 94 δείγματα αγελάδων της φυλής Holstein σε μία κτηνοτροφική μονάδα στην περιοχή της Λάρισας

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση DNA από τα 94 δείγματα αίματος των αγελάδων της φυλής *Holstein-Friesian*, χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο των Budowleetal., (1990). Το DNA που απομονώνεται είναι σταθερό στους 4 °C για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η απομόνωση του DNA με διαδοχικές εκχυλίσεις με οργανικούς διαλύτες (φαινόλη και χλωροφόρμιο) αποτελεί την κλασσική μέθοδο απομάκρυνσης των πρωτεϊνών από το DNA.

Αναλυτικά η διαδικασία της απομόνωσης:

- Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρεται 1 ml δείγματος σε erpendorf των 2 ml, όπου προσθέτουμε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος SSC 1x. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έπειτα απομακρύνεται το υποκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος SSC 1x. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά απομακρύνουμε το υποκείμενο και προσθέτουμε 0.6 ml CH₃COONa (οξικού νατρίου) συγκέντρωσης 0.2 M, 25 μl SDS 10% και 15 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10 mg/ml) και ακολουθεί επώαση στους 55 °C για περίπου 2 ώρες υπό ανάδευση.
- Στη συνέχεια, προσθέτουμε 1 ml φαινόλης και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13000 rpm στους 4°C.
- Μεταφέρουμε το υποκείμενο σε καινούργιο erpendorf, και προσθέτουμε 1 ml χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000 rpm στους 4°C.

- Ακολουθώντας, μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούργιο erpendorf, και προσθέτουμε 1ml ισοπροπανόλης και κάνουμε επώαση για τουλάχιστον 20 λεπτά στους -20 °C. Μετά την επώαση κάνουμε φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13000 rpm στους 4 °C για να γίνει κατακρήμιση του DNA.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 ml αιθανόλης 70%. Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις rpm στους 4 °C.
- Μετά απομακρύνουμε το υπερκείμενο και κάνουμε επώαση στους 50 °C μέχρι να εξατμιστεί τελείως η αιθανόλη.
- Τέλος, αφού στεγνώσει το ίζημα, προσθέτουμε 100 μ l ddH₂O (δισ-αποσταγμένο νερό) στο DNA, και αποθηκεύουμε τα δείγματα μας στους -20 °C.

Έπειτα, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 1.5%, με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου έτσι ώστε να καθοριστεί η ποσότητα του DNA των δειγμάτων που θέλουμε να υποβάλουμε σε PCR (Πίνακας 7).

Πίνακας 7 : Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 1.6%

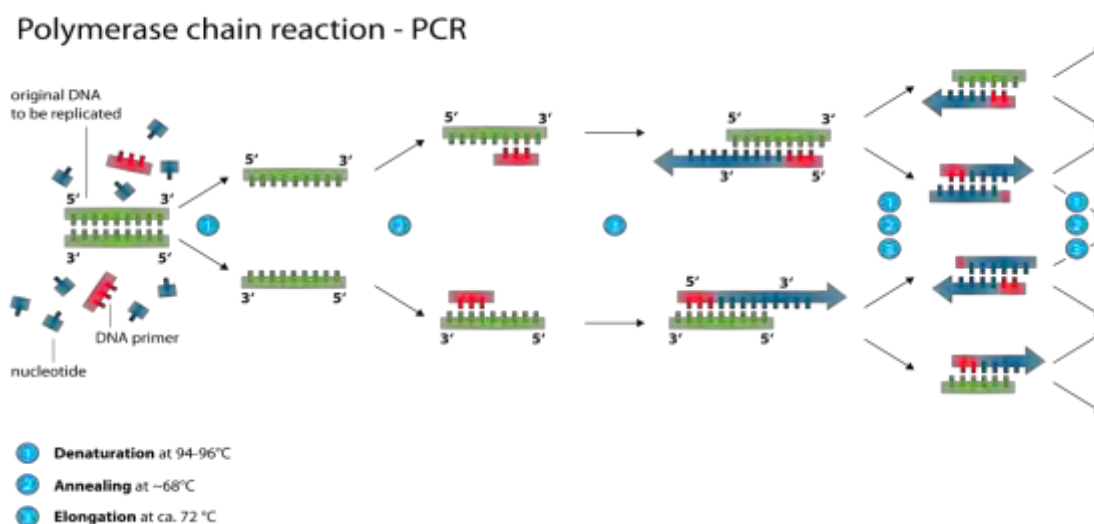
Παρασκευή πηκτής αγαρόζης	
TAE 1x	50ml
Αγαρόζη	0.8gr
Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml)	5 μ l

4.2. Ενίσχυση γονιδίου CSN1S1 με PCR

Η PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά το 1985. Σήμερα αντιμετωπίζεται σαν μια από τις πιο σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις της δεκαετίας και έχει αλλάξει, με επαναστατικό τρόπο, τη μελέτη του DNA. Ο εφευρέτης της μεθόδου Kary Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993.

Η PCR είναι μια πολύ γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα του DNA. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο

γιατί για να γίνει ανάλυση των μεταλλάξεων ή των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο, είναι απαραίτητες αρκετά μεγάλες ποσότητες του DNA. Απομονωμένα τμήματα DNA θα ήταν αδύνατο να μελετηθούν επαρκώς χωρίς την μέθοδο της PCR.



Εικόνα 3: Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (2001 Sinauer Associatew,Inc.)

Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές έτσι ώστε να ενισχυθεί το εξόνιο 9 του γονιδίου CSN1S1, χρησιμοποιώντας την αλληλουχία αναφοράς από τη βάση δεδομένων (as₁-cazein, exon 9, Gen Bank: X59856). Στον πίνακα 8 που ακολουθεί, φαίνεται η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουμε μία περιοχή μεγέθους 154bp, η οποία περιλαμβάνει το τμήμα των 33 bp του εξωνίου 9 της as₁- καζεΐνης.

Πίνακας 8: Εκκινητές ενίσχυσης του εξωνίου 9 της as₁- καζεΐνης

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
CSN1S1EX9.FW	AGTCTCAGAGGCAGTAACAATGA
CSN1S1EX9.RV	AGGGACATGTAAACTTTATGGTTC

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης, για την ενίσχυση της περιοχής του εξωνίου 9 της *as1-*

Αντίδραση PCR για 50 μl	
DNA	100ng
Buffer TAE 10x	5 μ l
MgCl ₂ 50 mM	2 μ l
dNTPs (40 mM)	1 μ l
Primer forward (50 pmoles/ μ l)	1 μ l
Primer reverse (50 pmoles/ μ l)	1 μ l
Taq polymerase (5 units/ μ l)	0,2 μ l
H ₂ O	Έως 50 μ l

καζεΐνης, με την μέθοδο της PCR ήταν το ακόλουθο:

Η PCR εφαρμόζεται με την βοήθεια ενός θερμοκυκλωτή, ο οποίος ξεκινάει με θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά έτσι ώστε το δίκλωνο DNA να αποδιαταχθεί. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 35 κύκλοι θερμοκρασιών 95°C για 40 δευτερόλεπτα, 53°C για 40 δευτερόλεπτα και τέλος 72 °C για άλλα 40 δευτερόλεπτα. Σε αυτά τα στάδια οι εκκινητήρες σε περίσσια υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA με ψύξη του δείγματος στους 50 – 60°C. Ακολουθεί επώαση στους 72° C για την επιμήκυνση των εκκινητών από μία θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων.

Στη συνέχεια τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% (w/v) με προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, χρησιμοποιώντας ως δείκτη έναν ladder 100bp (Fast Gene, Nippon Genetics) για επιβεβαίωση του μοριακού βάρους των προϊόντων PCR.

4.3. Ανάλυση Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

Η ανάλυση SSCP είναι από τις πιο απλές και πιο χρήσιμες μεθόδους για την ανίχνευση μεταλλαγών και πολυμορφισμών. Κατά την ανάλυση αυτή τα τμήματα DNA διαχωρίζονται ως μονόκλιωνα μόρια σε μη αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Καθώς μία αλυσίδα μονόκλωνου DNA διπλώνει διαφορετικά από μία άλλη αλυσίδα, αν αυτές διαφέρουν έστω και ως προς μία βάση, έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικό κινητικό πρότυπο. Αυτές οι μεταλλάξεις ανιχνεύονται ως καινούργια ζώνη και εντοπίζεται με αυτοραδιογραφία, με την χρήση φθορίζοντων εκκινητών καθώς και με την χρήση του νιτρικού αργύρου.

Η ανάλυση SSCP μας δείχνει διαφορές σε ηλεκτροφορετικά πρότυπα και όχι την ακριβή μεταλλαγή που τα προκάλεσε, για αυτό τον λόγο μετά την ανάλυση ακολουθείται αλληλούχιση του συγκεκριμένου προϊόντος PCR.

Στη συγκεκριμένη μελέτη τα θετικά δείγματα της PCR που ταυτοποιήθηκαν μετά την ανίχνευση στην πηκτή αγαρόζης, υποβλήθησαν σε SSCP. Χρησιμοποιήθηκαν 7μl, στα οποία έγινε προσθήκη 10μl αποδιατακτικού διαλύματος φορμαμιδίου (denaturation buffer), το οποίο αποδιατάσσει τα δίκλιωνα μόρια του προϊόντος. Στη συνέχεια με επώαση για 8 λεπτά στους 96°C πραγματοποιείται πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Τα δείγματα τοποθετούνται αμέσως σε πάγο προκειμένου να μην συμβεί επαναδιάταξη των μονόκλωνων μορίων DNA. Ακολούθως τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12% όπου και ηλεκτροφορούνται στα 220V για 24 ώρες περίπου σε θερμοκρασία 4°C.

Για την πηκτή ακρυλαμίδης 12% αναμείξαμε: 7,5gr ακρυλαμίδα, 0,25gr bis-ακρυλαμίδα, 3,15ml buffer TBE 10x, και 6 ml γλυκερόλη σε ποτήρι ζέσεως με ανάδευση με την χρήση μαγνήτη. Έπειτα έγινε διήθηση στο διάλυμα και συμπλήρωση απεσταγμένου νερού έως τα 65 ml. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη, προσθέτουμε 65ml TEMED και 400 μl APS 20%, αναδεύουμε καλά και ρίχνουμε το διάλυμα σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τέλος, τοποθετούμε τα χτενάκια έτσι ώστε να δημιουργήσουμε τα πηγαδάκια για να φορτώσουμε τα

αποδιαταγμένα PCR προϊόντα.

Μετά από το πέρασμα του χρόνου της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί ο χρωματισμός της πηκτής. Η διαδικασία του χρωματισμού έχει ως εξής:

- Αφαιρούμε την πηκτή προσεκτικά από το καλούπι και την τοποθετούμε πάνω σε μία πλαστική-διάφανη σακούλα, μέσα σε ένα μεταλλικό πιάτο το οποίο αναδεύεται πάνω σε μηχανήμα ανάδευσης.
- Παρασκευάζουμε το πρώτο διάλυμα: 400ml H₂O + 1ml οξικού οξέος. Ξεπλύνουμε την πηκτή δύο φορές με το διάλυμα οξικού οξέος (200ml κάθε φορά) αναδεύοντας την πηκτή για 3 λεπτά. Αφαιρούμε το διάλυμα και ξεπλύνουμε με δις-αποσταγμένο νερό (dd H₂O).
- Φτιάχνουμε το δεύτερο διάλυμα: 1g νιτρικού αργύρου σε 1 λίτρο νερό. Εμείς χρειαζόμαστε 200ml διαλύματος για την πηκτή, και την αφήνουμε να αναδεύεται για 10 λεπτά. Μετά ξεπλύνουμε με δις-αποσταγμένο νερό (ddH₂O) δύο φορές.
- Παρασκευάζουμε και το τρίτο διάλυμα: 3g καυστικού νατρίου (NaOH), 1ml φορμαλδεΰδης (HCHO) και 0,01g βοροϋδρίδιου του νατρίου (NaBH₄). Προσθέτουμε στη πηκτή το 3^ο διάλυμα και την αφήνουμε να αναδεύεται μέχρι να εμφανιστούν όλες οι ζωνώσεις καθαρά.
- Τέλος το ξεπλύνουμε καλά με δις-αποσταγμένο νερό (dd H₂O) και αποθηκεύουμε την πηκτή ακρυλαμίδης.

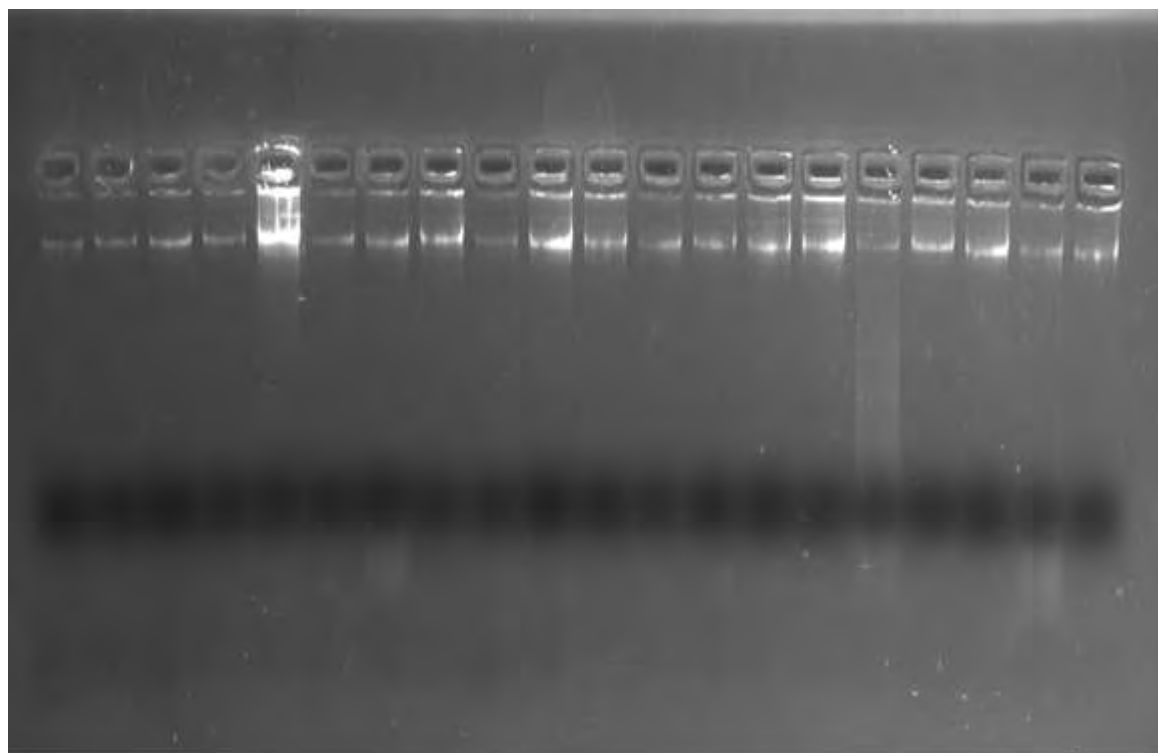
4.4. Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Όπως αναφέρθηκε πριν η SSCP ανάλυση υποδεικνύει ότι υπάρχει μία μετάλλαξη αλλά δεν μας λέει ποια ακριβώς είναι αυτή η μετάλλαξη. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη η αλληλούχιση των PCR προϊόντων. Για να σταλούν όμως τα PCR προϊόντα για αλληλούχιση θα πρέπει πρώτα να καθαριστούν από τυχόν υπολείμματα των αντιδραστηρίων της PCR. Με την βοήθεια ενός κιτ καθαρισμού DNA (Gel&PCR clean-up, Macherey - Nagel) και την εφαρμογή του πρωτοκόλλου του καθαρίσαμε τα δείγματα που επιλέχθηκαν να σταλούν για αλληλούχιση σε εξωτερικό εργαστήριο.

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα & συζήτηση

5.1. Απομόνωση DNA

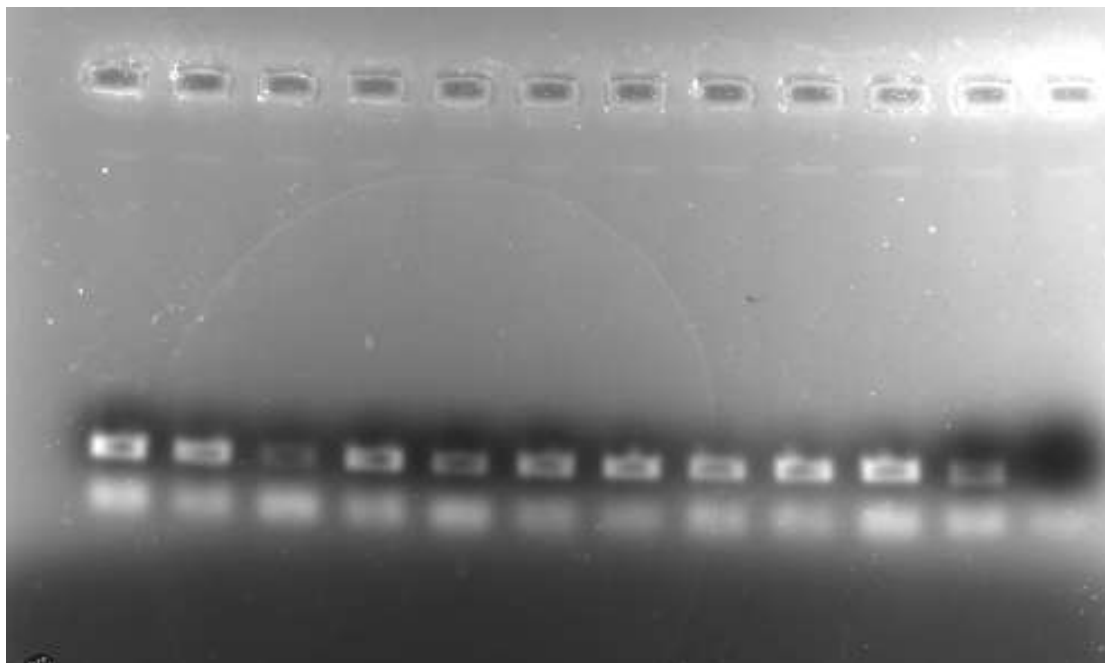
Έγινε απομόνωση DNA, από 94 δείγματα αίματος αγελάδας, της γαλακτοπαραγωγικής φυλής Holstein- Friesian, πραγματοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης 1.5% (w/v) , με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου εμφανίζονται δύο διακριτές φωτεινές ζώνες. Η πρώτη ζώνη εμφανίζεται ψηλότερα, λίγο πιο κάτω από το πηγάδι της πήκτης και είναι το πυρηνικό DNA, ενώ η δεύτερη παρουσιάζεται χαμηλότερα διότι είναι μικρότερου μεγέθους και είναι το μιτοχονδριακό DNA.(Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτη αγαρόζης 1,5% (w/v). Απομόνωση 20 δειγμάτων αίματος αγελάδας.

5.2. Ενίσχυση DNA με PCR

Χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές (πίνακας 8) ενισχύθηκε το τμήμα του εξωνίου 9 που επιθυμούσαμε (γονίδιο as₁-καζεΐνη, εξώνιο 9, GenBank:X59856). Για να επαληθευτεί η επιτυχία της μεθόδου πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζη 2%.



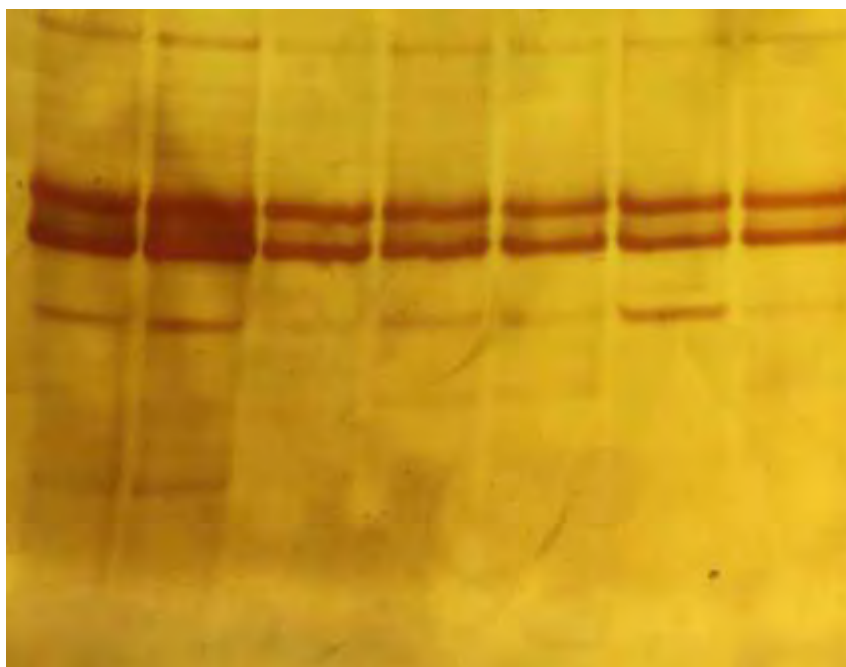
Εικόνα 5: Προϊόντα PCR σε ηλεκτροφόρηση πήκτη αγαρόζης 2%, με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου

Με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο, τα τμήματα που ενισχύθηκαν είχαν μήκος περίπου 154bp. Η Εικόνα δείχνει ένα τυπικό αποτέλεσμα μίας PCR ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου που μελετήσαμε.

5.3. Ανάλυση SSCP (Single strand conformation polymorphism)

Αφού πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής (όπως αυτή έχει περιγραφεί παραπάνω), μέσω της μεθόδου PCR, έγινε ανάλυση SSCP των PCR προϊόντων. Τα αποδιαταγμένα δείγματα της PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτη πολυακρυλαμίδης 12%, για περίπου 24 ώρες σε θερμοκρασία 4°C στα 220Volt.

Κατά την SSCP ανάλυση το DNA κινείται σε μονόκλωνη κατάσταση μέσα στην πήκτη της ακρυλαμίδης, για αυτό συνήθως βλέπουμε την ύπαρξη δύο ζωνών για τα ομόζυγα άτομα και τεσσάρων για τα ετερόζυγα άτομα. Παρακάτω παρουσιάζεται μία ενδεικτική εικόνα από πήκτη πολυακρυλαμίδης μετά τον χρωματισμό της με νιτρικό άργυρο.

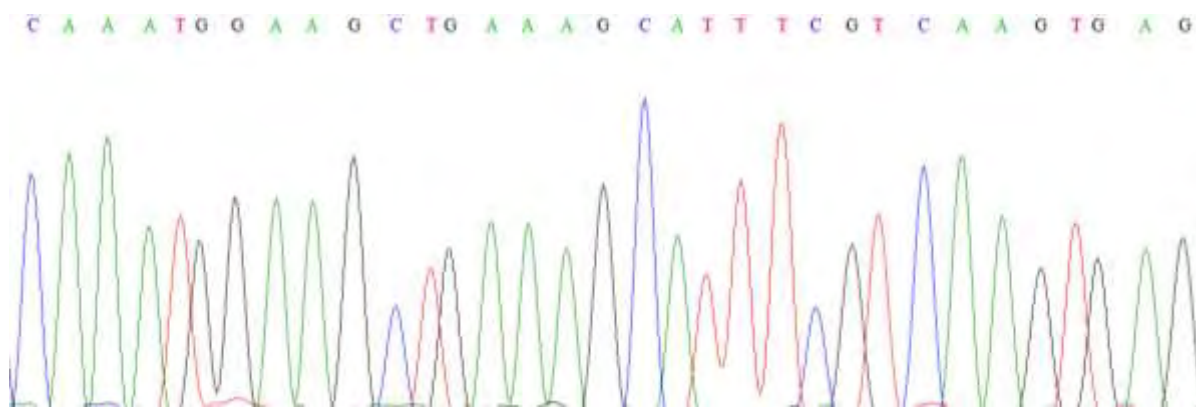


Εικόνα 6: Ανάλυση SSCP σε 7 PCR προϊόντων

Από την ανάλυση SSCP που πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των δειγμάτων, αποκαλύφθηκε ένα μόνο πρότυπο. Για την ταυτοποίηση αυτού του αλληλομόρφου ακολούθησε αλληλούχιση τριών δειγμάτων.

5.4. Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές που είχαμε επιλέξει για την ενίσχυση του PCR προϊόντος, επομένως προέκυψαν δύο αλληλουχίες βάσεων για κάθε ένα δείγμα: μία για τον εκκινητή της μεταγραφόμενης αλυσίδας και μία για τον εκκινητή της συμπληρωματικής αλυσίδας. Το μέγεθος του τμήματος που προέκυψε μετά την αλληλούχιση ήταν 154bp. Τα αρχεία των ακολουθιών αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit[©] και οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalX για να βρεθούν οι περιοχές ομολογίας. Η αλληλουχία του εξωνίου 9 φαίνεται στην Εικόνα 7.



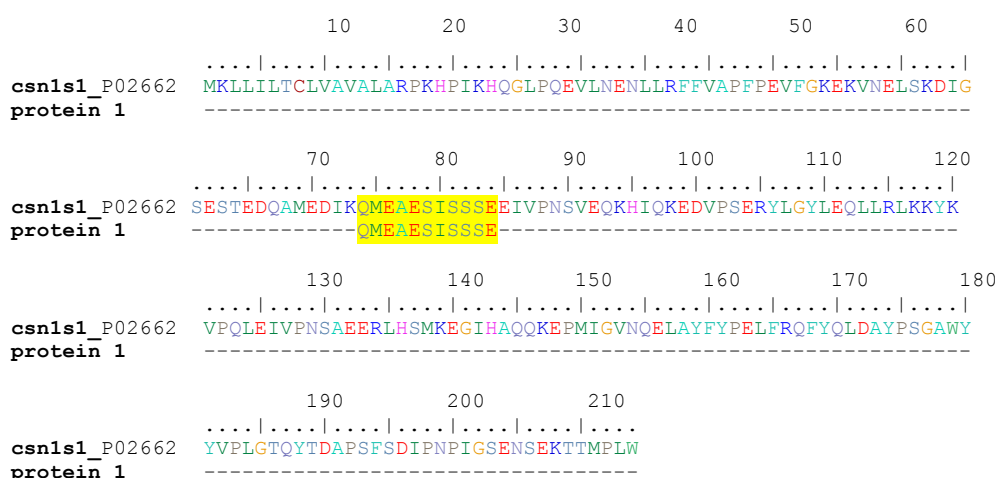
Εικόνα 7: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 9 του γονιδίου CSN1S1.

Η αλληλουχία, μεγέθους 154bp, που προέκυψε από το μοναδικό πρότυπο SSCP, είναι η εξής:

```
Allele 1  .....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....
TAGTCTCAGAGGCAGTAACAATGATTTCTTCTTTTAGCAAAATGGAAGCTGAAAGCATTTCGTC AAGTGAGGTATACCA
.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....
TTTTTATGTTAAATTC AATATCCAATTAGAAAAATGTTATGAAAGTTTGTGAACCATAAAGTTTACATGTCCC
```

Το τμήμα της αλληλουχίας (33bp), στο κίτρινο πλαίσιο, αντιστοιχεί στην αλληλουχία του εξωνίου 9.

Μεταφράζοντας την παραπάνω ακολουθία βάσεων σε αμινοξική ακολουθία και στοιχίζοντας τη με την αμινοξική ακολουθία αναφοράς για την α_1 -καζεΐνη (UniProtKB: locusCASA1_BOVIN, accession P02662), προέκυψε ότι η αμινοξική αλληλουχία του εξωνίου 9 (θέσεις 74-84) που αναλύσαμε, είναι παρόμοια με την αλληλουχία που εμφανίζουν οι περισσότερες παραλλαγές της α_1 -καζεΐνης (Εικ.8), στις συγκεκριμένες θέσεις με εξαίρεση την παραλλαγή I, στην οποία έχει παρατηρηθεί αντικατάσταση του γλουταμιικού οξέος (Glu) σε ασπαραγινικό οξύ (Asp).



Εικόνα 8: Αμινοξική αλληλουχία της α_1 -καζεΐνης.

5.5. Συζήτηση

Τα τέσσερα γονίδια καζεΐνης έχουν εντοπιστεί σε ένα σύμπλεγμα 250 kb (Ferretti et al., 1990, Threadgill & Womack, 1990) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 (Hayes et al., 1993 Popescu et al., 1996). Η σειρά τους είναι CSN1S1, CSN2, CSN1S2 και CSN3. Αυτή η συστάδα γονιδίων είναι επίσης γνωστή και ως casein locus (Martin et al., 2002) ή ως super locus (Freyer et al 1999). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CSN1S1 είναι περίπου 17.5 kb.

Μια πρόσφατη ανασκόπηση των πρωτεϊνών του γάλακτος (Caroli et al., 2009) παρουσίασε εννέα διαφορετικές γενετικές παραλλαγές του γονιδίου CSN1S1 (A, B, C, D, E, F, G, H και I) στο γένος Bos (Πίνακας 9). Στο συγκεκριμένο γονίδιο, το πιο κοινό αλληλόμορφο είναι το B και ακολουθεί το C. Τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα έχουν βρεθεί σε όλες τις φυλές ζώων.

Πίνακας 9: Γενετικές παραλλαγές του γονιδίου CSN1S1 της α_{s1} -καζεΐνης (Caroli et al., 2009)

Variant/allele	Position								GenBank accession	SwissProt accession	References
	14-26	53	51-58	59	64	66	84	192			
A	DEL										Grosclaude et al. (1972)
B		Ala		Gln	SerP	SerP	Gln	Glu	X59856	P02662	Mercier et al. (1971) and Grosclaude et al. (1973)
C								Gly			Grosclaude et al. (1972)
D		ThrP									Grosclaude et al. (1972)
E				Lys				Gly			Grosclaude et al. (1972)
F					Ser	Leu					Prinzberg et al. (1998)
G											Rando et al. (1998)
H			DEL								Mahé et al. (1999)
I							Asp	Gly	U862370/371 (<i>Bos indicus</i>) EU908730 (<i>Bos taurus</i>)		Lühken et al. (2009, Balteanu et al. (2008, 2010)

Variants are presented in different rows; amino acids in the reference variant are in boldface; amino acid modifications are given in the relevant column
DEL: internal deletion of the corresponding sequence in the mature protein

Οι πρωτεϊνικές παραλλαγές διαφέρουν, κυρίως, εξαιτίας απλών αντικαταστάσεων αμινοξέων, με εξαίρεση την παραλλαγή A (Grosclaude et al., 1972) και την παραλλαγή H (Mahé et al., 1999), στις οποίες παρατηρείται απαλοιφή αμινοξέων στις περιοχές που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 4 και 8, αντίστοιχα.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση του πολυμορφισμού του εξωνίου 9 της α_{s1} -καζεΐνης σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό αγελάδων της φυλής Holstein-Friesian. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, βρέθηκε ότι το συγκεκριμένο εξόνιο είναι συντηρημένο στο συγκεκριμένο πληθυσμό. Η μοναδική αλληλουχία που βρήκαμε, είναι η πιο κοινή αλληλουχία που απαντάται σχεδόν σε όλες τις παραλλαγές της α_{s1} -καζεΐνης, με εξαίρεση την παραλλαγή I. Για την πλήρη ανάλυση της α_{s1} -

καζεΐνης είναι απαραίτητη η ανάλυση και των υπολοίπων εξωνίων, στα οποία έχουν αναφερθεί πολυμορφισμοί στη βιβλιογραφία. Αποτέλεσμα αυτής της ανάλυσης θα είναι η πλήρης χαρτογράφηση του συγκεκριμένου πληθυσμού όσον αφορά τις παραλλαγές της a_{s1} -καζεΐνης με σκοπό την περαιτέρω συσχέτιση των παραλλαγών αυτών με διάφορα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγής.

Τις τελευταίες δεκαετίες, με την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών, είναι δυνατός ο προσδιορισμός των γονιδιακών τύπων των πρωτεϊνών του γάλακτος σε επίπεδο DNA, με αποτέλεσμα οι ερευνητές να έχουν επιδείξει σημαντικό ενδιαφέρον στη δυνατότητα χρησιμοποίησης των γενοτύπων των πρωτεϊνών του γάλακτος ως γενετικών δεικτών για την αύξηση της γαλακτοπαραγωγής και για την αλλαγή της σύνθεσης του γάλακτος.

Η επιλογή αγελάδων με συγκεκριμένο γενετικό τύπο πρωτεϊνών του γάλακτος είναι πλέον εφικτή και είναι δυνατή η επιδίωξη συζεύξεων που θα οδηγήσουν σε επιθυμητά γενετικά αλληλόμορφα. Έτσι, είναι δυνατός ο προσδιορισμός του γενοτύπου των ταύρων πριν την χρησιμοποίησή τους για διασταύρωση, καθώς και των αγελάδων πριν από την έναρξη της γαλακτοπαραγωγής. Ωστόσο, πριν από την εισαγωγή των γενοτύπων των πρωτεϊνών του γάλακτος ως κριτήριο επιλογής των ζώων, θα πρέπει να υπολογιστούν οι συσχετίσεις τους με τις παραμέτρους υψηλής οικονομικής και βιολογικής αξίας όπως είναι τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της γαλακτοπαραγωγής και η σύνθεση του γάλακτος.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Ανυφακάκης Ε, 1994.** Χημεία και Ανάλυση του γάλακτος. Εκδόσεις Σταμούλης, κεφ. Πρωτεΐνες του γάλακτος.
- **Ανυφακάκης Ε. Μ. 2004.** Τυροκομία, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.
- **Ανυφακάκης Ε., Καλαντζόπουλος Γ., 1993.** Γαλακτοκομία , Τόμος Πρώτος, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης
- **Καμιναρίδης, Γ., Μοάτσου, Γκ., 2009.** Γαλακτοκομία .Εκδοσεις Έμβρυο
- **Μάντης, Α, 1993.** Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Εκδ. Οικ. Αδ. Κυριακίδη, 2^η εκδ., κεφ 1.
- **Μοάτσου, Γκ., 2009.** Γεωργικές Βιομηχανίες-Γαλακτοκομία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **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 b-lactoglobulins of cow's milk. Nature 180: 376- 378.
- **BelitzH., GroschW. &r., S. 2012.** Χημεία τροφίμων, Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις Τζιόλα.
- **Boettcher, P. J., A. Caroli, A. Stella, S. Chessa, E. Budelli, F. Canavesi, S. Ghiroldi, and G. Pagnacco. 2004.** Effects of casein haplotypes on production traits in Italian Holstein and Brown cattle. J. Dairy Sci. 87:4311–4317.
- **Budowle B, Baechtel FS, Giusti AM, Monson KL, 1990.** Applying highly polymorphic variable number of tandem repeats loci genetic markers to identity testing. Clin Biochem. 23(4):287-93
- **Brew K, Castellino FJ, Vanaman TC and Hill RL, 1970.** The complete amino acid sequence of bovine a-lactalbumin. J.Biol.Chem. 245:4570.
- **Brignon G, Ribadeau-Dumas B, Mercier JC and Pelissier JP, 1977.** Complete amino acid sequence of bovine as2-casein-FEBS Lett. 76:274-279.
- **Borkova, M., and Snaselova, J., 2005.** Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. Czech J. Food Sci., 23, 41-50

- **Burgoyne RD and Duncan JS, 1998.** Secretion of milk proteins. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3:275-285
- **Caroli, A., O. Bulgari, S. Chessa, D. Cocchi, and G. Tulipano. 2009.** In vitro evaluation of caseinophosphopeptides from different genetic variants on bone mineralization. *Ital. J. Anim. Sci.* 8(Suppl. 2): 42–44.
- **Di Stasio, L., and P. Mariani. 2000.** The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production. *Zoot. Nutr. Anim.*26:69–90.
- **Eigel WN, Butler JE, Evnstrom CA, Farrell HM, Harwalkar VL, Janness R and Whitney RM, 1984.** Nomenclature of proteins of cow's milk , fifth edition. *J. Dairy Sci.* 67 : 1599-1631.
- **Evers, JM. 2004.** The milk fat globule membrane-composition and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. *Int Dairy J*; 14:661-74
- **Farrell, M., H. Jr., Jimerez- 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, 1641-1674
- **Ferretti, L., P. Leone, and V. Sgaramella. 1990.** Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Res.* 18:6829–6833.
- **Formaggioni, P., A. Summer, M. Malacarne, and P. Mariani. 1999.** Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in *Bos* genus. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma XIX*: 127–165.
- **Fox, P. F. and Brodtkorb, A (2008),** The casein micelle : Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 18, 677- 684
- **Fox , P. F. and McSweeney, P.L. H (1998),** *Dairy Chemistry & Biochemistry.* London, UK : Blackie Academic & Professional.
- **Grosclaude, F. 1988.** Le polymorphisme genetique des principales lactoproteines bovines. Relations avec la quantite, la composition et les aptitudes fromageres du lait. *INRA Prod. Anim.* 1:5–17.
- **Grosclaude, F., M. F. Mahe, J. C. Mercier, J. Bonnemaire, and J. H. Teissier. 1976.** Polymorphisme des lactoproteines de Bovines Nepalais. II. Polymorphisme des caseines “ α s-mineures”; le *locus* α s2-Cn est-il lie aux *loci* α s1-Cn, β -Cn et k-Cn? *Ann. Genet. Sel. Anim.* 8:481–491.

- **Grosclaude, F., M. F. Mahé, and J. P. Accolas. 1982.** Notes sur le polymorphisme génétique des lactoprotéines de bovines et de yak Mongols. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 14: 545–550.
- **Grosclaude F, Mercier JC and Ribadeau-Dumas B, 1973.** Genetic aspects of cattle casein research. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 27: 328-337.
- **Grosclaude, F., P. Joudrier, and M. F. Mahé. 1978.** Polymorphisme de la caséine α S2 bovine: Étroite liaison du locus α S2-CN avec les loci α S1-CN, β -CN et κ -CN; mise en évidence d'une déletion dans le variant α S2-CND. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 10:313–327.
- **Grosclaude, F., P. Joudrier, and M. F. Mahé. 1979.** A genetic and biochemical analysis of a polymorphism of bovine α S2-casein. *J. Dairy Res.* 46:211–213.
- **Groenen, M. A. M., R. J. M. Dijkhof, A. J. M. Verstege, and J. J. vander Poel. 1993.** The complete sequence of the gene encoding bovine alpha s2-casein. *Gene* 123:187–193.
- **Hayes, H., and E. Petit. 1993.** Mapping of the β -lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M heavy chain-like sequence in homologous cattle, sheep, and goat chromosomes. *Mamm. Genome* 4:207–210.
- **Hayes, H., E. Petit, C. Bouniol, and P. Popescu. 1993.** Localisation of the alpha-S2-casein gene (CASAS2) to the homologous cattle, sheep and goat chromosome 4 by in situ hybridisation. *Cytogenet. Cell Genet.* 64:282–285.
- **Heck, J. M. L., A. Schennink, H. J. F. van Valenberg, H. Bovenhuis, M. H. P. W. Visker, J. A. M. van Arendonk, and A. C. M. van Hooijdonk. 2009.** Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 92:1192–1202.
- **Huppertz., Upadhyay, V.K., Kelly, A. L. and Tamine, A. Y. 2006,** Constituents and Properties of Milk from Different species. In : *Brined cheeses*, (edr A. Y. Tamine), Blackwell Publishing Ltd, 1-42
- **Ibeagha-Awemu, E. M., E. M. Prinzenberg, and G. Erhardt. 2005a.** High variability of milk protein genes in *Bos indicus* cattle breeds of Cameroon and Nigeria and characterization of a new α S1 pro-moter allele. *J. Dairy Res.* 72:1–9.

- **Ibeagha-Awemu, E. M., E.-M. Prinzenberg, O. C. Jann, G. Luhken, A. E. Ibeagha, X. Zhao, and G. Erhardt. 2007.** Molecular characterization of bovine *CSNIS2B* and extensive distribution of zebu specific milk protein alleles in European cattle. *J. Dairy Sci.*90:3522–3529
- **Ikonen, T., H. Bovenhuis, M. Ojala, O. Ruottinen, and M. Georges. 2001.** Associations between casein haplotypes and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *J. Dairy Sci.* 84:507–514.
- **Jann, O.C., E.M. Ibeagha-Awemu, C. Özbeyaz, P. Zaragoza, J.L. Williams, P. Ajmone-Marsan, J.A. Lenstra, K. Moazami-Goudarzi, and G. Erhardt. 2004.** Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. *Genet. Sel. Evol.*36:243–257.
- **Keenan, T.W., Mather, I.H., 2003.** Milk fat globule membrane *Encyclopedia of dairy sciences.* Roginski HFuquay JWFox PFLondon: Academic Press; 1568-76
- **Martin, P., M. Szymanowska, L. Zwierzchowski, and C. Leroux. 2002.** The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reprod. Nutr. Dev.*42:433–459.
- **Moioli B, Pilla F and Tripaldi C, 1998.** Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research* 27: 185-195
- **Noble, R.C. 1978.** Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animals. *Prog Lipid Res*; 17: 55-91
- **Ng-Kwai-Hang, K. F. & Grosclaude, F., 1992.** Genetic polymorphism of milk proteins. In *advanced dairy chemistry.*
- **Popescu, C.P., S. Long, P. Riggs, J. Womack, S. Schmutz, R. Fries, and D.S. Gallagher. 1996.** Standardization of cattle karyotype nomenclature: Report of the committee for the standardization of the cattle karyotype. *Cytogenet. Cell Genet.*74:259–261.
- **Ribadeau-Dumas B, Brignon G, Grosclaude F and Mercier JC, 1972.** Structure primaire de la caseine b bovine. Sequence complete. *Eur. J. Biochem.* 25: 505-514.
- **Rollema HS, 1992.** In P. F. Fox, (ed.), *Advanced Dairy Chemistry. 1: Proteins,* Vol. 1. Elsevier Applied Science, London, pp. 111-140.

- **Stewart, A.F., J. Bonsing, C. W. Beattle, F. Shah, I.M. Willis, and A.G.Mackinlay.1987.**Completenucleotidesequencesofbovine α S₂-and β -caseincDNAs:Comparisonswithrelatedsequencesinotherspecies.*Mol.Biol.Evol.* 4:231–241.
- **Swaigood HE, 1982.** Chemistry of milk proteins. Page 1. In *Developments in Dairy Chemistry- 1*. P. F. Fox, (ed.), Appl. Sci. London Engl.
- **Swaigood He, 1992.** Chemistry of caseins. Page 63. In *Advanced Dairy Chemistry. Vol.1*. P.F. Fox,(ed.), Elsevier Sci. Publ. Essex. Engl.
- **Visser, S., Slangen, J. C., Lagerwerf, M. F., Van Dongen, D.W. and Haverkamp, J. 1995.** Identification of a new genetic variant of bovine β -casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography A, 711, 141-150
- **Walstra, P., Geurts, TJ., Noomen, A., van Boekel. MAJS. 1999.** Dairy technology: principles of milk properties and processes. New York: Marcel Dekker, Inc
- **Walstra, P., Wouters, J. T. M. and Guerts, T. J. 2006.** Dairy Science and Technology (2nd edition), Boca Raton FL., USA: CRC Press
- **Wiking, L., Stagsted, J., Bjorck L., Nielsen, Jh., 2004.** Milk fat globule size is affected by fat production in dairy cows. *Int Dairy J*; 14:909-13.
- **Mercier, J.C., Grosclaude, F. and Ribadeau Dumas, B. (1971).** Structure primaire de la caséine a s1 bovine. Sequence complete. *Eur. J. Biochem . 23* , 41–51.
- **Grosclaude, F., Mahé, M.F. and Ribadeau Dumas, B. (1973).** Structure primaire de la caseine a s1 et de la caseine b -bovine. *Eur. J. Biochem 40* , 323–324.
- **Nagao, M., Maki, M., Sasaki, R. and Chiba, H. (1984).** Isolation and sequence analysis of bovine a s1 -casein cDNA clone. *Agric. Biol. Chem . 48* , 1663–1667.
- **Stewart, A.F., Willis, I.M. and Mackinlay, A.G. (1984).** Nucleotide sequence of bovine a s1 - and k -casein cDNAs. *Nucleic Acid Res. 12* , 3895–3907.
- **Grosclaude, F., Mahé, M.F., Mercier, J.C. and Ribadeau Dumas, B. (1972).** Caractérisation des variants génétiques

des caséines a s1 et b bovines. *Eur. J. Biochem.*

26 , 328–337.

- **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 a s1 -casein H and k -Cn *J. Genet. Sel. Evol.* **31** , 239–253.
- **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** , 3–13.
- **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 a s1 -casein locus by the insertion of a relict of a long interspersed element. *J. Dairy Sci.* **81** , 1735–1742.
- **Prinzenberg, E.M., Anglade, P., Ribadeau Dumas, B. and Erhardt, G. (1998).** Biochemical characterization of bovine a s1-casein F and genotyping with sequencespecific primers. *J. Dairy Res.* **65** , 223–231.
- **Lühken, G., Caroli, A., Ibeagha-Awemu, E.M. and Erhardt, G. (2009).** Characterization and genetic analysis of bovine a s1 -casein I variant. *Anim. Genet.* **40** , 479–485.
- **www.gaiapedia.gr**
- **www.minagric.gr**
- **www.moa.gov.cy**
- **en.wikipedia.org**

