

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
Agronomická fakulta
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat

**Analýza genu beta-kasein u plemen jersey a brown swiss
v České republice**
Diplomová práce

Vedoucí práce:

prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Markéta Tomanová

Školitel:

Ing. Anna Schmidtová

Zadání

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci Analýza genu beta-kasein u plemen jersey a brown swiss v České republice vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne: 27. 04. 2017

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu prof. RNDr. Alešovi Knollovi, Ph.D. za cenné rady a věnovaný čas. Velký dík za veškerou pomoc patří také mé školitelce Ing. Anně Schmidtové, zejména za čas a pomoc v laboratoři. Děkuji také prof. Ing. Tomášovi Urbanovi, Ph.D. za pomoc při zpracování statistických dat. V neposlední řadě děkuji také Ing. Tamaře Míkové a Ing. Janovi Wijackiovi za cenné a praktické rady a pomoc při práci v laboratoři.

Abstrakt

Analýza genu beta-kasein u plemen jersey a brown swiss v České republice

Kvalita mléka je u skotu ovlivňována řadou genů. Jedním z nich je i gen *CSN2*. Cílem této diplomové práce bylo testování souboru zvířat o 240 jedincích plemene jersey a brown swiss v České republice. DNA byla izolována z krve. Pomocí sekvenace byly stanoveny jejich genotypy a vypočteny genotypové a alelové frekvence. Dále byla v programu SAS provedena asociační analýza jednonukleotidového polymorfismu s parametry mléčné užitkovosti. Vybranými parametry byly laktační dny, dojivost (kg/laktace), obsah tuku v mléce (% a kg) a obsah bílkovin (% a kg). Tyto parametry byly k dispozici u 126 jedinců. Ve zkoumaném souboru nebyl prokázán statisticky průkazný vliv genotypu *CSN2* na zvolené znaky. Jako statisticky průkazný vyšel pouze efekt plemene.

klíčová slova: skot, beta-kasein, *CSN2*, mléčná užitkovost

Abstract

Beta-casein gene analysis at the Jersey and Brown Swiss breed in Czech Republic

The quality of milk in cattle is influenced by many genes. One of them is gene *CSN2*. The aim of this diploma thesis was to test animal population of about 240 individuals of Jersey and Brown Swiss breed in Czech Republic. DNA was isolated from blood. Genotypes were determined by sequencing followed by determining genotypes and alleles frequencies. The association analysis of single nucleotide polymorphism with milk yield parameters was performed by using SAS program. The selected parameters were lactation days, milk yield (kg), fat content in milk (% and kg) and protein content (% and kg). These parameters were available for 126 animals. Statistically significant effect of *CSN2* genotype on the selected milk production traits was not found in the studied population. Only effect of breed was found as statistically significant.

key words: cattle, beta-casein, *CSN2*, milk yield

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíl práce.....	10
3	Literární přehled.....	11
3.1	Význam a složení mléka	11
3.1.1	<i>Mléčné proteiny</i>	<i>11</i>
3.1.1.1	Syrovátkové bílkoviny.....	12
3.1.1.2	Kaseiny	12
3.2	Beta-kasein	14
3.2.1	<i>Gen beta-kaseinu</i>	<i>14</i>
3.2.2	<i>Polymorfismus beta-kaseinu.....</i>	<i>16</i>
3.2.2.1	Nejzastoupenější varianty.....	16
3.2.2.2	Další varianty.....	17
3.3	Zdravotní problémy u lidí spojené s konzumací mléka.....	18
3.3.1	<i>The A2 Milk CompanyTM</i>	<i>18</i>
3.3.2	<i>Alergie na mléko</i>	<i>19</i>
3.3.3	<i>Ostatní.....</i>	<i>20</i>
3.4	Další faktory ovlivňující kvalitu mléka	20
3.5	Použitá plemena.....	20
3.5.1	<i>Plemeno jersey.....</i>	<i>20</i>
3.5.2	<i>Plemeno brown swiss.....</i>	<i>22</i>
4	Materiál a metodika.....	23
4.1	Materiál.....	23
4.1.1	<i>Analyzované vzorky.....</i>	<i>23</i>
4.1.2	<i>Použité přístroje a software</i>	<i>23</i>
4.2	Metodika	24

4.2.1	<i>Izolace DNA</i>	24
4.2.2	<i>Agarózová gelová elektroforéza</i>	24
4.2.3	<i>PCR</i>	26
4.2.4	<i>Sekvenace</i>	27
4.2.5	<i>Matematicko-statistická analýza</i>	29
4.2.5.1	Výpočet frekvencí alel a genotypů	29
4.2.5.2	Výpočet Hardy-Weinbergovy rovnováhy	30
4.2.5.3	Asociační analýza	31
5	Výsledky a diskuse	32
5.1	<i>Izolace</i>	32
5.2	<i>PCR</i>	32
5.3	<i>Sekvenace</i>	33
5.4	<i>Matematicko-statistická analýza</i>	34
5.4.1	<i>Výpočet frekvencí alel a genotypů</i>	34
5.4.1.1	Diskuse	38
5.4.2	<i>Stanovení Hardy-Weinbergovy rovnováhy</i>	39
5.4.3	<i>Asociační analýza</i>	42
5.4.3.1	Nejmenší čtvercová střední hodnota a střední chyba průměru.....	44
5.4.3.2	Diskuse	47
6	Závěr	49
7	Seznam použité literatury	50
8	Seznam obrázků	54
9	Seznam tabulek	55
10	Seznam zkratk	57

1 ÚVOD

Mléko nejrůznějších živočišných druhů hraje významnou roli ve výživě dětí i dospělých. Mléko a další mléčné produkty, zejména pak z kravského mléka, jsou pro člověka zdrojem vysoce kvalitní energie, proteinů a mikronutrientů, jako vápník, hořčík a fosfor. Mléčné proteiny jsou zdrojem bioaktivních peptidů s antibakteriální, ale i opioidní aktivitou. Některé epidemiologické studie naznačují, že právě proteiny s opioidní aktivitou způsobují u lidí vyšší výskyt kardiovaskulárních chorob, jako je diabetes mellitus typu I a ischemická srdeční porucha. Právě proto je v posledních letech na obsah a kvalitu proteinů v mléce kladen velký důraz.

Obsah a složení proteinů jsou určeny převážně genotypem jedince. U skotu byla identifikována řada polymorfismů, které mimo jiné ovlivňují produkční vlastnosti mléka, ale i vlastnosti zpracování sýru a nutriční hodnoty mléka, jak bylo zmíněno výše. Ve většině případů jde pouze o jednonukleotidové polymorfismy (SNP), které jsou důvodem značné variability v mléčných proteinech. Stejně je tomu i u beta-kaseinu, který je kódován genem *CSN2* a kterému je věnována tato diplomová práce. Do současnosti byla u skotu, v závislosti na plemeni, identifikována existence 13 různých polymorfismů v *CSN2*. Všechny tyto polymorfismy jsou v praxi velmi užitečné zejména pro identifikaci alel spojených s vyšším výtěžkem proteinů nebo se specifickými vlastnostmi mléka, což farmářům a šlechtitelům pomáhá pružně reagovat na požadavky trhu za pomoci velmi efektivního šlechtění s využitím genetických markerů. Asociace různých alelových variant s vlastnostmi mléka, obsahem jeho složek a mléčnou užitkovostí je neustále intenzivně zkoumána. Protože jsou však výsledky výzkumu v této oblasti nejednotné, jsou nutné další studie.

V diplomové práci byl zkoumán skot plemene jersey a brown swiss v České republice. Obě plemena jsou v ČR využívána k mléčné produkci. Byl testován soubor zvířat o 240 jedincích. Přesné stanovení genotypu beta-kaseinu pomocí sekvenace a poznatky z této práce mohou sloužit chovatelům jako doporučení ke šlechtění a produkci.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce je provedení testování souboru zvířat plemen jersey a brown swiss v České republice, stanovení frekvence jejich genotypů a alel. Dále bude provedena asociační analýza jednonukleotidového polymorfismu v genu pro beta-kasein (*CSN2*) s parametry dílčí užítkovosti.

Dílčí cíle:

- zpracování literárního přehledu s použitím aktuálních informací k tématu
- osvojení si metodiky DNA analýzy vzorků krve
- určení genotypů metodou PCR-RFLP
- vytvoření databáze z výsledků
- podrobení získaných výsledků statistické analýze asociace genotypu *CSN2* s vybranými parametry mléčné užítkovosti (pomocí software SAS)
- porovnání výsledků se současnými poznatky a s již zjištěnými informacemi

Během optimalizace metodiky podle McLachlana (2006) byla pro určení genotypů zvířat zvolena sekvenace. Při PCR-RFLP nebyly získané výsledky optimální. Díky testování zvířat dvou plemen byl získán větší soubor dat pro statistickou analýzu a také bylo umožněno srovnání výsledků mezi nimi.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Význam a složení mléka

Mléko nejrůznějších živočišných druhů hraje významnou roli ve výživě jak dětí, tak i dospělých lidí (Hanusová *et al.*, 2010). Obsahuje důležité látky, které ovlivňují zažívací a gastrointestinální funkce, hormony a růstové faktory potencionálně schopné ovlivnit růst a vývoj gastrointestinálního traktu, dalších specifických orgánů, imunoregulaci, neimunitní obranu proti chorobám a tvorbu střevní mikroflóry (Pihlanto-Leppälä, 2001). Mléko a další mléčné produkty, zejména pak z kravského mléka, jsou zdrojem vysoce kvalitní energie, proteinů a mikronutrientů, jako je vápník, hořčík a fosfor (Hanusová *et al.*, 2010). Mléčné proteiny jsou zdrojem bioaktivních peptidů s antibakteriální a opioidní aktivitou. Termínem opioidní se rozumí taková chemická substance, která v lidském těle působí podobně jako morfin. Tyto peptidy mají také schopnost snižovat krevní tlak (Miluchová *et al.*, 2013). Základní složkou mléka je voda, dále sacharidy, lipidy, proteiny a minerály (Reece, 1998). Vzhledem k tomu, že je tato práce zaměřena na analýzu konkrétního genu u konkrétních plemen skotu, pozornost bude v této části věnována kravskému mléku.

Tab. 1: Složení kravského mléka (zdroj: Drbohlav a Vodičková, 2002)

Složka	%
voda	87,15
sušina	12,85
bílkoviny	3,29
tuk	4,06
sacharidy	4,77
popel	0,73

3.1.1 Mléčné proteiny

Kravské mléko je složeno ze šesti hlavních proteinů: čtyř kaseinů (alfa-s₁, alfa-s₂, beta a kappa) a dvou syrovátkových proteinů, přičemž kaseiny zaujímají asi 80 % z celkového množství proteinů v kravském mléce (Hanusová *et al.*, 2010). Kompozice mléka, tedy i mléčných bílkovin, je ovlivněna řadou faktorů. S rostoucím věkem zvířat klesá koncentrace kaseinů, zatímco se zvyšující se laktací jejich koncentrace roste.

V posledních letech je na obsah proteinů v mléce kladen velký důraz (Gellrich *et al.*, 2014). Na skladbu proteinů v mléce má vliv také roční období, krmení a zdravotní stav zvířete. Převážně je však určena genotypem jedince (Heck *et al.*, 2009). Vzhledem k návykům spotřebitelů se do budoucna očekává další nárůst poptávky po vyšším obsahu bílkovin v mléce oproti jiným složkám, jako jsou tuky a laktóza. (Gellrich *et al.*, 2014).

Řada bioaktivních dějů, které jsou výsledkem konzumace mléka, je přičítána právě proteinům a peptidům, které jsou v mléce obsaženy. Některé proteiny jsou však latentní. Pokud jsou v nativní formě, může být jejich aktivita neúplná, nebo ji mohou zcela postrádat. Aktivní peptidové frakce jsou pak z nativního proteinu nebo peptidu uvolněny během proteolytického trávení. Mohou být uvolněny také během zpracování potravin. Jakmile jsou bioaktivní peptidy uvolněny, mohou se chovat jako regulační sloučeniny s aktivitou podobnou aktivitě hormonální. Příkladem je od kaseinů odvozená fosforylace, která zlepšuje na vitamínu D nezávislou kalcifikaci kostí u dětí s rachitidou a dále taky třeba výše zmíněná opioidní aktivita (kapitola 3.1). Molekula bioaktivního peptidu se obvykle skládá z 3-20 zbytků aminokyselin. (Pihlanto-Leppälä, 2001). Dále budou podrobněji popsány pouze peptidy odvozené od beta-kaseinu, kterým se tato práce zabývá.

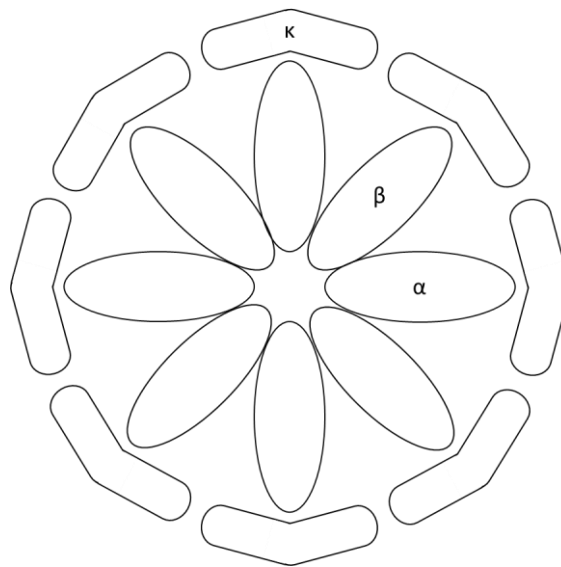
3.1.1.1 Syrovátkové bílkoviny

Mezi syrovátkové bílkoviny řadíme α -laktalbumin, β -laktoglobulin, bovinní sérový albumin a imunoglobulin (El-Agamy, 2007). Syrovátkové bílkoviny zastávají zhruba 20 % z celkové proteinové frakce mléka (Gellrich *et al.*, 2014). Stejně jako u kaseinů, taky i u syrovátkových bílkovin byly prokázány různé polymorfismy. Studie ukazují, že např. varianta A β -laktoglobulinu je spojena s nižší koncentrací kaseinů v mléce na úkor vyšší koncentrace právě β -laktoglobulinu (Heck *et al.*, 2009).

3.1.1.2 Kaseiny

Kaseiny jsou v mléce agregovány do velkých micelárních struktur (Obr. 1), které jsou v čerstvém mléce v koloidní suspenzi. Přestože detailní struktura takovýchto micel ještě není přesně popsána, existuje několik modelů. K vápníku senzitivní kaseiny (α -s₁, α -s₂ a β) jsou lokalizovány zejména uvnitř micel, zatímco κ -kasein micelu obaluje a slouží ke stabilizaci celé struktury. K vápníku senzitivní kaseiny jsou vysoce fosforylovány. Fosforečnan vápenatý tak s nimi interaguje prostřednictvím jejich fosfátových skupin. Díky této vazbě nesou micely v mléce velké množství fosforečnanu

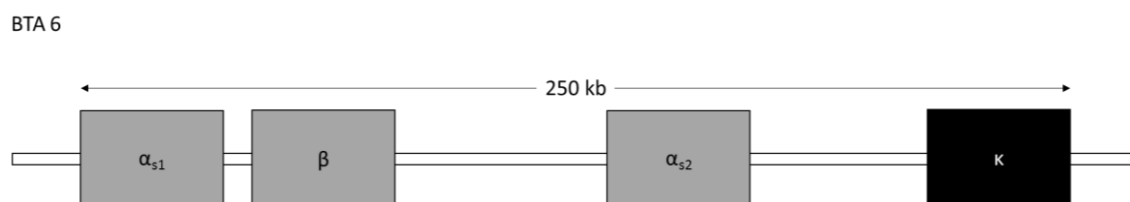
vápenatého, který je za normálních podmínek velmi nerozpustný. Micelární uspořádání kaseinů zajišťuje, že mléko má nízkou viskozitu i přes vysokou koncentraci proteinů v něm. Kaseinové micely jsou proto velmi funkčně důležité, zejména pak ve výživě a v determinaci fyzikálních vlastností mléka, jako je skladování a zpracování (Kumar *et al.*, 1994). Ve výživě zastávají svou úlohu v transportu fosforečnanu vápenatého, který je důležitý pro vývoj kostí u mláďat savců (Bonsing *et al.*, 1988). Jsou také zdrojem aminokyselin. Z těchto důvodů byly kaseiny velmi intenzivně zkoumány, a to jak na úrovni proteinů, tak i na úrovni DNA.



Obr. 1: Schematické znázornění struktury kaseinové micely (převzato z: Hristov *et al.*, 2016)

Kaseiny jsou kódovány čtyřmi geny, které byly zmapovány na BTA 6. Všechny geny jsou velmi úzce spojeny do klastru o velikosti 250 kb. Pořadí genů je znázorněno na obrázku 2 (Gallinat *et al.*, 2013). Díky tomuto spojení může být jedna varianta kaseinu ve vazebné nerovnováze s variantou jinou. Tento konstrukt poměrně ztěžuje určení, zda je efekt kaseinové varianty specifický k té dané variantě, nebo je naopak výsledkem jiných blízké spojených variant genů (Heck *et al.*, 2009). U skotu byl u všech kaseinů prokázán polymorfismus. Již bylo identifikováno 39 variant kaseinů. U α_{s1} -kaseinu je to 9 variant (A, B, C, D, E, F, G, H a I), u α_{s2} 4 (A, B, C a D) a u κ -kaseinu se vyskytuje celkem 13 variant proteinu (A, B, B2, C, D, E, F1, F2, G1, G2, H, I a J) a synonymní varianta AI (Gallinat *et al.*, 2013). V případě β -kaseinu bylo, podobně jako u κ -kaseinu, identifikováno 13 variant (Hanusová *et al.*, 2010). Ty jsou podrobněji popsány níže

v kapitole 3.2.2. U řady polymorfismů je známo, že ovlivňují produkční vlastnosti mléka, vlastnosti zpracování sýru, ale také nutriční hodnoty mléka. Tyto polymorfismy jsou mimo jiné cenným zdrojem informací pro fylogenetické studie. Ve většině případů jde o jednonukleotidové polymorfismy s otevřeným čtecím rámcem. Výsledkem je záměna aminokyseliny ve výsledném proteinu neboli nesmyslná mutace. U některých variant však byla prokázána delece aminokyselin, a to díky takovým záměnám nukleotidů, které ovlivňují místa sestřihu (Gallinat *et al.*, 2013).



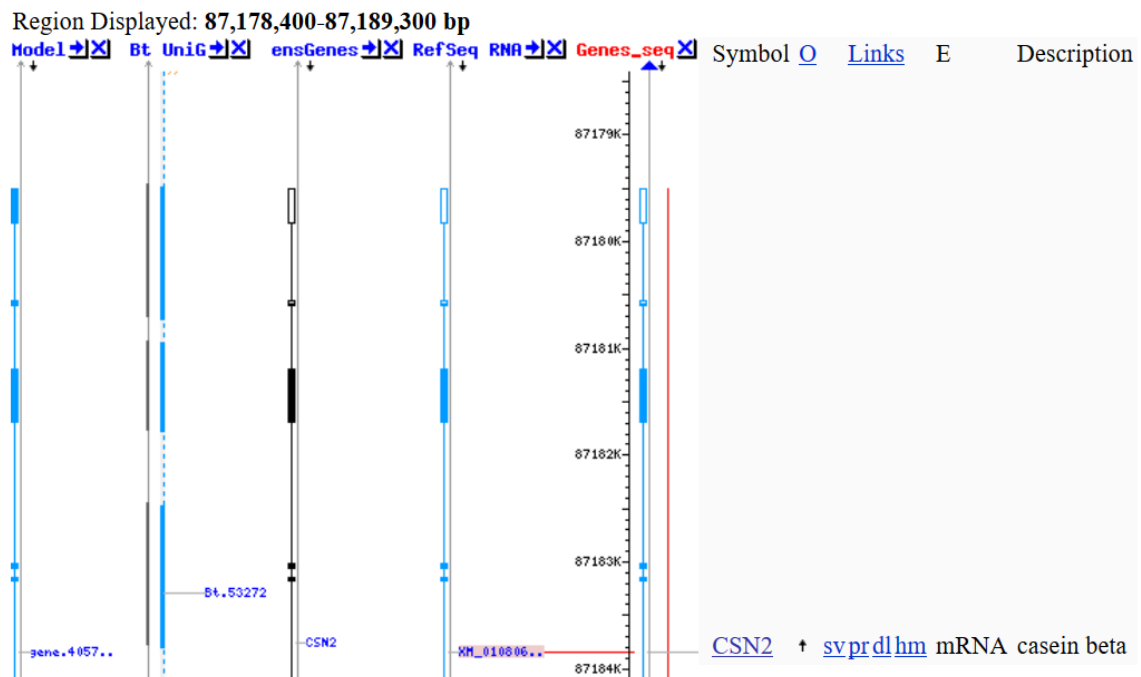
Obr. 2: Schéma genomické organizace kaseinových genů na bovinním lokusu BTA 6 (převzato z: Martin *et al.*, 2002): κ vápníku senzitivní kaseiny jsou vyznačeny šedě.

3.2 Beta-kasein

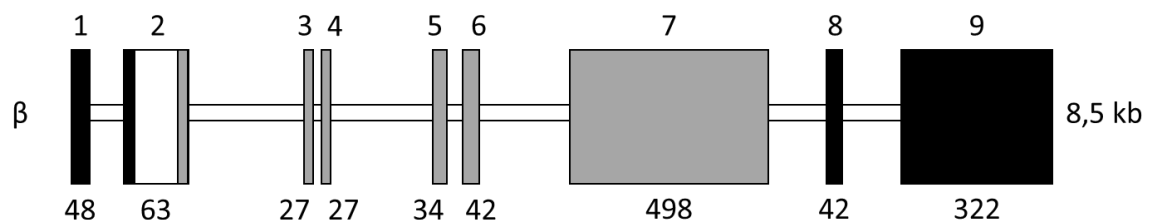
Jedním z nejvíce zastoupených proteinů v kravském mléce je beta-kasein (Hanusová *et al.*, 2010). Zaujímá asi 40 % celkové kaseinové frakce (Cosenza *et al.*, 2009). Je kódován genem *CSN2* a existuje zde značná variabilita (Hanusová *et al.*, 2010).

3.2.1 Gen beta-kaseinu

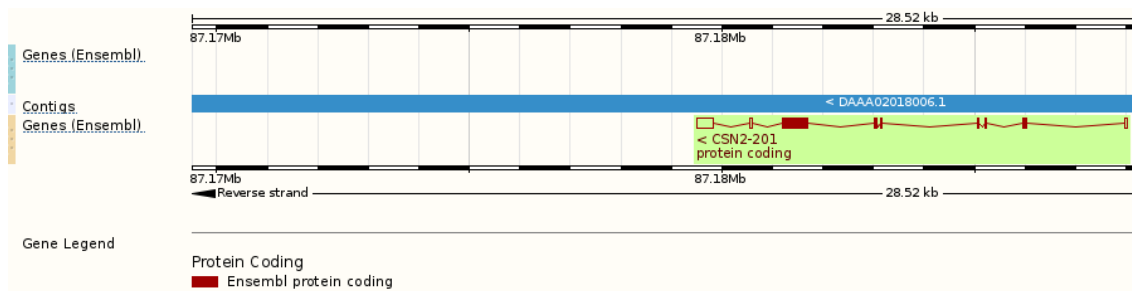
Gen *CSN2* je stejně jako všechny ostatní bovinní kaseiny lokalizován na 6. chromozomu, jak je znázorněno na obrázku 3 (Ferretti *et al.*, 1990). Je součástí malé genové rodiny, která kóduje k vápníku senzitivní kaseiny, jak bylo popsáno výše (kapitola 3.1.1.2). Tyto proteiny jsou specificky syntetizovány a sekretovány v prsní žláze během laktace, jako odpověď na steroidní a peptidové hormony. Informace o evoluční spojitosti k vápníku senzitivních kaseinů byly získány na základě studia cDNA. Dokonce i nepříbuzný kapa-kasein je geneticky spojený s touto rodinou. Samotný gen pro beta-kasein kóduje celou řadu proteinů, které se vyskytují v mléce. Jeho kompletní sekvenci DNA, včetně přilehlých oblastí, popsali Bonsing *et al.* (1988). Bovinní gen pro beta-kasein má délku zhruba 8,5 kb a obsahuje 9 exonů. Exony kódují odlišné části proteinů a mRNA. Gen také obsahuje několik různých DNA repetitivních elementů (Bonsing *et al.*, 1988). Struktura *CSN2* je znázorněna na obrázku 4 a 5.



Obr. 3: Lokalizace bovinního genu pro beta kasein na 6. chromozomu (NCBI, Gene ID: 281099, 2017)



Obr. 4: Schéma strukturní organizace transkripčních jednotek bovinního beta-kaseinu (převzato z: Martin *et al.*, 2002): Exony jsou označeny čísly 1-9. Černá barva značí oblasti na 3' a 5' konci, které nejsou translatovány. Bíle je označena ta část exonu, která kóduje signální peptid a šedě pak exony nebo části exonů kódující zralé proteiny. Velikosti exonů jsou udány v bp (dole pod každým exonem). Volná místa mezi exony značí introny.



Obr. 5: Struktura bovinního genu *CSN2* (Ensembl, 2017): Dle databáze *Ensembl* se délky některých exonů liší, oproti délkám uvedených v obrázku 4. Jde o exon 1 (50 bp), 5 (24 bp) a 9 (320 bp).

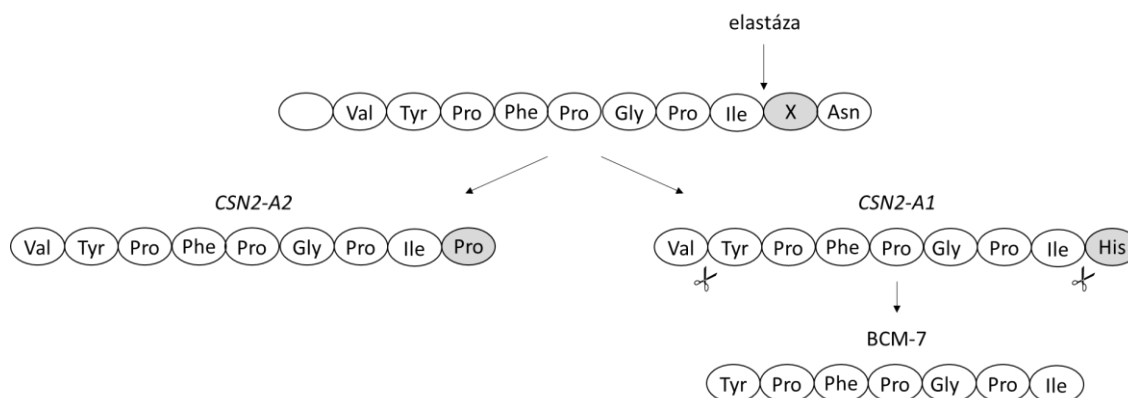
3.2.2 Polymorfismus beta-kaseinu

Genetická variabilita mléčných proteinů byla u skotu intenzivně a ve velkém rozsahu studována. Důležitý je zejména vztah mezi genetickými variantami a produkčními znaky (Caroli *et al.*, 2004). Polymorfismy v genu pro beta-kasein byly analyzovány již u celé řady plemen (Miluchová *et al.*, 2013). Do současnosti byla u skotu, v závislosti na plemeni, identifikována existence 13 různých polymorfismů v *CSN2* (Hanusová *et al.*, 2010). Konkrétně jsou to varianty *A1*, *A2*, *A3*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H1*, *H2* a *I* (Gallinat *et al.*, 2013). Miluchová *et al.* uvádějí jako 13. variantu alelu *X* (Miluchová *et al.*, 2009). Všechny tyto polymorfismy jsou v praxi velmi užitečné zejména pro identifikaci alel spojených s vyšším výtěžkem proteinů, vyšší dojivostí nebo se specifickými vlastnostmi mléka (Ferretti *et al.*, 1990).

3.2.2.1 Nejzastoupenější varianty

Nejběžnějšími variantami jsou varianty *A1* a *A2*, které byly identifikovány nejen u skotu, ale i u mnoha dalších mléčných plemen. Molekula beta-kaseinu se skládá z 209 aminokyselin, přičemž rozdíl mezi variantou *A1* a *A2* je pouze v jedné z nich a to na 67. pozici peptidového řetězce. Alela *A1* obsahuje histidin (sekvence DNA: CCT), kdežto alela *A2* prolin (CAT). Originální formou je *CSN2-A2*, která byla identifikována u starších plemen, jako jsou např. plemena zebu. Forma *CSN2-A1* se vyvinula teprve nedávno, a proto je přítomna u moderních plemen skotu. *CSN2-A2* redukuje sérový cholesterol a zvyšuje koncentraci LDL lipidů, které hrají důležitou roli v prevenci široké škály vaskulárních chorob u lidí (Hanusová *et al.*, 2010). Původní protein je také podobný lidskému beta-kaseinu, a to zejména ve způsobu jeho trávení (Miluchová *et al.*, 2013).

Metabolismus *CSN2-A1* je oproti metabolismu *CSN2-A2* jen částečně odlišný. *CSN2-A1* ale způsobuje vznik beta-kasomorfinu-7 (BCM-7; Hanusová *et al.*, 2010). Skupina beta-kasomorfinů (BCM), což jsou z mléka odvozené peptidy, byla farmakologicky popsána v letech 1970 (Miluchová *et al.*, 2013). BCM byly první identifikované peptidy s opoidní aktivitou, které byly odvozené od proteinů z potravy (Pihlanto-Leppälä, 2001). Délka peptidových řetězců beta-kasomorfinů je 4-11 aminokyselin. Všechny byly identifikovány a izolovány z mléka skotu. Vznik BCM-7 zajišťuje enzym elastáza, který štěpí peptidickou vazbu a uvolňuje tak jeho karboxylový konec. Některé epidemiologické studie naznačují, že konzumace *CSN2-A1* je u lidí, právě díky BCM-7, spojená s vyšším výskytem kardiovaskulárních chorob, jako je diabetes mellitus typu I a ischemická srdeční porucha (Miluchová *et al.*, 2013). Rozdílný metabolismus *A1* a *A2* je popsán na obrázku 6.



Obr. 6: Schematické znázornění uvolnění beta-kasomorfinu z beta-kaseinu *A1* (převzato z: Miluchová *et al.*, 2013)

3.2.2.2 Další varianty

Výskyt alely *B* není u skotu, v porovnání s výše uvedenými variantami, tak častý (kapitola 3.2.2.1). Podobně jako v případě alely *A1* dochází při gastrointestinálním proteolytickém trávení *CSN2-B* ke vzniku bioaktivního peptidu BCM-7 (Miluchová *et al.*, 2013). Varianty se však liší substitucí. Ta je u alely *B* v pozici 122 a zaměněn je arginin za serin. Výskyt varianty *B* se vyznačuje vyšším obsahem proteinů, kaseinů a tuku v mléce (Miluchová *et al.*, 2009). Dále je spojen s lepšími vlastnostmi mléka při výrobě sýra (Barroso *et al.*, 1999).

Alely *A3* a *C* se vyskytují vzácně. Varianta *A3* je ale spojena s vyšší doživostí (Miluchová *et al.*, 2009). Varianta *H* se od sekvence *A2* liší v pěti residuech (Han *et al.*, 2000). Rozdíly v aminokyselinách u jednotlivých variant *CSN2* uvádí tabulka 2.

Tab. 2: Lokalizace substitucí aminokyselin u některých variant beta-kaseinu (zdroj: Farrell *et al.*, 2004)

Varianta	Pozice a aminokyselina v proteinu													
	18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	122	137/138	152	?
<i>A1</i>						His								
<i>A2</i>	Ser-P	Arg	Ser-P	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	His	Ser	Leu/Pro	Pro	Gln
<i>A3</i>										Gln				
<i>B</i>						His					Arg			
<i>C</i>			Ser		Lys	His								
<i>D</i>	Lys													
<i>E</i>				Lys										
<i>F</i>						His							Leu	
<i>G</i>						His						Leu		
<i>H1</i>		Cys						Ile						
<i>H2</i>							Glu		Leu					Glu
<i>I</i>									Leu					

Novější studie Caroli *et al.* ukazuje, že se prolin na 67. pozici vyskytuje i u variant *A3*, *D*, *E*, *H2* a *I*, zatímco u variant *F* a *G* je to aminokyselina histidin. Tato studie potvrzuje, že nejběžněji se vyskytujícími variantami beta-kaseinu u turínského skotu jsou varianty *A1*, *A2* a *B*. Varianty *C* a *I* jsou poměrně časté, ostatní jsou pak vzácné a spíše se nevyskytují (Caroli *et al.*, 2016).

3.3 Zdravotní problémy u lidí spojené s konzumací mléka

3.3.1 The A2 Milk Company™

V roce 2000 byla na Novém Zélandu založena společnost The A2 Milk Company™. Firma byla založena Dr Corranem McLachlanem poté, co při svých studiích objevil, že různé proteiny v mléce mohou mít různý vliv na různé osoby. Základním objevem byla produkce několika typů beta-kaseinů v kravském mléce, zejména pak beta-kaseinu *A1* a *A2*. U většiny jedinců trpících problémy spojenými s konzumací běžného

kravského mléka, tedy tzv. A1 mléka, nedošlo při konzumaci A2 mléka k projevům intolerance. Konzumace A2 mléka může také eliminovat potenciální zdravotní rizika, spojená s dlouhodobou konzumací běžného mléka, která byla popsána výše (kapitola 3.2.2.1).

McLachlan také objevil, že původní variantou proteinu byla právě varianta A2. Varianta A1 se postupně rozšířila díky moderním zemědělským postupům z evropských do světových stád, což potvrdily i další studie (viz kapitola 3.2.2.1). McLachlan věděl, že se ještě vyskytují zvířata, která produkují mléko obsahující A2 variantu beta-kaseinu. Důležité ale bylo najít bezpečný a neinvazivní způsob, jak tato zvířata identifikovat a zajistit tak produkci přírodního a čistého A2 mléka, tedy zcela prostého A1 beta-kaseinu. Na těchto základech pak firma vznikla. Nyní firma působí na australském, novozélandském, britském, americkém a čínském trhu.

V případě společnosti The A2 Milk CompanyTM můžeme hovořit o komerčním využití výhod spojených s A2 mlékem neboli rozdílu mezi alelami A1 a A2. Od roku 2003 je v Austrálii a na Novém Zélandu prémiovou značkou. Reakce spotřebitelů na tyto produkty byla velmi pozitivní. S rostoucí poptávkou došlo k rozšíření distribuce a expanzi firmy na další zahraniční trhy (The A2 Milk CompanyTM, 2017).

3.3.2 Alergie na mléko

Dalším problémem spojeným s konzumací mléka je alergie, kterou může mléko, krom výše zmíněných opoidních účinků (kapitola 3.1), u některých jedinců způsobit. Pojem alergie se rozumí pozměněná nebo abnormální reakce, která vznikne při kontaktu mezi cizím proteinem (tzv. alergenem) a tělní tkání, která je k němu citlivá. Alergen může dorazit k cílové tkáni prostřednictvím přímého kontaktu s kůží nebo sliznicí, ale také krevním řečištěm po absorpci. Alergie na kravské mléko je klinicky definována jako abnormální imunologická reakce na mléčné proteiny. Kravské mléko obsahuje 20 proteinů, které mohou alergickou reakci vyvolat. Mezi ně patří mimo jiné kaseiny, tedy i výše popsaný beta-kasein (kapitola 3.2). Hlavním alergenem je však β -laktoglobulin. U alergické reakce může jít o interakci jednoho či více těchto bílkovin s jedním či více imunitními mechanismy, která vyústí v bezprostřední reakci. Vyvolané reakce, které neprobíhají prostřednictvím imunitního systému, jsou definovány jako intolerance k proteinům kravského mléka. Alergie na kravské mléko je jednou z nejběžnějších potravinových alergií u dětí, ale vyskytuje se i u dospělých. Symptomy alergické reakce se mohou u citlivého jedince objevit několik hodin nebo i několik dní po

požití mléka. Již bylo popsáno široké spektrum symptomů, jako gastrointestinální, respirační, kožní problémy a mimo jiné také systemické anafylaktické příznaky. Některé z těchto symptomů jsou podobné, jako u reakce senzitivních jedinců na *A1* formu beta-kaseinu (El-Agamy, 2006).

3.3.3 Ostatní

Syrovátkové bílkoviny obecně obsahují opoidní sekvence ve své primární struktuře, krom výše zmíněného β -laktoglobulinu (kapitola 3.3.2) tedy i α -laktalbumin. Bioaktivními peptidy vznikajícími při proteolýze jsou α - a β -laktorfiny. Opidní aktivita α -laktorfinu je v porovnání s β -laktorfinem nižší, za to však konzistentnější (Pihlanto-Leppälä, 2001).

3.4 Další faktory ovlivňující kvalitu mléka

Složení mléka není závislé pouze na genotypu zvířete. Je ovlivněno řadou faktorů, jako fáze laktace, parita, věk otelení, dokonce i roční období. Některé studie prokázaly, že na složení mléka má vliv i krmení. Konkrétními složkami mléka, které jsou ovlivněny zmíněnými faktory, jsou obsah tuku, proteinů, sušiny, kaseinů a laktózy. Poměr mléčných složek závisí také na věku a plemeni zvířete. Všechny uvedené faktory lze považovat za faktory vnější a při šlechtění je nutné je brát v potaz. Kvalita a složení mléka totiž hrají významnou roli v mléčném průmyslu a přímo souvisí s dojivostí (Sahin *et al.*, 2016).

3.5 Použitá plemena

3.5.1 Plemeno jersey

Jerseyské plemeno (Obr. 7) je původem ze stejnojmenného ostrova v Lamanšském průlivu u francouzského pobřeží. Populace zvířat na ostrově se po řadu let chovala v čistokrevné plemenitbě. Patří k nejstarším dojným plemenům vůbec, a to ve světovém měřítku. V Anglii bylo známé již před rokem 1771. Oblíbené bylo zejména pro mléčnou produkci, která byla vhodná pro výrobu másla a sýrů (Český svaz chovatelů jerseykého skotu, 2017). Ze stejného množství mléka lze vyrobit až o 20 % více sýrů a 30 % více másla, je-li použito mléko jerseykého skotu (Náš chov, 2013). I když je plemeno jersey fyzicky nejmenším dojným plemenem na světě, jeho mléko obsahuje nejvyšší podíl bílkovin a tuků ze všech ostatních dojných plemen, díky čemuž se hodí k výše zmíněným účelům (Český svaz chovatelů jerseykého skotu, 2017). Navíc jsou jerseyké krávy schopny vyprodukovat v průměru 16x více kg mléka za laktaci, než je jejich tělesná

hmotnost (Náš chov, 2013). Nejvíce je jerseyké plemeno rozšířeno na Novém Zélandě. Po roce 1990 se plemeno světově rozšířilo. V USA se v tomto období začalo využívat k vysoké a komerční produkci (Český svaz chovatelů jerseykého skotu, 2017).

V současnosti se o jerseykém plemenu často hovoří jako o plemenu budoucnosti, které nemá mezi ostatními dojnými plemeny konkurenci. Některé důvody, proč tomu tak je, byly již popsány. Z těch dalších je to například fakt, že dojnice mají nejdelší produkční život (23 % krav je na 5. a vyšší laktaci). Plemeno má také v době prvního připouštění nejnižší průměrný věk (25 měsíců). I telení je u plemena relativně snadné. Plemeno se vyznačuje nejvyšším počtem odchovaných telat na krávu. Díky složení mléka je jeho cena za litr nejvyšší, platí-li mlékárna za mléčné složky. Na rozdíl od mléka ostatních plemen obsahuje mnohem více sušiny, zvláště pak proteinových částic (o 20 % více), ale také třeba vápníků (o 15 % více). Uvedené faktory dělají toto plemeno ideálním pro budoucí mléčný trh ČR. V západní Evropě a zámoří, kde mlékárny kladou důraz na mléčné složky a platí za ně, je toto platné již dnes. Ve vyspělých státech je v praxi aplikován nákup menšího množství kvalitnějšího mléka, což je pro mlékárny mnohem výhodnější. Plemeno je velmi vnímavé k chovatelskému prostředí. Na druhé straně je odolné vůči horším klimatickým podmínkám, zejména teplým stresům a přímému slunečnímu záření. Jerseyké plemeno je také ideální vzhledem k produkci odpadních dusíkatých látek. Jedna kráva plemene jersey se totiž rovná 1,4 krávy holštýnského plemene, co se dusíkatých odpadů týče, na jejichž produkci bude, z hlediska ochrany životního prostředí v souvislosti se zemědělstvím, brán v budoucnu zřetel. Všechny uvedené znaky dělají jerseyké plemeno plemenem nejvíce ekonomickým a s velkým potenciálem do budoucnosti (Náš chov, 2013).



Obr. 7: Plemeno jersey (zdroj: <http://bit.ly/21V8TdZ>)

3.5.2 Plemeno brown swiss

Švýcarský hnědý skot (Obr. 8) je jedním z nejstarších kulturních plemen (Klub chovatelů brown swiss, 2017). Pochází z hornatého švýcarského kantonu Swyz (600-2000 m n. m.), odkud se postupně rozšířilo do všech oblastí Alp. Dnes už je plemeno rozšířeno prakticky celosvětově (Svaz chovatelů skotu plemene brown swiss, 2009). Zvířata mají střední až větší tělesný rámec. Jsou typicky celoplášťově hnědá až černá. Konce rohů, paznehty a mulce mají zbarveny černě. Někdy se u nich vyskytuje světlejší zbarvení kolem mulce a tmavý pruh přes hřbet. Plemeno brown swiss může být zařazováno mezi plemena s kombinovanou užitkovostí, tedy jak s mléčnou, tak i masnou, přičemž mléčná užitkovost jednoznačně převažuje. Výhodou tohoto plemene je zejména jeho dobrý zdravotní stav, nenáročnost, pevná konstituce (vč. končetin) a dlouhověkost. Dojnice se dostávají až na 14 laktací (Klub chovatelů brown swiss, 2017). Díky těmto vlastnostem je plemeno jedním z nejpočetnějších na světě. (Svaz chovatelů skotu plemene Brown Swiss, 2009).



Obr. 8: Plemeno brown swiss (zdroj: goo.gl/fVtE1f)

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Analyzované vzorky

Určení genotypů *CSN2* bylo provedeno u souboru krav plemene jersey a brown swiss, které pocházely z 9 chovů. Celkem bylo testováno 240 kusů zvířat. Všechny vzorky byly analyzovány v laboratoři Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat.

4.1.2 Použité přístroje a software

Přístroje jsou v seznamu uvedeny v pořadí, ve kterém byly používány při práci (viz kapitola 4.2):

- vortex
- centrifuga Mikro 20 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE) E-BOX VX5 (Schoeller, Praha, ČR)
- termální blok
- automatický termální cykler PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Bio – Rad, Hercules, USA)
- váha Scaltec SBA 41 (Sartorius, Bohemia, USA) Vortex Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, LT)
- externí zdroj stejnosměrného napětí
- Elektronick UV Transilluminator (Ultra LŪM, Claremont, USA), elektrický zdroj Power Pac 300 (Bio – Rad, Hercules, USA) a fotoaparát Powershot G6 (Canon, Tokyo, JPN)
- automatický centrální cykler GeneAmp®PCR System 9700 (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA)
- genetický analyzátor ABI PRISM® 3500 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- program Sequence Analysis Software v5.4 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- program Sequence Scanner v1.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

4.2 Metodika

Prvním krokem a základem praktické části práce bylo vytvoření databáze, která obsahuje identifikační údaje zvířat, údaje o jejich původu, plemeni, genotypu a laktaci.

4.2.1 Izolace DNA

Pro izolaci DNA ze vzorků krve byl použit komerční kit Genomic DNA Mini Kit (Blood/cultured Cell) od firmy Geneaid (Nová Tchaj-pej, TWN).

Postup (Blood Protocol) izolace je následující: 300 μ l krve napipetujeme do zkumavky (1,5 ml), přidáme 900 μ l lyzačního pufru RBC a promícháme. Inkubujeme 10 min. při pokojové teplotě. Centrifugujeme 5 min. při 5 600 rpm. Po centrifugaci kompletně odsajeme supernatant. Přidáme dalších 100 μ l lyzačního pufru, 200 μ l GB pufru a promícháme. Inkubujeme při teplotě 60 °C po dobu 10 min. v termálním bloku. V průběhu inkubace obsah zkumavek každé 3 min. promícháváme inverzí zkumavky. Po inkubaci by měl být lyzát čirý. V této fázi si předehřejeme eluční pufr, který musí mít teplotu 60 °C. K lyzátu přidáme 200 μ l absolutního etanolu a po dobu 10 s směs promícháváme. Precipitát musí být po tomto kroku rozpuštěn. CD kolonu umístíme do sběrné zkumavky (o objemu 2 ml). Směs po inkubaci přeneseme na tuto kolonu. Centrifugujeme 5 min. při 12 500 rpm. Roztok vylejeme a sběrnou zkumavku důkladně osušíme. Na kolonu přidáme 400 μ l pufru W1 a centrifugujeme 30-60 s při 12 500 rpm. Roztok ze sběrné zkumavky vylejeme, osušíme ji, kolonu vrátíme zpět, na ni přidáme 600 μ l mycího pufru. Opakujeme centrifugaci. Vylejeme roztok ze sběrné zkumavky a znovu centrifugujeme 3 min. při 12 500 rpm. Kolonu přeneseme do čisté mikrocentrifugační zkumavky (o objemu 1,5 ml). Přidáme 100 μ l předehřátého elučního pufru, ideálně na střed kolony. Necháme 3 min. odstát, abychom zajistili kompletní adsorpci pufru. Pro eluci čisté DNA centrifugujeme 30 s při 12 500 rpm. Na závěr výsledky izolace ihned vizualizujeme na 1,5% agarózovém gelu (viz kapitola 4.2.2, Obr. 10). Před nanesením na gel byly vzorky promíchány se sacharózou a bromfenolovou modří. Elektroforetická separace proběhla při 120 V po dobu 20 min. Vzorky DNA byly pro další práci uchovávány při -20 °C.

4.2.2 Agarózová gelová elektroforéza

Horizontální agarózová gelová elektroforéza byla využita pro ověření přítomnosti a čistoty DNA po izolaci z krve a dále pro ověření přítomnosti amplifikovaných segmentů

po polymerázové řetězové reakci (PCR). V prvním případě byl použit gel o koncentraci 1,5 %, po PCR o koncentraci 3 %. Složky gelu:

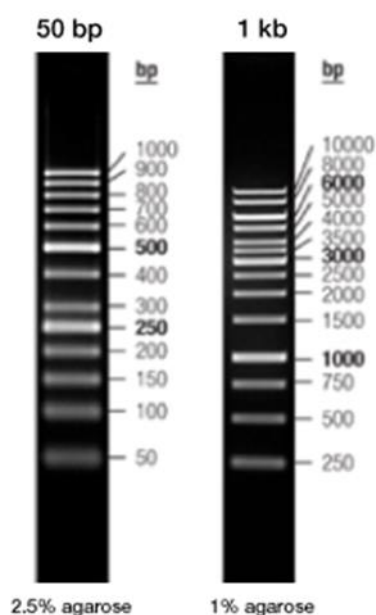
- agaróza Agarose (SERVA, DE)
- 1 x TBE pufr
- ethidium bromid – 0,5 mg/ml

Komponenty přidávané ke vzorkům:

- 40% sacharóza
- 0,25% bromfenolová modř

Ethidium bromid byl použit jako vizualizační barvivo. Jako nanášecí pufr byla používána sacharóza. Při nanášení PCR produktu na gel nebylo třeba používat nanášecí pufr. PPP Master Mix, použitý v reakční směsi pro PCR (Tab. 3), obsahuje nanášecí aditiva pro přímou vizualizaci na gelu. K ověření výsledku elektroforetické separace po izolaci DNA a PCR byly použity tyto hmotnostní standardy (Obr. 9):

- 1 kb DNA Leader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- 50 bp DNA Leader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)



Obr. 9: Použité hmotnostní standardy (zdroj: goo.gl/QOkDZv): 1 kb hmotnostní standard byl použit při vizualizaci výsledků izolace DNA a 50 bp v případě PCR.

Hmotnostní standardy také sloužily pro orientační určení velikosti produktů. Vlastní elektroforéza probíhala v TBE pufru při 120 V, po izolaci DNA 20 min. a po PCR

25 min. Optimální velikost napětí je 5 V/cm. Po elektroforetické separaci byly vzorky vizualizovány pomocí Elektronické UV Transilluminator. Pro pořízení záznamu byl použit fotoaparát Canon Powershot G6.

4.2.3 PCR

Pro namnožení DNA po izolaci, tedy výchozího materiálu pro vlastní sekvenaci, byla použita metoda PCR podle McLachlana (2006). Prvním krokem bylo namíchání reakční směsi pro PCR na konečný objem 15 μ l. V reakční směsi byly použity tyto reagensy:

- ultračistá H₂O (Top – Bio s.r.o., Praha, ČR)
- PPP Master Mix (Top – Bio s.r.o., Praha, ČR) - 150 mM Tris–HCl (pH 8,8), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02 % Tween, 20,5 mM MgCl₂, 400 μ M dNTP (každý), 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory, aditiva
- roztok primerů CSN2 a CSN2 S1 (IDT Inc., Coralville, USA) – zásobní roztok 100 pmol/ μ l, pracovní roztok 10 pmol/ μ l

Konečné koncentrace jednotlivých složek jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 3: Složení reakční směsi pro PCR

Složka	Množství (μ l)
destilovaná H ₂ O	4,5
PPP mix	7,5
primer A	1
primer B	1
DNA	1
celkem	15

Reakční směs byla připravována na ledu. Použité primery uvádí tabulka 4. Příímý primer pro gen *CSN2* byl převzat z práce McLachlana (2006). Zpětný primer označený jako *CSN2 S1* byl navržen pro potřeby této práce.

Tab. 4: Charakteristika použitých primerů

Gen	Primery	Převzato z	Délka primeru (bp)	T _m (°C) z oliga	GC (%)
CSN2	F: CCT TCT TTC CAG GAT GAA CTC CAG G	McLachlan (2006)	25	60,2	52
CSN2 S1	R: TAGGGAAGGGCATTCTTTGTGCTT		25	60,2	5

Nakonec byly zkumavky vloženy do automatického termálního cyklu PTC-200, kde došlo k amplifikaci. Reakční podmínky, podle kterých PCR proběhla, jsou uvedeny v tabulce 5. Fáze denaturace, annealingu a elongace se v tomto pořadí po sobě opakovaly ve 30 cyklech.

Tab. 5: Teplotní profil PCR

Proces	Teplota (°C)	Čas (min.)
úvodní denaturace	95	2
30x {	denaturace	95
	annealing primerů	60
	elongace	72
závěrečná elongace	72	7
	4	∞

Produkt vzniklý reakcí, tedy amplifikovaný specifický fragment, má délku 223 bp. Pokud produkt nebyl hned použit pro další práci, uchovával se při teplotě -20 °C. Přítomnost PCR produktu byla bezprostředně po reakci vizualizována elektroforeticky na 3% agarózovém gelu (Obr. 11) podobně, jako po izolaci. Elektroforéza však trvala 25 min.

4.2.4 Sekvenace

Pro analýzu genotypu zvířat v lokusu *CSN2* byla použita sekvenace. Původně navržená metoda PCR-RFLP, která byla obsažena v metodice podle McLachlana (2006), neposkytovala optimální výsledky. Proto byla nakonec metodika optimalizována a pro stanovení polymorfismu v *CSN2* zvolena sekvenace. Prvním krokem bylo opět namíchání reakční směsi, tentokrát za použití BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit

v3.1 (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA). V tomto případě byl konečný objem reakční směsi 10 μ l a byly v ní použity tyto komponenty:

- ultračistá H₂O (Top – Bio s.r.o., Praha, ČR)
- roztok primeru CSN2 (IDT Inc., Coralville, USA) – zásobní roztok 100 pmol/ μ l, pracovní roztok 10 pmol/ μ l
- reakční mix - 2,5 x Ready Reaction Mix
- sekvenční pufr - 5 x Sequencing Buffer

Konečné koncentrace jednotlivých složek reakce uvádí tabulka 6.

Tab. 6: Složení reakční směsi pro sekvenaci

Složka	Množství (μ l)
destilovaná H ₂ O	7,215
reakční mix	0,25
pufr	1,875
primer A	0,16
DNA	0,5
celkem	10

Amplifikace templátu probíhala v cykleru GeneAmp®PCR System 9700 za teplotních podmínek uvedených v tabulce 7. Fáze denaturace, annealingu a elongace se po sobě opakovaly ve 25 cyklech.

Tab. 7: Teplotní profil PCR pro sekvenaci

Proces	Teplota (°C)	Čas (s)	
úvodní denaturace	96	60	
25x {	denaturace	96	10
	annealing primerů	50	5
	elongace	60	240
		4	∞

Výsledná reakční směs po PCR amplifikaci byla purifikována pomocí kitu BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA).

Purifikace se provádí z důvodu odstranění terminátorů, které nebyly inkorporovány. Reagencie nutné k přečištění směsi jsou následující:

- XTerminator Solution
- SAM Solution

Nejdříve byla hotová reakční směs 1 min. centrifugovat při 13 000 rpm. Ke směsi bylo přidáno 5 μ l XTerminator Solution a 22 μ l SAM Solution. Zkumavky byly vortexovány 30 min. při 2 000 rpm. Následně bylo třeba vzorky připravit pro samotnou sekvenaci. Po vortexu byly vzorky krátce stočeny. Ze zkumavky bylo odebráno vždy 20 μ l svrchní tekuté fáze, které byly přeneseny na plato. Následně bylo plato se vzorky vloženo do genetického analyzátoru ABI PRISM® 3500. Toto zařízení využívá k analýze kapilární elektroforézu (s kapilárou o délce 50 cm a analýza probíhala za použití polymeru POP7). Získaná data byla vyhodnocena programy Sequence Analysis Software v5.4 a Sequence Scanner v1.0.

4.2.5 Matematicko-statistická analýza

4.2.5.1 Výpočet frekvencí alel a genotypů

Určení frekvencí alel a genotypů u výsledného polymorfismu bylo provedeno dle tabulky 8 a 9.

Tab. 8: Určení frekvence genotypů (Hartl and Clark, 2007)

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
AA	D	$d = \frac{D}{N}$
AC	H	$h = \frac{H}{N}$
CC	R	$r = \frac{R}{N}$
Σ	$D + H + R = N$	$d + h + r = 1$

Kde:

D, H, R ... absolutní frekvence genotypů

d, h, r ... relativní frekvence genotypů

Tab. 9: Výpočet frekvence alel (Hartl and Clark, 2007)

Alela	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
A	P	$p = \frac{2D + H}{2N} = d + \frac{1}{2}$
C	Q	$q = \frac{2R + H}{2N} = r + \frac{1}{2}$
Σ	$P + Q = 2N$	$p + q = 1$

Kde:

D, H, R	... absolutní frekvence genotypů
d, h, r	... relativní frekvence genotypů
P, Q	... absolutní frekvence alel
p, q	... relativní frekvence alel
N	... absolutní frekvence všech jedinců

4.2.5.2 Výpočet Hardy-Weinbergovy rovnováhy

Zjištění geneticky rovnovážného stavu u zkoumaného souboru bylo provedeno podle Hardy-Weinbergova zákona. Byla stanovena tato nulová hypotéza (H_0): mezi očekávanými a pozorovanými (skutečnými) četnostmi genotypů ve sledovaném souboru zvířat není rozdíl. Platí, že:

$$1 = p^2 + 2pq + q^2$$

Kde:

p, q	... relativní frekvence alel
------	------------------------------

Pro vyhodnocení byl použit tzv. chí kvadrát neboli test dobré shody. Ten porovnává skutečné genotypové frekvence s genotypovými frekvencemi očekávanými za geneticky rovnovážného stavu:

$$\chi^2_{(n-p-1)} = \Sigma \frac{(O - E)^2}{E}$$

Kde:

O	... pozorovaná četnost genotypů
E	... očekávaná četnost genotypů
$(n - p - 1)$... výpočet stupně volnosti

Stupeň volnosti pro gen se třemi genotypy a dvěma alelami je roven 1. Vzorce pro výpočet Hardy-Weinbergovy rovnováhy byly použity podle Hartla a Clarka (2007).

4.2.5.3 Asociační analýza

Asociační analýza genu *CSN2* s parametry mléčné užitkovosti byla provedena pomocí programu SAS verze 9.4 (SAS Institute Inc., 2016). Určení průkaznosti mezi genotypy bylo vypočteno pomocí zobecněného lineárního modelu se dvěma pevnými faktory (procedura GLM). Jako pevné faktory byly zvoleny efekt plemene a efekt genotypu. Jako regrese byly navrženy dny laktace.

Výpočet asociační analýzy byl proveden podle této rovnice:

$$y_{ij} = \mu + \text{gen}_i + \text{plem}_j + \text{lakt}(x_{ij} - \bar{x}) + e_{ij}$$

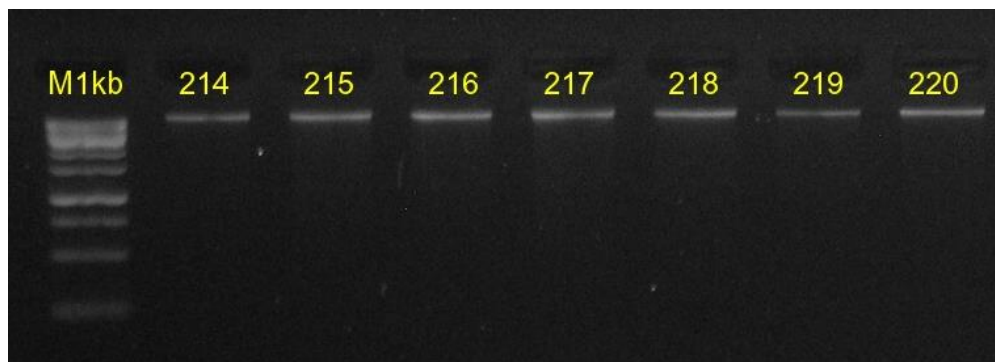
Kde:

y_{ij}	... sledovaný znak
μ	... průměrná hodnota sledovaného znaku
gen_i	... pevný efekt genotypu lokusu <i>CSN2</i> ($i = AA, AC, CC$)
plem_j	... pevný efekt plemene ($j = 1, 2$)
$\text{lakt}(x_{ij} - \bar{x})$... regrese na laktační dny
e_{ij}	... reziduální efekt (náhodná chyba všech pozorování)

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Izolace

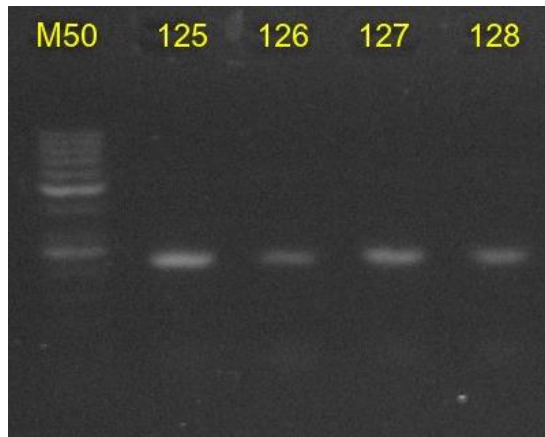
Jak bylo popsáno výše (kapitola 4.2.2), výsledky izolace DNA byly ověřeny horizontální agarózovou gelovou elektroforézou. Velikost genomové DNA je cca 10 000 bp. Na obrázku 10 je zobrazen prosvícený gel s výsledky izolace.



Obr. 10: Ukázka vizualizace výsledků izolace DNA ze vzorků krve (vzorek 214-220): gel – 1,5 %, hmotnostní standard – od 10 000 bp do 250 bp (viz Obr. 9, velikost fragmentů klesá v tomto pořadí: 10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 500, 3 000, 2 500, 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500 a 250 bp), vizualizační barvivo – ethidium bromid

5.2 PCR

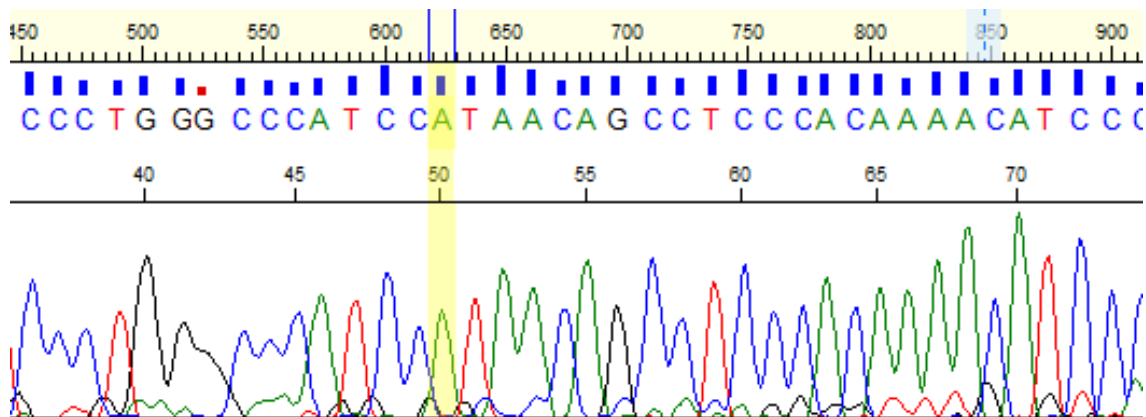
Polymorfismus genu *CSN2* byl amplifikován pomocí PCR. Délka amplifikovaného fragmentu je 223 bp. Pro ověření amplifikace PCR produktu byla použita horizontální agarózová gelová elektroforéza. Na obrázku 11 je zobrazen prosvícený gel s amplifikovanými fragmenty.



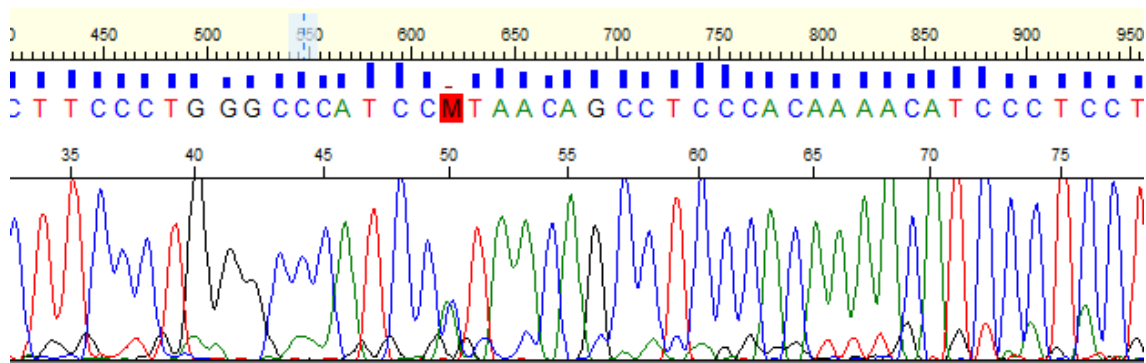
Obr. 11: Ukázka vizualizace výsledků PCR (vzorek 125-128): gel – 3 %, hmotnostní standard – od 1 000 bp do 50 bp (Obr. 9, velikost fragmentů klesá v tomto pořadí: 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 a 50 bp), vizualizační barvivo – ethidium bromid

5.3 Sekvence

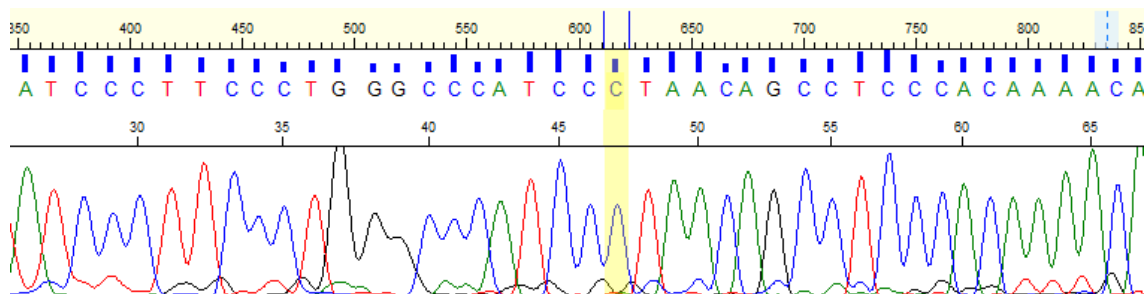
Genotyp zvířat v lokusu *CSN2* byl určen pomocí sekvenování. Polymorfní alela je zobrazena na obrázcích 12, 13 a 14.



Obr. 12: Ukázka genotypu AA (A1A1) v genu *CSN2* – vzorek 227: Zkoumaný polymorfismus je vyznačen žlutě.



Obr. 13: Ukázka genotypu AC (A1A2) v genu CSN2 – vzorek 229: *Zkoumaný polymorfismus je zvýrazněn červeně.*



Obr. 14: Ukázka genotypu CC (A2A2) v genu CSN2 – vzorek 230: *Zkoumaný polymorfismus je vyznačen žlutě.*

5.4 Matematicko-statistická analýza

5.4.1 Výpočet frekvencí alel a genotypů

Výpočty frekvencí alel a genotypů byly provedeny na dvou souborech dat. Prvním z nich byl soubor o 237 jedincích, jejichž krev jsme měli k dispozici. U 3 jedinců se nepodařilo genotypy určit z důvodu nekvalitních vzorků krve. V tomto případě šlo tedy o celkový soubor zkoumaný v této práci (všechny vzorky), tedy 240 jedinců, z nichž bylo 78 plemene brown swiss (BSW) a 162 plemene jersey (J), jak udává tabulka 10.

Druhý soubor obsahuje zvířata vybraná z prvního celkového souboru pro asociační analýzu. Jednalo se o 126 zvířat, 45 plemene brown swiss a 81 jerseyjského plemene (Tab. 15). Z původního souboru byli vybráni pouze ti jedinci, u kterých byly k dispozici parametry mléčné užitkovosti (respektive hodnoty sledovaných fenotypových znaků). Důvodem chybějících údajů v databázi bylo vyřazení zvířete kvůli nemoci, nebo stáří

zvířete, kdy se jednalo buď o tele, nebo o dojnici v právě probíhající 1. laktaci. Výpočty byly v obou případech provedeny dle tabulek 8 a 9.

Tab. 10: Zastoupení plemen ve zkoumaném souboru

Plemeno	Zastoupení v populaci	Procentuální zastoupení v populaci
BSW	78	32,50
J	162	67,50
Σ	240	100,00

Tab. 11: Absolutní a relativní frekvence genotypů genu *CSN2*

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
AA	12	0,0506
AC	77	0,3249
CC	148	0,6245
Σ	237	1,0000

Tab. 12: Absolutní a relativní frekvence alel genu *CSN2*

Alela	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
A	101	0,2131
C	373	0,7869
Σ	474	1,0000

Ve zkoumaném souboru o 237 jedincích byl nejvíce zastoupen genotyp *CC* (*A2A2*) a to u 62,45 % jedinců. Druhým nejpočetnějším byl genotyp *AC* (*A1A2*) u 32,49 % jedinců. U 5,06 % jedinců byl identifikován genotyp *AA* (*A1A1*), což je genotyp s nejmenším zastoupením ve zkoumaném souboru. Co se týče zastoupení alel, alela *A* (*A1*) byla v souboru zastoupena s frekvencí 21,31 % a alela *C* (*A2*) s frekvencí 78,69 %. U 3 jedinců se nepodařilo genotypy lokusu *CSN2* určit z důvodu nekvalitních vzorků, jak bylo uvedeno výše.

Tab. 13: Absolutní a relativní frekvence genotypů *CSN2* u jednotlivých plemen

Genotyp	BSW		J	
	Absolutní frekvence	Relativní frekvence	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
AA	4	0,0533	8	0,0494
AC	27	0,3600	50	0,3086
CC	44	0,5867	104	0,6420
Σ	75	1,0000	162	1,0000

Tab. 14: Absolutní a relativní frekvence alel genu *CSN2* u jednotlivých plemen

Genotyp	BSW		J	
	Absolutní frekvence	Relativní frekvence	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
A	35	0,2333	66	0,2037
C	115	0,7667	258	0,7963
Σ	150	1,0000	324	1,0000

Zastoupení jednotlivých genotypů a alel s ohledem na plemeno udává tabulka 13 a 14. Pořadí četností se u nich nelišilo. Nejvíce byl zastoupen genotyp *CC* (*A2A2*), na druhém místě genotyp *AC* (*A1A2*) a nejméně genotyp *AA* (*A1A1*). U plemene brown swiss byla zjištěna tato frekvence genotypů: 58,67 % *CC* (*A2A2*), 36 % *AC* (*A1A2*) a 5,33 % *AA* (*A1A1*). Alely se u plemene brown swiss vyskytovaly s touto frekvencí: 76,67 % *C* (*A2*) a 23,33 % *A* (*A1*). Jerseyké plemeno mělo frekvenci genotypů 64,20 % *CC* (*A2A2*), 30,86 % *AC* (*A1A2*) a 4,94 % *AA* (*A1A1*) a frekvenci alel 79,63 % *C* (*A2*) a 20,37 % *A* (*A1*).

Níže jsou uvedeny výsledky pro soubor o 126 jedincích (Tab. 15, 16, 17, 18 a 19). Opět jde o zastoupení plemen, absolutní a relativní frekvence alel a genotypů. Tyto výpočty byly provedeny z důvodu zmíněného na začátku této kapitoly.

Tab. 15: Zastoupení plemen ve vybraném souboru jedinců – jedinci s daty mléčné užitkovosti

Plemeno	Zastoupení v populaci	Procentuální zastoupení v populaci
BSW	45	35,71
J	81	64,29
Σ	126	100,00

Tab. 16: Absolutní a relativní frekvence genotypů genu *CSN2* ve vybraném souboru jedinců

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
AA	4	0,0317
AC	46	0,3651
CC	76	0,6032
Σ	126	1,0000

Tab. 17: Absolutní a relativní frekvence alel genu *CSN2* ve vybraném souboru jedinců

Alela	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
A	54	0,2143
C	198	0,7857
Σ	252	1,0000

Ve vybraném souboru o 126 jedincích byl nejvíce zastoupen genotyp *CC* (*A2A2*), který byl identifikován u 60,32 % jedinců. Dále to byl genotyp *AC* (*A1A2*) u 36,51 % jedinců a genotyp *AA* (*A1A1*) u 3,17 % jedinců. V tomto souboru převládá výskyt alely *C* (*A2*), která byla zastoupena 78,57 % jedinců. Alela *A* (*A1*) byla identifikována u 21,43 % zvířat.

Tab. 18: Absolutní a relativní frekvence genotypů *CSN2* u jednotlivých plemen v souboru jedinců vybraných pro asociační analýzu

Genotyp	BSW		J	
	Absolutní frekvence	Relativní frekvence	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
AA	2	0,0444	2	0,0247
AC	17	0,3778	29	0,3580
CC	26	0,5778	50	0,6173
Σ	45	1,0000	81	1,0000

Tab. 19: Absolutní a relativní frekvence alel genu *CSN2* u jednotlivých plemen v souboru jedinců vybraných pro asociační analýzu

Genotyp	BSW		J	
	Absolutní frekvence	Relativní frekvence	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
A	21	0,2333	33	0,2037
C	69	0,7667	129	0,7963
Σ	90	1,0000	162	1,0000

Zjištěná zastoupení genotypů i alel jsou u jednotlivých plemen v souladu s výsledky získanými pro celkový soubor (tj. 240 zvířat). U plemene brown swiss byla frekvence genotypů 57,78 % *CC* (*A2A2*), 37,78 % *AC* (*A1A2*) a 4,44 % *AA* (*A1A1*). Alely měly frekvenci 76,67 % *C* (*A2*) a 23,33 % *A* (*A1*). U plemene jersey byla frekvence genotypů následující: 61,73 % *CC* (*A2A2*), 35,8 % *AC* (*A1A2*) a 2,47 % *AA* (*A1A1*). Frekvence alel byla 79,63 % *C* (*A2*) a 20,37 % *A* (*A1*).

5.4.1.1 Diskuse

Z výsledků Gallinata *et al.* (2013) je patrné, že u plemene jersey byla nejvíce zastoupena alela *A2* (*C*; 63 %), dále pak alela *B* (26 %). Zastoupení 5 % bylo zjištěno u alely *A1* (*A*). Gen *CSN2* byl v tomto případě sekvenován u celkem 319 jedinců.

Dle studie Cecchinata *et al.* (2014), která byla provedena u 1 271 krav plemene brown swiss, byla nejvíce zastoupena alela *A* (*A1*) s frekvencí 0,23 (tj. 23 %). Alela *C* (*A2*) byla v populaci zastoupena s frekvencí 0,16 (16 %).

Zastoupením genotypů lokusu *CSN2* se také zabývali například Miluchová et al. (2009). V této práci bylo analyzováno 89 zvířat plemene Slovenského Pinegavského skotu. V této populaci byl nejvíce zastoupen genotyp *AIA2* (*AC*) a to u 51,68 % zvířat. Genotyp *AIAI* (*AA*) byl zastoupen u 30,34 % a genotyp *A2A2* (*CC*) u 17,98 % jedinců. Ze získaných údajů byly také určeny frekvence alel, kdy alela *AI* (*A*) byla zastoupena u 56,18 % a alela *A2* (*C*) u 43,82 % zvířat. Velmi podobné výsledky u populace holštýnského skotu o 97 jedincích získali i Hanusová et al. (2010).

Holštýnský skot je nejrozšířenějším plemenem na světě. Je to zejména díky jeho vysoké mléčné užitkovosti (Sambraus, 2006). Z tohoto důvodu porovnávám výsledky i s tímto plemenem.

V práci Hecka et al. (2009) pocházely vzorky od 1 912 krav plemene holštýnského skotu. Robustnost souboru dat pro matematicko-statistické analýzy je v tomto případě velkou výhodou. Nejvíce zastoupenou alelou byla alela *A2* (*C*; 69,2 %). Alela *AI* (*A*) byla identifikována u 28,5 % zvířat. Co se týče genotypů, nejčastější výskyt byl zaznamenán u genotypu *A2A2* (*CC*) a to u 916 zvířat. Genotyp *AIA2* (*AC*) byl zjištěn u 752 a genotyp *AIAI* (*AA*) u 159 jedinců.

Při porovnávání výsledků různých studií, jak u frekvencí alel, tak i genotypů, je třeba brát v potaz velikost studované populace a plemeno. V případě této práce připisují rozdíly ve výsledcích, oproti uvedeným studiím, právě velikosti studovaného souboru. Cecchinat et al. (2014) identifikovali, oproti mým výsledkům, vyšší zastoupení alely *A* (*AI*) ve zkoumané populaci.

Co se týče zastoupení genotypů *CSN2*, výsledky mé práce částečně odpovídají studii Hecka et al. (2009), tzn., že v daných populacích byl nejvíce zastoupen genotyp *A2A2* (*CC*), dále *AIA2* (*AC*) a nejméně zastoupený pak genotyp *AIAI* (*AA*). Zastoupení genotypů v uvedených příkladech také naznačuje, že varianta *CSN2-AI* je přítomna u moderních dojných plemen, jak uvádí Miluchová et al. (2013). Výsledky frekvencí alel u plemene jersey byly v souladu se studií Gallinata et al. (2013), kde také výrazně převažovalo zastoupení alely *C* (*A2*) nad alelou *A* (*AI*).

5.4.2 Stanovení Hardy-Weinbergovy rovnováhy

Pro stanovení genetické rovnováhy souboru zvířat podle Hardy-Weinbergova zákona byl použit χ^2 test. Výpočty byly provedeny podle kapitoly 4.2.5.2 a testovány byly všechny varianty souborů jedinců.

Tab. 20: Výpočet χ^2 testu pro celý soubor jedinců (240 zvířat)

	AA	AC	CC	Σ
O	12	77	148	237
E _R	0,0454	0,3354	0,6192	1,0000
E _A	10,7626	79,4843	146,7532	237,0000
χ^2	0,1423	0,0776	0,0106	0,2305

Tab. 21: Výpočet χ^2 testu pro celý soubor jedinců – plemeno brown swiss

	AA	AC	CC	Σ
O	4	27	44	75
E _R	0,0544	0,3577	0,5878	1,0000
E _A	4,0822	26,8307	44,0872	75,0000
χ^2	0,0017	0,0011	0,0002	0,0029

Tab. 22: Výpočet χ^2 testu pro celý soubor jedinců – plemeno jersey

	AA	AC	CC	Σ
O	8	50	104	162
E _R	0,0415	0,3244	0,6341	1,0000
E _A	6,7220	52,5548	102,7232	162,0000
χ^2	0,2430	0,1242	0,0159	0,3831

Tab. 23: Porovnání vypočtených hodnot χ^2 testu pro celý soubor jedinců s tabulkovými hodnotami

Hladina významnosti	Tabulková hodnota - stupeň volnosti 1	Hodnota χ^2		
		Celkový soubor	BSW	J
0,01	6,635	0,2305	0,0029	0,3831
0,05	3,841	0,2305	0,0029	0,3831

Tab. 24: Výpočet χ^2 testu pro soubor jedinců s daty mléčné užitkovosti (126 zvířat)

	AA	AC	CC	Σ
O	4	46	76	126
E _R	0,0459	0,3368	0,6173	1,0000
E _A	5,7865	42,4306	77,7829	126,0000
χ^2	0,5515	0,3003	0,0409	0,8927

Tab. 25: Výpočet χ^2 testu pro soubor jedinců s daty mléčné užitkovosti – plemeno brown swiss

	AA	AC	CC	Σ
O	2	17	26	45
E _R	0,0544	0,3577	0,5878	1,0000
E _A	2,4493	16,0984	26,4523	45,0000
χ^2	0,0824	0,0505	0,0077	0,1406

Tab. 26: Výpočet χ^2 testu pro soubor jedinců s daty mléčné užitkovosti – plemeno jersey

	AA	AC	CC	Σ
O	2	29	50	81
E _R	0,0415	0,3244	0,6341	1,0000
E _A	3,3610	26,2774	51,3616	81,0000
χ^2	0,5511	0,2821	0,0361	0,8693

Tab. 27: Porovnání vypočtených hodnot χ^2 testu pro vybraný soubor jedinců s tabulkovými hodnotami

Hladina významnosti	Tabulková hodnota - stupeň volnosti 1	Hodnota χ^2		
		Celkový soubor	BSW	J
0,01	6,635	0,8927	0,1406	0,8693
0,05	3,841	0,8927	0,1406	0,8693

Platí:

E_R ... očekávané relativní frekvence genotypů

E_A ... očekávané absolutní frekvence genotypů

Vypočtené hodnoty χ^2 nepřevyšují hodnoty tabulkové. Dle Hardy-Weinbergova zákona to tedy znamená potvrzení stanovené nulové hypotézy. Rozdíl mezi očekávanými a skutečnými četnostmi genotypů je neprůkazný. Z toho vyplývá, že všechny testované soubory jedinců jsou pro daný lokus v genetické rovnováze.

5.4.3 Asociační analýza

Asociační analýza byla provedena pouze u těch dojnic, u kterých byly k dispozici údaje o laktaci (tj. u souboru o 126 dojnicích). Parametry mléčné užitkovosti byly následující: celková hmotnost mléka za laktaci (v kilogramech), procentuální obsah tuku v mléce, obsah tuku v kilogramech, procentuální obsah bílkovin a obsah bílkovin v kilogramech. Veškeré fenotypy (tedy údaje o parametrech mléčné užitkovosti) byly získány z volně dostupné databáze plemenic (PLEMDAT s.r.o., 2017). Parametry mléčné užitkovosti byly vyhodnoceny pouze pro 1. laktaci zvířat. Dojnic v dalších fázích laktace bylo výrazně méně, tím pádem by byl výchozí soubor dat pro analýzy příliš malý. Nejdříve byla provedena základní popisná statistika, poté analyzována asociace všech vybraných fenotypových znaků ke genotypům zvířat a plemeni (pevné faktory) a také dnům laktace (regrese). Aby byla matematicko-statistická analýza průkazná, musí být hodnota průkaznosti vždy menší než 0,05. U vysoké průkaznosti je to hodnota menší než 0,01.

Tab. 28: Základní popisná statistika vybraných parametrů mléčné užitkovosti ve vztahu ke genotypu

Genotyp	Parametr	Mléko (kg)	Tuk (kg)	Tuk (%)	Bílkoviny (kg)	Bílkoviny (%)
AA	průměr	5041,75	247,75	4,96	199,75	3,93
	střední odchylka	1693,44	80,85	0,60	75,24	0,31
	minimum	3211,00	172,00	4,15	120,00	3,59
	maximum	7310,00	356,00	5,47	300,00	4,27
AC	průměr	5143,57	247,30	4,97	191,67	3,74
	střední odchylka	1528,00	59,40	0,80	56,16	0,31
	minimum	783,00	42,00	3,56	25,00	3,17
	maximum	8035,00	338,00	7,12	288,00	4,33
CC	průměr	5409,62	260,61	4,91	207,03	3,83
	střední odchylka	1499,70	64,44	0,69	58,25	0,36
	minimum	1756,00	92,00	3,78	65,00	3,02
	maximum	9204,00	434,00	6,38	318,00	4,51

Průměrná dojivost byla u vybraného souboru zvířat u všech genotypů kolem 5 000 kg mléka za laktaci. Obsah tuku v mléce se pohyboval okolo 5 % a obsah bílkovin kolem 4 %. Nejnižší dojivost (5 042 kg/laktace) a nejvyšší obsah bílkovin (3,93 %) v mléce měli jedinci s genotypem AA (A1A1). Naopak nejvyšší dojivost (5 410 kg/laktace) měla zvířata s genotypem CC (A2A2). U genotypu AC (A1A2) byl identifikován nejvyšší průměrný obsah tuku v mléce (4,97 %) a nejnižší obsah bílkovin (3,74 %). Hodnota obsahu tuku v mléce se však příliš neliší od hodnoty procentuálního obsahu tuku u varianty AA (A1A1).

Tab. 29: Průkaznost parametrů mléčné užitkovosti

Parametr	Pr > F		
	BCN	plemeno	dny laktace
mléko (kg)	0,3892	<,0001	<,0001
tuk (kg)	0,4992	0,9315	<,0001
tuk (%)	0,5692	<,0001	0,0719
bílkoviny (kg)	0,3531	0,12	<,0001
bílkoviny (%)	0,1260	<,0001	0,0181

Tabulka 29 udává informace o vlivu genotypu, plemene a dnů laktace na jednotlivé fenotypové faktory. Pro určení konkrétních úrovní průkaznosti je však zapotřebí další testování, které je popsáno níže (kapitola 5.4.3.1).

5.4.3.1 Nejmenší čtvercová střední hodnota a střední chyba průměru

Tato analýza určí vlastní asociaci mezi genem nebo plemenem a vlastností. Zjištěné odhady nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro jednotlivé vlastnosti mléčné užitkovosti ve vztahu ke genotypu zvířat udávají tabulky 30, 31 a 32. V případě plemen jsou to tabulky 34, 35 a 36.

Tab. 30: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro doživost v závislosti na genotypu

Genotyp	Mléko (kg)		
	Nejmenší čtvercová střední hodnota	Střední chyba průměru	Pr > t
AA	4805,3770	643,3733	<,0001
AC	5327,0412	192,2672	<,0001
CC	5552,2031	152,0964	<,0001

Tab. 31: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro obsah tuku v mléce v závislosti na genotypu

Genotyp	Tuk (kg)			Tuk (%)		
	Nejmenší čtvercová střední hodnota	Střední chyba průměru	Pr > t	Nejmenší čtvercová střední hodnota	Střední chyba průměru	Pr > t
AA	4,9934	0,2813	<,0001	237,4858	27,8442	<,0001
AC	4,8373	0,0841	<,0001	249,3866	8,3210	<,0001
CC	4,7554	0,0665	<,0001	259,6729	6,5825	<,0001

Tab. 32: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro obsah bílkovin v mléce v závislosti na genotypu

Genotyp	Bílkoviny (kg)			Bílkoviny (%)		
	Nejmenší čtvercová střední hodnota	Střední chyba průměru	Pr > t	Nejmenší čtvercová střední hodnota	Střední chyba průměru	Pr > t
AA	190,7305	25,8525	<,0001	3,9065	0,1273	<,0001
AC	195,5797	7,7258	<,0001	3,6840	0,0380	<,0001
CC	208,7201	6,1117	<,0001	3,7569	0,0301	<,0001

Tab. 33: Vliv genotypu *CSN2* na parametry mléčné užitkovosti – odhad rozdílu

CSN2		Mléko (kg)	Tuk (kg)	Tuk (%)	Bílkoviny (kg)	Bílkoviny (%)
AA	AC	0,4392	0,6832	0,5962	0,8578	0,0968
AA	CC	0,2609	0,4396	0,4119	0,4996	0,2549
AC	CC	0,3505	0,3245	0,4372	0,1760	0,1277

Ve zkoumaném souboru jedinců nebyly zjištěny statisticky průkazné asociace genotypů lokusu *CSN2* s vybranými znaky mléčné užitkovosti. Statistické průkaznosti se blíží pouze procentuální obsah bílkovin u genotypů AA (*AIAI*) – AC (*AIA2*), průkazný ale není. Spojitost výsledků uvedených v tabulce 28 s genotypy je tedy statisticky neprůkazná.

Tab. 34: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro doživost v závislosti na plemeni

Genotyp	Mléko (kg)		
	Nejmenší čtvercová střední hodnota	Střední chyba průměru	Pr > t
BSW	5737,3970	269,3822	<,0001
J	4719,0171	248,9768	<,0001

Tab. 35: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro obsah tuku v mléce v závislosti na plemeni

Genotyp	Tuk (kg)			Tuk (%)		
	Nejmenší čtvercová střední hodnota	Střední chyba průměru	Pr > t	Nejmenší čtvercová střední hodnota	Střední chyba průměru	Pr > t
BSW	248,4004	11,6584	0,9315	4,3746	0,1178	<,0001
J	249,2965	10,7753	0,9315	5,3495	0,1089	<,0001

Tab. 36: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro obsah bílkovin v mléce v závislosti na plemeni

Genotyp	Bílkoviny (kg)			Bílkoviny (%)		
	Nejmenší čtvercová střední hodnota	Střední chyba průměru	Pr > t	Nejmenší čtvercová střední hodnota	Střední chyba průměru	Pr > t
BSW	205,9076	10,8245	0,1200	3,5575	0,0533	<,0001
J	190,7792	10,0046	0,1200	4,0074	0,0493	<,0001

Efekt plemene na vybrané znaky mléčné užitkovosti je oproti genotypu značný. Statisticky průkazná asociace byla v tomto případě zjištěna u těchto parametrů: doživost, procentuální obsah tuků a bílkovin v mléce. Ze zjištěných hodnot je zřejmé, že doživost se mezi plemeny výrazně liší. Vyšší průměrnou doživost mělo plemeno brown swiss

(5 737 kg/laktace), za to obsah tuku a bílkovin byl u plemene jersey (5,3 % tuku a 4,0 % bílkovin) v porovnání s plemenem brown swiss (4,4 % tuku a 3,6 % bílkovin) vyšší.

5.4.3.2 Diskuse

Průměrné hodnoty procentuálního obsahu tuku a bílkovin v mléce u všech genotypů lokusu *CSN2* jsou oproti výše uvedeným hodnotám v tabulce 1 mírně vyšší. Dle Drbohlava a Vodičkové (2002) se obsah tuku v kravském mléce pohybuje kolem 4 % a obsah bílkovin kolem 3 %. U genotypu *CC* (*A2A2*) byla identifikována nejvyšší dojivost. Naopak u jedinců s genotypem *AA* (*A1A1*) byla průměrná dojivost nejnižší, což je v rozporu se studií Miluchové *et al.* (2013), kde byl zjištěn výskyt formy *CSN2-A1* u moderních plemen skotu s vysokou dojivostí. Statisticky průkazná asociace genotypu s parametry mléčné užitkovosti však nebyla ve studii a ani v této diplomové práci prokázána.

Ani Cecchinato *et al.* (2014) neprokázali statisticky průkazný vztah mezi genotypem lokusu *CSN2* a znaky mléčné užitkovosti. Tato studie byla provedena u 1 271 krav plemene brown swiss. Vybranými parametry mléčné užitkovosti byly v tomto případě dojivost (kg/den) a složení mléka (%). Studovanými složkami mléka byly obsah tuku, proteinů, laktózy a kaseinů.

Hanusová *et al.* (2010) analyzovali populaci 97 jedinců holštýnského skotu. V tomto případě také nebyl statisticky prokázán efekt genotypu *CSN2* na parametry mléčné užitkovosti, které byly následující: dojivost (kg), obsah proteinů a tuku v mléce (%).

Heck *et al.* (2009) naopak souvislost genotypu *CSN2* s některými znaky mléčné užitkovosti prokázali. Statisticky průkazná byla asociace s výtěžkem proteinů v mléce ($<0,01$) a také s rozdílem relativních koncentrací proteinů ($<0,01$). U krav s alelou *A1* (*A*) byl pozorován nižší výtěžek proteinů než u krav s alelou *A2* (*C*), což souvisí s nižší produkcí mléka. V porovnání s variantou *A1* (*A*) byla u alely *A2* (*C*) zjištěna asociace s vyšší relativní koncentrací α_{s1} - a κ -kaseinu a nižší relativní koncentrací α_{s2} - a β -kaseinu v mléce. U heterozygotů (*A1A2* – *AC*) v *CSN2* byla pozorována vyšší relativní koncentrace beta-kaseinu a nižší relativní koncentrace α_{s1} -kaseinu, α -laktalbuminu a β -laktoglobulinu v porovnání s homozygotními jedinci (*A1A1* – *AA*, *A2A2* – *CC*).

Zjištěné obsahy bílkovin a tuků v mléce odpovídají výše uvedeným informacím o plemeni jersey (kapitola 3.5.1). Na portálu Náš chov (2013) bylo toto plemeno označeno jako plemeno budoucnosti, a to právě díky mléku bohatému na tyto dvě složky,

což bylo v diplomové práci potvrzeno. Vyšší dojivost u plemene brown swiss je dána vyšším tělesným rámcem tohoto plemene (Klub chovatelů brown swiss, 2017).

Statisticky průkaznou asociaci ($<0,05$) mezi složením mléka a plemenem prokázali Yang *et al.* (2013). Testována byla 3 různá plemena se stejnými podmínkami výživy. Dojivost u buvola domácího byla nízká (~700 kg/rok/kráva), zatímco vyšší dojivost byla pozorována u Murraha (~2 200 kg/rok/kráva). Střední hodnoty dojivosti byly pozorovány u křížence těchto dvou druhů (~1 500 kg/rok/kráva). Statisticky průkazný byl i vliv plemene na obsah tuku a proteinů v mléce. Zajímavým prvkem této studie byla část věnovaná mobilitě kaseinů v polyakrylamidovém gelu, která je dána molekulovou hmotností. Tyto rozdíly byly zkoumány v souvislosti s alergií na mléko. U buvola domácího zde byla zjištěna statisticky průkazná spojitost s mobilitou α_s -kaseinu, která byla vyšší, než je standard. U tohoto druhu byla identifikována také absence jednoho z druhů α_s -kaseinu. Naopak mobilita β -kaseinu buvola domácího byla oproti standardu nižší.

Gellrich *et al.* (2014) provedli studii u 23 krav holštýnského plemene. Bylo statisticky prokázáno, že na dojivost (kg/den) mají vliv období odběru vzorků ($<0,01$) a den laktace ($<0,001$). Období odběru vzorků také ovlivňuje koncentraci mléčných proteinů ($<0,001$). Dále byl prokázán efekt ročního období ($<0,05$) na složení kaseinů (β a κ) a obsah syrovátkových proteinů v mléce. Roční období také ovlivňuje kompozici proteinů v mléce.

Rozdíly ve výsledcích i v tomto případě přisuzují zejména velikosti zkoumaného souboru zvířat. Z výše uvedených studií je však patrné, že parametry mléčné užitkovosti ovlivňuje i řada vnějších faktorů, jako např. doba odběru vzorků, laktační den, ale i roční období, což bylo potvrzeno i ve studii Sahina *et al.* (2016). Pokud tyto faktory dosáhnou určité úrovně, genetický potenciál zvířat se neprojeví.

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zvládnutí základních molekulárně genetických metod, jejich optimalizace k danému polymorfismu a dále také ověření asociace polymorfismu *CSN2* se znaky mléčné užitkovosti u vybrané skupiny dojnic plemene jersey a brown swiss. Těmito parametry byly laktační dny, dojivost (kg/laktace), obsah tuku v mléce v kilogramech, procentuální obsah tuku v mléce, obsah bílkovin v mléce v kilogramech a procentuální obsah bílkovin v mléce. Zjištěné poznatky mohou sloužit jako doporučení pro chovatele pro efektivnější šlechtění a účinnější selekci.

V literární rešerši byl zpracován základní přehled s použitím aktuálních informací k problematice. Genotyp lokusu *CSN2* byl určen u 237 zvířat z celkového souboru o 240 jedincích. U 3 zvířat se nepodařilo polymorfismus určit z důvodu nekvalitních vzorků krve. Analýza genotypů proběhla pomocí sekvenace a z výsledků byla vytvořena databáze. V souboru byla výrazně více zastoupena alela *C* oproti alele *A*. Její frekvence byla zhruba 80 %. Při vyhodnocení genotypové frekvence bylo identifikováno nejvyšší zastoupení genotypu *A2A2* (*CC*) a to u zhruba 60 % jedinců. Genotyp *A1A2* (*AC*) byl zastoupen cca u 35 % zvířat a genotyp *A1A1* (*AA*) byl identifikován u pouhých 5 % jedinců.

Asociační analýza byla provedena pomocí zobecněného lineárního modelu u 126 jedinců v programu SAS. Do analýzy byly zahrnuty pouze ty dojnice, u kterých byly k dispozici údaje o laktaci. Mezi genotypy a znaky mléčné užitkovosti nebyla identifikována asociace. Statisticky průkazný byl pouze vliv plemene. Na základě těchto výsledků není možné vyvodit jednoznačné doporučení pro chovatele a šlechtitele. Tento výsledek je pravděpodobně zapříčiněn malou velikostí souboru testovaných jedinců, čímž lze vysvětlit i rozpory mezi získanými výsledky a výsledky různých autorů. Je také nutné brát v potaz vliv vnějších faktorů, které mohou výsledky výrazně ovlivnit.

I když v této práci nebyl potvrzen vliv genotypu *CSN2* na parametry mléčné užitkovosti, existují studie, kde byly statisticky průkazné asociace polymorfismu *CSN2* zjištěny. Proto je vhodné nadále sledovat probíhající výzkum a aktuální poznatky v této oblasti. Pokud bude potvrzen vliv určitého genotypu na mléčnou užitkovost, nebo dokonce na lidské zdraví, je vhodné těmito poznatkům uzpůsobit selekci a vyhovět tak požadavkům trhu a zvýšenému zájmu spotřebitelů o tyto produkty, popřípadě získat na trhu výhodu.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BARROSO, A., S. DUNNER a J. CAÑÓN. *Technical Note: Use of PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for Detection of Bovine β -Casein Variants A1, A2, A3, and B: Journal of Animal Science* [online]. 1999, **77**, s. 2629–2632. ISSN 1525-3163.

BONSING, J., J. M. RING, A. F. STEWART a A. G. MACKINLAY. *Complete Nucleotide Sequence of the Bovine β -casein Gene: Australian Journal of Biological Sciences* [online]. 1988, **41**, s. 527-537.

CAROLI, A. M., S. SAVINO, O. BULGARI a E. MONTI. *Detecting β -Casein Variation in Bovine Milk: Molecules* [online]. 2016, **141**(21), s. 1-7. DOI: 10.3390/molecules21020141.

CAROLI, A., S. CHESSA, P. BOLLA, E. BUDELLI a G. C. GANDINI. *Genetic structure of milk protein polymorphisms and effects on milk production traits in a local dairy cattle: Journal of Animal Breeding and Genetics* [online]. 2004, **121**, s. 119-127. ISSN 0931–2668.

CECCHINATO, A., C. RIBECA, S. CHESSA, C. CIPOLAT-GOTET, F. MARETTO, J. CASELLAS a G. BITTANTE. Candidate gene association analysis for milk yield, composition, urea nitrogen and somatic cell scores in Brown Swiss cows: *Animal* [online]. 2014, **8**(7), s. 1062–1070. DOI: 10.1017/S1751731114001098.

COSENZA, G., M. FELIGINI, A. MANCUSI, A. D'AVINO, A. COLLETA, D. DI BERARDINO a L. RAMUNNO. *Italian Mediterranean river buffalo CSN2 gene structure and promoter analysis: Italian Journal of Animal Science* [online]. 2009, **8**(2), s. 57-59. ISSN: 1594-4077.

ČESKÝ SVAZ CHOVATELŮ JERSEYSKÉHO SKOTU. *Plemeno jersey* [online]. ©2017 [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <http://www.jersey.cz/clanky/plemeno.html>

PLEMDAT s.r.o.: Databáze plemenic [online]. 2017 [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <http://test.plemdat.cz/krava/krava.exe>

DRBOHLAV, J. a M. VODIČKOVÁ. *Tabulky látkového složení mléka a mléčných výrobků*. 2. nezměněné vyd. Praha: ÚZPI, 2002, 84 s. ISBN 80-7271-005-2.

- EL-AGAMY, E. I. *The challenge of cow milk protein allergy: Small Ruminant Research* [online]. 2007, **68**, s. 64-72. ISSN 0921-4488.
- ENSEMBL, 2017: ENSBTAT00000003409, http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000002632;r=6:8717950287188025;t=ESBTAT0000003409
- FARELL, JR., H. M., R. JIMENEZ-FLORES, G. T. BLECK, E. M. BROWN, J. E. BUTLER, L. K. CREAMER, C. L. HICKS, C. M. HOLLAR, K. F. NG-KWAI-HANG, H. E. SWAISGOOD. *Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision: Journal of Dairy Science* [online]. 2004, **87**(6), s. 1641–1674. ISSN 0022-0302.
- FERRETTI, L., P. LEONE a V. SGARAMELLA. *Long range restriction analysis of the bovine casein genes: Nucleic Acids Research* [online]. 1990, **18**(23), s. 6829-6833. ISSN: 1362-4962.
- GALLINAT, J. L., S. QANBARI, C. DRÖGEMÜLLER, E. C. G. PIMENTEL, G. THALLER a J. TETENS. *DNA-based identification of novel bovine casein gene variants: Journal of Dairy Science* [online]. 2013, **96**(1), s. 699-709. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5908>.
- GELLRICH, K., H. H. D. MEYER a S. WEIDEMANN. *Composition of major proteins in cow milk differing in mean protein concentration during the first 155 days of lactation and the influence of season as well as shortterm restricted feeding in early and mid-lactation: Czech Journal of Animal Science* [online]. 2014, **59**(3), s. 97-106. ISSN 1212-1819.
- HAN, S. K., Y. C. SHIN a H. D. BYUN. *Biochemical, molecular and physiological characterization of a new b-casein variant detected in Korean Cattle: Animal Genetics* [online]. 2000, **31**, s. 49-51. ISSN 1365-2052.
- HANUSOVÁ, E., J. HUBA, M. ORAVCOVÁ, P. POLÁK a I. VRTKOVÁ. *Genetic variants of beta-casein in Holstein dairy cattle in Slovakia: Slovak Journal of Animal science* [online]. 2010, **43**(2). ISSN 1337-9984.
- HARTL, D. L. a A. G. CLARK. *Principles of population genetics*. 4. vyd. Sunderland: Sinauer Associates, 2007, 652 s. ISBN 978-0-87893-308-2.

HECK, J. M. L., A. SCHENNINK, H. J. F. VAN VALENBERG, H. BOVENHUIS, M. H. P. W. VISKER, J. A. M. VAN ARENDONK a A. C. M. VAN HOOIJDONK. *Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk: Journal of Dairy Science* [online]. 2009, **92**, s. 1192–1202. DOI:10.3168/jds.2008-1208.

HRISTOV, P., I. MITKOV, D. SIRAKOVA, I. MEHANDGIISKI a G. RADOSLAVOV. *Measurement of Casein Micelle Size in Raw Dairy Cattle Milk by Dynamic Light Scattering* [online]. InTech, 20016 cit. 2017-03-18]. ISBN 978-953-51-2537-2. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/milk-proteins-from-structure-to-biological-properties-and-health-aspects/measurement-of-casein-micelle-size-in-raw-dairy-cattle-milk-by-dynamic-light-scattering>

KLUB CHOVELŮ BROWN SWISS: *Plemeno* [online]. ©2017 [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <http://www.brownswiss.cz/clanky/plemeno.html>

KUMAR, S., A. R. CLARKE, M. L. HOOPER, D. S. HORNE, A. J. R. LAW, J. LEAVER, A. SPRINGBETT, E. STEVENSON, J. P. SIMONS. *Milk composition and actation of β -casein-deficient mice: Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* [online]. 1994, **91**, s. 6138-6142. ISSN: 0027-8424.

MARTIN, P., M. SZYMANOWSKA, L. ZWEIRZCHOWSKI a Ch. LEROUX. *The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks: Reproduction Nutrition Development* [online]. 2002, **42**, s. 433-459. DOI: 10.1051/rnd:2002036.

MCLACHLAN, C. N. S. A2 CORPORATION LIMITED. *Breeding and milking cows for milk free of β -casein A1*. Číslo patentu: US007094949B2.

MILUCHOVÁ, M., M. GÁBOR, A. TRAKOVICKÁ a J. HANUSOVÁ. *Bovine beta casein A1 variant as risk factor for human health: Acta Fytotechnica et Zootechnica* [online]. 2013, **60**(4), s. 799-801. ISSN 1336-9245.

MILUCHOVÁ, M., A. TRAKOVICKÁ a M. GÁBOR. *Analysis of polymorphism of beta casein of Slovak Pingazu cattle by PCR-RFLP for alleles A1 and A2: Zootehnie și Biotehnologii* [online]. 2009, **42**(2). ISSN 1221-5287.

NÁŠ CHOV. *Je plemeno jersey plemenem budoucnosti?* [online]. 2013 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://naschov.cz/je-plemeno-jersey-plemenem-budoucnosti>

NCBI, 2017, Gene ID: 281099, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9913&chr=6&query=uid\(1097536056\)&QSTR=281099%5Bgene%5Fid%5D&maps=gene_set&cmd=focus](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9913&chr=6&query=uid(1097536056)&QSTR=281099%5Bgene%5Fid%5D&maps=gene_set&cmd=focus)

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. *Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides: Trends in Food Science & Technology* [online]. 2001, **11**, s. 347-356. ISSN 0924-2244.

REECE, W. O. *Fyziologie domácích zvířat*. Praha: Grada Publishing, 1998, 456 s. ISBN 80-7169-547-5.

SAHIN, A., Z. ULUTAS, A. YILDIRIM, E. KUL, Y. AKSOY, E. UĞURLUTEPE, O. SÖZEN a Y. KAPLAN. *The effect of some environmental factors on milk composition of Anatolian buffaloes: Scientific Papers. Series D. Animal Science*. [online]. 2016, **59**, s. 57-64. ISSN 2393-2260.

SAMBRAUS, H. H. *Atlas plemen hospodářských zvířat*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Brázda, 2006, 295 s. ISBN 80-209-0344-5.

SAS Institute Inc. 2016. SAS® 9.4 Statements: Reference, Fifth Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SVAZ CHOVATELŮ SKOTU PLEMENE BROWN SWISS: *Plemeno Brnwn Swiss* [online]. 2009 [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: <http://www.inplem.cz/sbs/plemeno.htm>

THE A2 MILK COMPANY™. *About The a2 Milk Company™* [online]. ©2017 [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: <https://thea2milkcompany.com/about-us/>

YANG, T. X., H. LI, F. WANG, X. L. LIU a Q. Y. LI. Effect of Cattle Breeds on Milk Composition and Technological Characteristics in China: *Asian-Australian Journal of Animal Sciences* [online]. 2013, 26(6), 896-904 s. ISSN 1976-5517.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Schematické znázornění struktury kaseinové micely.....	13
Obr. 2: Schéma genomické organizace kaseinových genů na bovinním lokusu BTA 6..	14
Obr. 3: Lokalizace bovinního genu pro beta kasein na 6. chromozomu	15
Obr. 4: Schéma strukturní organizace transkripčních jednotek bovinního beta-kaseinu.	15
Obr. 5: Struktura bovinního genu CSN2.	16
Obr. 6: Schematické znázornění uvolnění beta-kasomorfínu z beta-kaseinu A1	17
Obr. 7: Plemeno jersey.....	21
Obr. 8: Plemeno brown swiss	22
Obr. 9: Použité hmotnostní standardy.....	25
Obr. 10: Ukázka vizualizace výsledků izolace DNA ze vzorků krve (vzorek 214-220)..	32
Obr. 11: Ukázka vizualizace výsledků PCR (vzorek 125-128).....	33
Obr. 12: Ukázka genotypu AA (A1A1) v genu CSN2 – vzorek 227.	33
Obr. 13: Ukázka genotypu AC (A1A2) v genu CSN2 – vzorek 229.....	34
Obr. 14: Ukázka genotypu CC (A2A2) v genu CSN2 – vzorek 230.....	34

9 SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Složení kravského mléka	11
Tab. 2: Lokalizace substitucí aminokyselin u některých variant beta-kaseinu.....	18
Tab. 3: Složení reakční směsi pro PCR	26
Tab. 4: Charakteristika použitých primerů	27
Tab. 5: Teplotní profil PCR	27
Tab. 6: Složení reakční směsi pro sekvenaci	28
Tab. 7: Teplotní profil PCR pro sekvenaci	28
Tab. 8: Určení frekvence genotypů.....	29
Tab. 9: Výpočet frekvence alel	30
Tab. 10: Zastoupení plemen ve zkoumaném souboru	35
Tab. 11: Absolutní a relativní frekvence genotypů genu CSN2	35
Tab. 12: Absolutní a relativní frekvence alel genu CSN2	35
Tab. 13: Absolutní a relativní frekvence genotypů CSN2 u jednotlivých plemen	36
Tab. 14: Absolutní a relativní frekvence alel genu CSN2 u jednotlivých plemen	36
Tab. 15: Zastoupení plemen ve vybraném souboru jedinců – jedinci s daty mléčné užitkovosti.....	37
Tab. 16: Absolutní a relativní frekvence genotypů genu CSN2 ve vybraném souboru jedinců.....	37
Tab. 17: Absolutní a relativní frekvence alel genu CSN2 ve vybraném souboru jedinců	37
Tab. 18: Absolutní a relativní frekvence genotypů CSN2 u jednotlivých plemen v souboru jedinců vybraných pro asociační analýzu	38
Tab. 19: Absolutní a relativní frekvence alel genu CSN2 u jednotlivých plemen v souboru jedinců vybraných pro asociační analýzu	38
Tab. 20: Výpočet χ^2 testu pro celý soubor jedinců (240 zvířat)	40
Tab. 21: Výpočet χ^2 testu pro celý soubor jedinců – plemeno brown swiss.....	40
Tab. 22: Výpočet χ^2 testu pro celý soubor jedinců – plemeno jersey	40
Tab. 23: Porovnání vypočtených hodnot χ^2 testu pro celý soubor jedinců s tabulkovými hodnotami	40
Tab. 24: Výpočet χ^2 testu pro soubor jedinců s daty mléčné užitkovosti (126 zvířat) ...	41

Tab. 25: Výpočet χ^2 testu pro soubor jedinců s daty mléčné užitkovosti – plemeno brown swiss.....	41
Tab. 26: Výpočet χ^2 testu pro soubor jedinců s daty mléčné užitkovosti – plemeno jersey	41
Tab. 27: Porovnání vypočtených hodnot χ^2 testu pro vybraný soubor jedinců s tabulkovými hodnotami.....	41
Tab. 28: Základní popisná statistika vybraných parametrů mléčné užitkovosti ve vztahu ke genotypu.....	43
Tab. 29: Průkaznost parametrů mléčné užitkovosti.....	44
Tab. 30: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro doživost v závislosti na genotypu.....	44
Tab. 31: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro obsah tuku v mléce v závislosti na genotypu	45
Tab. 32: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro obsah bílkovin v mléce v závislosti na genotypu	45
Tab. 33: Vliv genotypu CSN2 na parametry mléčné užitkovosti – odhad rozdílu.....	45
Tab. 34: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro doživost v závislosti na plemeni.....	46
Tab. 35: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro obsah tuku v mléce v závislosti na plemeni	46
Tab. 36: Nejmenší čtvercové střední hodnoty a střední chyby průměru pro obsah bílkovin v mléce v závislosti na plemeni	46

10 SEZNAM ZKRATEK

Seznam zkratek

BCM (beta-casomorphins)	beta-kasomorfiny
BCM-7 (beta-casomorphin-7)	beta-kasomorfin-7
BCN (beta-casein)	beta-kasein
bp (base pair)	pár bází
BSW (Brown Swiss)	plemeno brown swiss
cDNA (complementary deoxyribonucleic acid)	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CSN2 (casein beta)	beta-kasein (gen, protein)
DNA (deoxyribonucleic acid)	deoxyribonukleová kyselina
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	kyselina ethylendiamintetraoctová
J (Jersey)	plemeno jersey
kb (kilo base)	kilo báze
LDL (low density lipoprotein)	nízkodenzitní lipoprotein
mRNA (messenger ribonucleic acid)	mediátorová ribonukleová kyselina
PCR (polymerase chain reaction)	polymerázová řetězová reakce
RFLP (restriction fragment lenght polymorphism)	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
SNP (single nucleotide polymorphism)	jednonukleotidový polymorfismus
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE (Tris/Borate/EDTA buffer)	pufr Tris-borát-EDTA
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane)	tris(hydroxymethyl)aminomethan