

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



**Variabilita genu kappa-kasein u plemene brown swiss
v České republice**
Diplomová práce

Vedoucí práce:

Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracoval:

Bc. Martin Sloupenský

Zadání DP

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Variabilita genu kappa-kasein u plemene brown swiss v České republice vypracoval 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 a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom, 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:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval prof. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D. za cenné rady, věnovaný čas a pomoc při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat prof. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D. za pomoc při zpracování statistických údajů a Ing. Anně Schmidtové za pomoc při laboratorním zpracování vzorků a za odborné rady k úpravě diplomové práce. Také bych chtěl poděkovat Ing. Tamaře Mífkové a Ing. Janu Wijacki za užitečné rady v laboratoři.

ABSTRAKT

Kappa-kasein má hlavní funkci v procesu výroby sýru. Znalost vlivu polymorfismu genu pro kappa-kasein na nutriční a fyzické vlastnosti mléka, může vést k efektivnějšímu šlechtění dojného skotu. V rámci této diplomové práce byl stanoven genotyp u 240 krav plemene brown swiss a jersey pomocí metody PCR-RFLP. Následně byla provedena asociační analýza vlivu jednotlivých genotypů na parametry mléčné užitkovosti ve statistickém programu SAS. Asociace mezi polymorfismem genu *CSN3* a mléčnou užitkovostí nebyla průkazná.

Klíčová slova: kappa-kasein, *CSN3*, brown swiss, jersey, mléčné proteiny, mléčná užitkovost

ABSTRACT

Kappa-casein has the general function in process of cheese production. Understanding the effect of gene polymorphism of kappa-casein to the nutritional and physical properties of milk may lead to more efficient breeding of dairy cattle. Within this thesis was genotyped by 240 brown swiss and jersey cows determined using the PCR-RFLP. Then was performed association analysis of the impact of various genotypes on milk production parameters in the program SAS. An association between gene *CSN3* polymorphism and milk yield was not statistically significant.

Key words: kappa-casein, *CSN3*, brown swiss, jersey, milk proteins, milk yield

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1 Složení mléka.....	10
3.2 Mléčné bílkoviny	10
3.2.1 Kaseiny	11
3.2.1.1 Kappa kasein.....	12
3.3 Technologické vlastnosti mléka.....	13
3.3.1 Kyselé srážení.....	13
3.3.2 Srážení syřidlem	14
3.4 Geny mléčných bílkovin	15
3.4.1 Polymorfismus genu κ -kasein	16
3.4.2 Vliv genotypů <i>CSN3</i> na kvalitu mléka a mléčnou užitkovost.....	17
3.4.3 Frekvence alel genu <i>CSN3</i> u jednotlivých plemen skotu	19
3.5 Plemeno brown swiss.....	19
3.6 Plemeno jersey	20
4 MATERIÁL A METODIKA	22
4.1 Materiál.....	22
4.1.1 Použité vzorky	22
4.1.2 Použité přístroje.....	22
4.2 Metodika	22
4.2.1 Izolace DNA z krve	22
4.2.2 PCR-RFLP	25
4.2.2.1 PCR.....	25

4.2.2.2	RFLP	26
4.2.3	Agarózová elektroforéza.....	27
4.3	Matematicko-statistické zpracování výsledků	28
4.3.1	Výpočet frekvence alel a genotypů	28
4.3.2	Hodnocení genetické rovnováhy pomocí Hardy-Weinbergova principu	29
4.3.3	Asociační analýza.....	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
5.1	Izolace DNA	31
5.2	PCR.....	31
5.3	RFLP.....	32
5.4	Matematicko-statistické vyhodnocení	32
5.4.1	Stanovení frekvence alel a genotypů.....	32
5.4.2	Test genetické rovnováhy populace dle Hardy-Weinbergova zákona	35
5.4.3	Asociační analýza.....	36
6	ZÁVĚR	41
7	POUŽITÁ LITERATURA	42
8	SEZNAM ZKRATEK.....	49
9	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	50
10	SEZNAM TABULEK.....	51

1 ÚVOD

Mléko představuje důležitou součást lidské stravy. Obsahuje řadu prospěšných látek pro lidský organismus. Mezi ně se řadí také mléčné bílkoviny. Mléčné proteiny mají vysokou nutriční hodnotu a jejich funkční vlastnosti umožňují výrobu sýrů a jiných mléčných výrobků. Hlavní funkci v procesu výroby sýrů má protein kappa-kasein (κ -kasein). Kvalita a množství κ -kaseinu výrazně zlepšuje pevnost sýřeniny a zkracuje dobu sýření. V populaci skotu existuje několik variant κ -kaseinu. Genotyp *BB* se zdá být z hlediska mléčného průmyslu nejvhodnější. Mléčné proteiny jsou předmětem intenzivního výzkumu více jak 50 let. Získané výsledky se dají použít ke zlepšení výpočtu plemenné hodnoty býků v procesu šlechtění skotu.

V této diplomové práci byl zkoumán polymorfismus genu *CSN3* u plemen brown swiss a jersey. Tato plemena nejsou v České republice příliš častá, ale díky jejich dobrým užitkovým a chovným vlastnostem se jejich počet každým rokem zvyšuje. Bylo analyzováno 240 jedinců z devíti českých chovů a provedena asociační analýza s užitkovostí jednotlivých jedinců. Poznatky z této diplomové práce mohou využít chovatelé při šlechtění skotu a producenti mléčných výrobků při výrobě sýrů.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo provedení testování populace zvířat plemene brown swiss v České republice, stanovení frekvence genotypů a alel a provedení asociační analýzy polymorfismu v genu pro kappa-kasein (*CSN3*) s parametry mléčné užitkovosti krav. V rámci této práce bylo nutné si osvojit základní metody molekulární biologie: izolaci DNA, polymerázovou řetězovou reakci, štěpení pomocí restričních endonukleáz a agarózovou gelovou elektroforézu. Z důvodu malého počtu získaných dat užitkovosti u jedinců plemene brown swiss jsem oproti původnímu plánu testoval stejné parametry také u získaných vzorků plemene jersey.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Složení mléka

Mléko je produkováno mléčnými žlázami samic savců a slouží k výživě mláďat. Mléko se převážně skládá z vody, sacharidů, tuků, bílkovin, minerálních látek a vitamínů (viz tabulka 1). Obsahuje nezbytné látky pro správný vývoj mláďete. Kromě výživové funkce má vliv na imunitu (imunoglobuliny, antimikrobiální látky), trávení (enzymy) a obsahuje také růstové faktory a hormony. Složení mléka je u jednotlivých druhů savců rozdílné v závislosti na fyziologických a nutričních požadavcích (Navrátilová et al. 2012). Mléko je důležitou součástí lidské stravy, protože je bohatým zdrojem živočišných bílkovin a vápníku. Asi 83 % vyprodukovaného mléka, určeného ke konzumaci, pochází od skotu. Zbýlých 13 % mléka produkují především ovce, kozy, buvoli a velbloudi. (Amills et al. 2012).

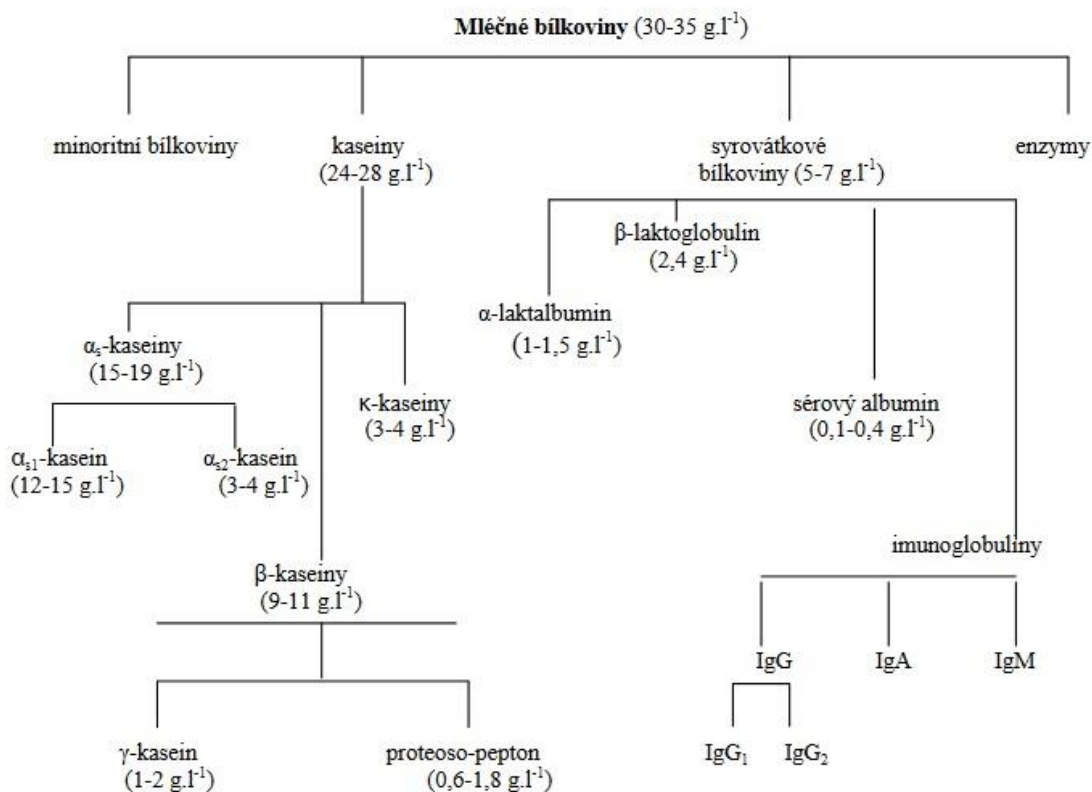
Tabulka 1: Složení kravského mléka (Drbohlav a Vodičková 2001).

Složky	Průměrná hodnota v %	Rozmezí hodnot v %
Voda	87,15	85,5 - 88,7
Tuk	4,06	2,52 - 6,09
Bílkoviny	3,29	2,37 - 4,30
Sacharidy	4,77	4,14 - 5,19
Minerální látky	0,73	-

3.2 Mléčné bílkoviny

Mléko obsahuje stovky typů proteinů, většinu ve velmi malém množství. Proteiny můžeme dělit na základě chemických, fyzikálních a biologických funkcí. Dříve se mléčné proteiny dělily na kaseiny, albuminy a globuliny. V dnešní době se rozdělují na kaseiny, syrovátkové (sérové) proteiny a minoritní proteiny. Tyto hlavní skupiny proteinů se vyznačují různou strukturou a funkcí. Kaseiny se snadno vysráží z mléka, syrovátkové proteiny obvykle zůstávají v roztoku (Bordin et al. 2001). Kravské mléko obsahuje obvykle 3,3 až 3,5 % proteinů. Množství proteinů ovlivňuje řada faktorů jako věk dojnice, plemeno, výživa, stádium laktace. Zhruba 80 % mléčných bílkovin tvoří kaseiny (α_{S1} , α_{S2} , β a κ kasein). Sýrovátkové proteiny tvoří asi 20 % mléčných bílkovin. Mezi sýrovátkové proteiny řadíme α -laktalbumin a β -laktoglobulin. Z krve přechází do mléka sérové albuminy (BSA) a imunoglobuliny, které patří také mezi sýrovátkové proteiny. Mléko obsahuje také enzymy, proteiny membrány

tukových kuliček a minoritní proteiny (laktoferin, angiogenin, transferin, aj.) (Alston-Mills 1995). Podrobné rozdělení jednotlivých bílkovin viz obrázek 1.



Obrázek 1: Rozdělení mléčných bílkovin (Sing a Flanagan 2006).

3.2.1 Kaseiny

Kaseiny jsou syntetizovány v mléčných žlázách a mohou tvořit agregáty v koloidním roztoku, které nazýváme micely. Z biochemického hlediska označujeme kaseiny jako nerozpustné fosfoproteiny (Martin et al. 2002). Primární struktura kaseinů je ve srovnání s typickými globulárními proteiny zcela unikátní. Každý z kaseinů má odlišné oblasti kladně a záporně nabitých skupin molekul, což způsobuje amfifilní charakter jednotlivých proteinů. Kromě toho se hydrofobnost každého kaseinu značně liší v závislosti s polohou na peptidovém řetězci. Kaseiny obsahují méně sekundárních a terciálních struktur oproti typickým globulárním proteinům (Singh a Flanagan 2006).

U přežvýkavců byly identifikovány α_{S1} -kasein, α_{S2} -kasein, β -kasein a κ -kasein, které představují přibližně 37, 10, 35 a 12 % z celkového množství kaseinů v uvedeném pořadí. Štěpením β -kaseinu může vzniknout heterogenní skupina proteinů známých jako γ -kaseiny. Tyto kaseiny vznikají v důsledku omezené proteolýzy C-konce β -kaseinu, působením

proteinázy. γ -kaseiny se dále dělí na γ_1 -kasein, γ_2 -kasein, γ_3 -kasein a proteoso-pepton, který se nachází v syrovátce (Swaisgood 1993). α_{S1} -kasein, α_{S2} -kasein a β -kasein mají vysoký obsah fosfátů a sráží se v přítomnosti vápníku. κ -kasein má rozdílný evoluční vývoj a není citlivý na přítomnost vápníku. κ -kasein má stabilizační roli v komplexu micel vytvořením hydrofilního povlaku, který zabraňuje shlukování a srážení. Enzymatická hydrolýza κ -kasein chymozinem má za následek destabilizaci micel a následné sražení mléka, což je první krok při výrobě sýra (Jolles 1975). Každý ze čtyř kaseinů vykazuje variabilitu ve stupni fosforylace a glykosylace. Další heterogenita kaseinů vyplývá z výskytu genetických polymorfizmů, který je důsledkem substituce, méně často i delece aminokyselin způsobené mutací. Objevení polymorfizmů genů kaseinu odstartovalo studie mutací, které ovlivňují rychlost syntézy kaseinu a vlastnosti mléka a mléčných výrobků (Singh a Flanagan 2006).

3.2.1.1 Kappa kasein

Molekula κ -kaseinu je jednořetězcový polypeptid složený ze 169 aminokyselin (viz obr. 2) o molekulové hmotnosti 19,037 kDa a jako jediný z kaseinů obsahuje sacharidy, které jsou na proteiny navázané glykosidovou vazbou (Fournet et al. 1979). Asi polovina molekul κ -kaseinu je glykosylována v polohách 131, 133, 135 nebo 142. Většina molekul κ -kaseinu je také fosforylována na Ser 149. κ -kasein se vyskytuje ve formě směsi disulfidově vázaných polymerů od dimerů po oktamery (Swaisgood 2003). Struktura κ -kaseinu je amfipatická. N-koncová doména obsahuje aminokyselinové zbytky 1 – 105 (para- κ -kasein), je vysoce hydrofobní a nese pozitivní náboj. Sekvence 53 C-terminálního zbytku nese čistě negativní náboj s převahou polárních zbytků. Tyto dvě domény jsou spojené peptidem, který nese pozitivní náboj (Jollés et al. 1972). Předpokládá se, že β -řetězec obsahuje motiv, který je rozpoznán chymozinem. Chymozin je schopen štěpit specifickou vazbu Phe 105 – Met 106 za vzniku dvou peptidů. Vzniká velký hydrofobní peptid (para- κ -kasein, 1 – 105) a menší hydrofilní peptid (kaseinový makropeptid, CMP, 106 – 169) (Swaisgood 2003).

1	10	20
H-Glu-Glu-Gln-Asn-Gln-Glu-Gln-Pro-Ile-Arg-Cys-Glu-Lys-Asp-Glu-Arg-Phe-Phe-Ser-Asp-		
21	30	40
Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-		
41	50	60
Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Ala-Leu-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr-		
61	70	80
Tyr-Ala-Lys-Pro-Ala-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ala-Gln-Ile-Leu-Gln-Trp-Gln-Val-Leu-Ser-		
81	90	100
Asn-Thr-Val-Pro-Ala-Lys-Ser-Cys-Gln-Ala-Gln-Pro-Thr-Thr-Met-Ala-Arg-His-Pro-His-		
101	110	120
↓		
Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys-Thr-Glu-Ile-Pro-		
121	130	140
Thr-Ile-Asn-Thr-Ile-Ala-Ser-Gly-Glu-Pro-Thr-Ser-Thr-Pro-Thr-Thr-Glu-Ala-Val-Glu-		
141	150	160
Ser-Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu-Asp-Ser-Pro-Glu-Val-Ile-Glu-Ser-Pro-Pro-Glu-Ile-Asn-		
161	169	
Thr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val-OH		

Obrázek 2: Primární struktura referenční alely A u κ -kaseinu, *CSN3 A-IP*. ↓ místo štěpení chymozinem. (Mercier et al. 1973).

3.3 Technologické vlastnosti mléka

Srážení mléka je významnou technologickou vlastností. Srážením se rozumí přechod z koloidního roztoku do stavu sraženiny. V tomto procesu mají význam především bílkoviny, zejména kasein a stupeň jeho hydratace. Existuje několik způsobů srážení mléka. Z technologického hlediska je nejdůležitější srážení kyselinou a syřidlem (Robinson a Wilbey 1998). Mléko s příznivými sýrařskými vlastnostmi dává předpoklad vyšší výtěžnosti sýrů s jejich požadovaným složením, než mléko s nevhodnými sýrařskými vlastnostmi. Dobrá sýřitelnost mléka závisí na jeho neporušeném složení, na obsahu kaseinových bílkovin, jejich složení a genetické variantě. Dále záleží na obsahu minerálních látek a jejich rovnováze s bílkovinami, na formě minerálních látek a na přirozeném pH mléka, které s těmito faktory přímo souvisí (Forman 1994).

3.3.1 Kyselé srážení

Okyselením mléka, ať už pomocí kultur nebo přidávkem kyseliny, vzniká při určité kyselosti mléčná sraženina vyloučením kyselého kaseinu v důsledku odštěpení vápníku z kaseinátu vápenatého. Podstatou tohoto jevu je dipolární charakter aminokyselin a tím i vlastních bílkovin mléka. Podle pH prostředí se bílkoviny chovají jako kyseliny nebo zásady. Při určité hodnotě pH je výsledný náboj nulový a této hodnotě se říká izoelektrický bod.

U kaseinu je tato hodnota rozdílná pro jednotlivé frakce kaseinu a pohybuje se v intervalu 4,6 – 4,9 pH. Při této hodnotě kyselosti mléka jsou bílkoviny kaseinu nerozpustné a dochází k jejich vysrážení. K vysrážení kaseinu je možné použít organickou i anorganickou kyselinu. Obvykle se využívá kyselina mléčná, kterou v mléce produkují bakterie mléčného kvašení. Kyselé srážení mléka je reverzibilní proces. Přídavkem zásady se vysrážený kasein může opět přivést do rozpustného stavu jako anion a přídavkem kyseliny nad izoelektrický bod přechází kasein do roztoku jako kation. Kyselé srážení mléka je základem výroby kyselých a měkkých sýrů, jako jsou např. tvarohy a všechny tvarohové výrobky. (Fox et al. 2004).

3.3.2 Srážení syřidlem

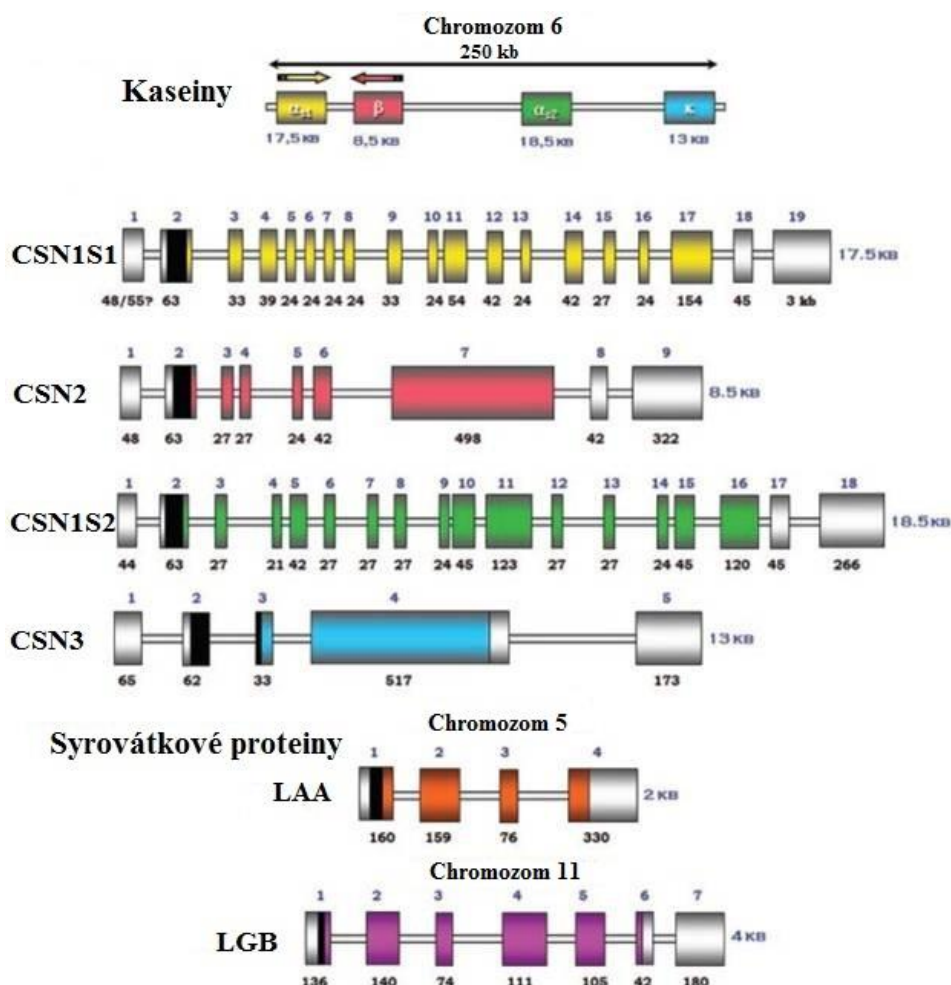
Při srážení mléka účinkem syřidla vzniká sraženina, která je napohled identická se sraženinou vzniklou kyselým srážením, ale vzniká beze změny kyselosti mléka, působením enzymu, který je hlavní složkou syřidla. Syřidlové enzymy mají charakter proteolytických enzymů. Hlavním substrátem při syření mléka je κ -kasein. Původně se používal výhradně chymozin. Dnes se používá několik druhů proteináz živočišného a mikrobiálního původu (např.: pepsin, gastricin). Proces srážení mléka syřidlem má dvě fáze. Při primární fázi je rozrušen ochranný koloid kaseinových micel a při sekundární fázi je působením Ca^{2+} iontů vytvořena sraženina (Navrátilová et al. 2012).

Primární fáze je enzymatické štěpení peptidické vazby κ -kaseinu mezi 105 a 106 AMK za vzniku dvou částí. První část κ -kaseinu má vysokou afinitu k ostatním frakcím kaseinu a označuje se jako para- κ -kasein. Tato část se spolu s ostatními kaseinovými frakcemi v přítomnosti vápenatých iontů vysráží, má hydrofobní charakter. Druhá část se označuje jako glykomakropeptid, který je vysoce polární, rozpustný ve vodě a nemá afinitu k ostatním kaseinovým frakcím. Primární fáze je tedy vlastní enzymatické štěpení peptidické vazby κ -kaseinu (Law a Tamime 2010).

V sekundární fázi dochází ke srážení všech frakcí kaseinu za vzniku kaseinátu vápenatého. Hlavní funkci má para- κ -kasein, který spojuje nové micelární útvary. Přítomnost Ca^{2+} iontů v mléce je tedy nezbytná a této skutečnosti se v praxi využívá k oddělení obou fází srážení. Sekundární fáze pokračuje synerézí za současného uvolňování syrovátky (Law a Tamime 2010).

3.4 Geny mléčných bílkovin

Více jak 95 % proteinů obsažených v mléce přežvýkavců je syntetizováno z šesti strukturních genů. Geny pro α_{s1} -kasein (*CSN1S1*), β -kasein (*CSN2*), α_{s2} -kasein (*CSN1S2*) a κ -kasein (*CSN3*) se nacházejí na chromozomu 6 v daném pořadí a dohromady mají velikost 250 kb. Gen kódující α -laktalbumin (*LAA*) byl nalezen na chromozomu 5 a gen pro β -laktoglobulin (*LGB*) na chromozomu 11 (Threadgill a Womack 1990). Uspořádání jednotlivých genů zobrazuje obrázek 3. K expresi během laktace v epiteliálních buňkách prsní žlázy slouží kromě TATA boxů a CAAT boxů, které umožňují vazbu RNA-polymerázy II a začátek transkripce, také specifická vazebná místa pro rozmanité efekторы. Tyto efekторы indukují a modulují expresi. Indukci genů mléčných bílkovin ovlivňuje řada hormonů, mezi které patří prolaktin, růstový hormon, glukokortikoidy, aj. Interakce epiteliálních buněk s extracelulárním matrix hraje klíčovou roli v expresi genů mléčných bílkovin (Rosen et al. 1999).



Obrázek 3: Organizace genů mléčných bílkovin u skotu (Martin et al. 2002).

3.4.1 Polymorfismus genu κ -kasein

Genetická variabilita genů mléčných bílkovin je způsobena SNP nebo strukturní aberací (substituce, delece). Nejčastěji jsou detekovány elektroforeticky, IEF nebo chromatograficky. Analýza DNA umožnila identifikaci známých variant proteinů různými technikami, např. PCR-RFLP, alelově specifická PCR, sekvenování (Caroli et al. 2009). Farrell et al. (2004) uvádí 11 genetických variant genu *CSN3*: *A*, *B*, *C*, *E*, *F¹*, *F²*, *G¹*, *G²*, *H*, *I*, *J* u *Bos* genus. Caroli et al. (2009) uvádí navíc ještě alely *A¹* a *B²*.

Alely *A* a *B* jsou nejběžnějšími variantami, se kterými se u evropských plemen skotu můžeme setkat. Alela *B* se liší od alely *A* substitucí Ile za Thr na pozici 136 a substitucí Ala za Asp v poloze 148. U většiny hospodářsky využívaných plemen převládá alela *A*. Výjimkou jsou plemena jersey a brown swiss u kterých je nejběžnější alela *B*. Byla zjištěna také alela *A¹*, která obsahuje SNP v poloze 150, změna *G* za *A* na třetí pozici. Tato mutace nemění vznik AMK (Caroli et al. 2009). Gorodetskii a Kaledin (1987) uvádějí také alelu *B²*, která se liší od alely *B* substitucí Thr 153 za Ile 153. Alelu *B* poté označuje jako alelu *B¹*.

Alela *C* se liší od alely *A* substitucí His za Arg v místě 97. Poprvé byla objevena u tyrolského šedého skotu alkalickou elektroforézou. Později byl výskyt alely *C* prokázán pomocí IEF (Krause et al. 1988). Alela *E* se liší od alely *A* substitucí Gly za Ser v poloze 155 (Farrell et al. 2004). Alela *F¹* byla objevena pomocí PCR analýzy u zebu a černobílého hybridního skotu. Analýza odhalila dvě SNP. *G* za *T* v druhé pozici Thr 145 (AMK se nemění) a *T* za *G* ve druhé pozici Asp 148, což způsobuje změnu na Val 148. Alela *F²* obsahuje změny *A* za *B* a substituci *A* za *G*, což vede ke změně His 10 za Arg 10. Další alela *G¹* byla zaznamenána u alpských plemen pomocí izoelektrické fokusace a později potvrzena SNP pomocí PCR. Arg 97 alely *B* je změněn na Cys 97. Alela *G²* se liší od alely *A* změnou Asp za Ala v místě 148 a kodony 167 a 168 jsou odlišné od *G¹*, ale tyto změny nemají za následek změnu fenotypu proteinu (Prinzenberg et al. 1996). Poprvé byla popsána u *Bos grunniens* a nedávno byla potvrzena u stejného druhu (Prinzenberg et al. 2008). Další alela *H* se liší od alely *A* mutací Ile za Thr 135. Alela *I* se liší od alely *A* změnou Ala za Ser na místě 104. Poslední alela *J* byla objevena u *Bos taurus* na Pobřeží slonoviny. Od alely *B* se liší mutací Arg za Ser 155 (Farrell et al. 2004). Rozdíly mezi jednotlivými variantami genu *CSN3* jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Variabilita genu *CSN3* u *Bos genus* (Caroli et al. 2009).

Alely genu <i>CSN3</i>													
Gen Protein	A	A ¹	B	B ²	C	E	F ¹	F ²	G ¹	G ²	H	I	J
12690	CGC							CAC					
10	Arg							His					
12940	ACT			ACC									
93	Thr			Thr									
12950	CGT								TGT				
97	Arg								Cys				
12951	CGT				CAT								
97	Arg				His								
12971	TCA											GCA	
104	Ser											Ala	
13065	ACC								ATC		ATC		
135	Thr								Ile		Ile		
13068	ACC		ATC	ATC	ATC								ATC
136	Thr		Ile	Ile	Ile								Ile
13096	ACT						ACG						
145	Thr												
13104	GAT		GCT	GCT	GCT		GTT		GCT				GCT
148	Asp		Ala	Ala	Ala		Val		Ala				Ala
13111	CCA	CCG											
150	Pro												
13119	ATT			ACT									
153	Ile			Thr									
13124	AGC						GGC						?
155	Ser						Gly						Arg
13162	ACT			ACC						ACC			
167	Thr												
13165	GCA		GCG	GCG	GCG					GCG			
168	Ala												

3.4.2 Vliv genotypů *CSN3* na kvalitu mléka a mléčnou užitkovost

Většina z mezinárodních chovných programů byla do nedávna zaměřena pouze na zvyšování produkce mléka. Nicméně chovné cíle by se měly na základě nových poznatků diverzifikovat, aby zahrnovaly také kvalitu produkovaného mléka, zdraví a funkční vlastnosti krav. Obsah a kvalita tuků a bílkovin má velký význam pro mlékárenský průmysl (Cecchinato et al. 2014). κ -kasein představuje 8 – 15 % celkového obsahu bílkovin v mléce. U hospodářsky využívaných mléčných plemen se nejčastěji vyskytují alely *A* a *B*. Méně časté jsou alely *E* a *C*.

Jednotlivé varianty ovlivňují výtěžnost, složení a vlastnosti mléka. Z pohledu kvality sýřeni a schopnosti mléka srážet se, je pozitivně vnímána alela *B*. Ostatní alely jsou brány negativně. Proto jako nejlepší genotyp z hlediska kvality mléka je genotyp *BB* (Dvořáková et al. 2004). Genotyp *AA* je spojený s vyšší produkcí mléka, nižším obsahem tuků a bílkovin, delším časem potřebným na sýření, nižší produkcí a kvalitou sýřeni. Genotyp *BB* má pozitivní vliv na sýřitelnost mléka, zvyšuje výtěžnost sýra a zkracuje dobu sýření. Některé studie také uvádějí, že genotyp *BB* zvyšuje obsah tuků a bílkovin, jiné studie toto tvrzení nepotvrdily. (Kučerová et al. 2006). Legarová a Kouřimská (2010) zkoumaly vliv polymorfismu genu *CSN3* na výrobu sýrů u holštýnského plemene. Mléko s genotypem *BB* mělo nejlepší technologické vlastnosti (vyšší obsah sušiny a tuků, vyšší výnos a kratší dobu sýření) v průběhu výroby sýrů. Následoval genotyp *AB*. Mléko s genotypem *AA* vykazovalo nejméně žádoucí vlastnosti pro výrobu sýrů. Vyšší obsah proteinů u krav s genotypem *BB* se nepotvrdil. Oproti tomu Dvořáková et al. (2004) sledovala u dojnic holštýnského plemene genotypu *BB* zvýšený obsah bílkovin oproti ostatním genotypům o 0,11 – 0,19 % za 100 dní laktace. To naznačuje, že významné účinky pozorované v některých studiích, byly způsobeny nejen genotypem genu *CSN3*, ale i dalšími geny nebo specifickou kombinací genů fyzicky spojených s tímto lokusem. Geny *CSN1S1* a *CSN2* jsou také umístěny na chromozomu 6 a to v blízké oblasti k *CSN3*. Tato fyzická blízkost genů ztěžuje oddělení účinků jednotlivých genů. Proto se některé studie zaměřily na účinek haplotypů genů pro κ -kasein (Boettcher et al. 2004).

Boettcher et al. (2004) zkoumali vliv haplotypů *CSN* na mléčnou produkci u plemene brown swiss a italského holštýnského plemene. Největší vztahy byly pozorovány u obsahu proteinů v mléce. Odhadované dopady stejných haplotypů byly podobné napříč plemeny. Tato podobnost může naznačovat skutečný vliv haplotypů *CSN* na určité znaky. Haplotyp BA^1B byl spojen se zvýšeným obsahem tuků a proteinů v mléce, ale byl také spojen se sníženou dojivostí. Obecně platí, že haplotypy obsahující alelu *B* *CSN3* měly vyšší obsah proteinů v mléce, ale menší dojivost. Otázkou ve studiu haplotypů je, zda pozorované účinky jsou způsobeny polymorfismy DNA uvnitř kaseinového komplexu nebo interakcemi jednotlivých genů (Boettcher et al. 2004). Dvořáková et al. (2004) zase uvádějí, že β -kasein (A^2), κ -kasein (*B*) a β -laktoglobulin společně zlepšují obsah proteinů a tuků. Například alely A^2 β -kaseinu a *B* β -kaseinu nemají samostatně pozitivní vliv na produkci mléka a mléčného proteinu. Společně ovšem působí pozitivně. *BB* β -kasein zase zvyšuje podíl bílkovin v mléce (Dvořáková et al. 2004).

3.4.3 Frekvence alel genu *CSN3* u jednotlivých plemen skotu

U hospodářských plemen skotu se vyskytují převážně alely *A* a *B* genu *CSN3*. U některých plemen můžeme nalézt výjimečně alely *C* a *E*. Ostatní alelické varianty se u hospodářských plemen běžně nevyskytují. Alela *A* má nejvyšší výskyt u většiny plemen. Tato dominance alely *A* může být způsobena dosavadními cíly šlechtitelských stanic, které se zaměřovaly především na množství vyprodukovaného mléka. Jak vyplívá z předešlé kapitoly, alela *A* je spojená s vyšší produkcí mléka, proto se její výskyt mohl šlechtěním zvýšit. Alela *B* je častější než alela *A* pouze u plemen jersey a brown swiss (Kukovics a Németh 2013). Výskyt jednotlivých alel a jejich četnost u různých plemen skotu naleznete v tabulce 3.

Tabulka 3: Frekvence alel genu *CSN3* u vybraných plemen.

Plemeno	Alela				Zdroj
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>E</i>	
Brown swiss	0,33	0,67			Van Eenennaam a Medrano (1991)
Jersey	0,14	0,86			Van Eenennaam a Medrano (1991)
Holštýnský skot	0,82	0,18			Van Eenennaam a Medrano (1991)
Guernsey	0,73	0,27			Van Eenennaam a Medrano (1991)
Český strakatý skot	0,60	0,38		0,02	Kučerová et al. (2006)
Simentálský skot	0,68	0,31	0,01		Cardak (2005)
Turecký černobílý skot	0,68	0,32			Gurcan (2011)
Charolaiský skot	0,40	0,60			Pacheco Contreras et al. (2011)
Sindi zebu	0,66	0,34			Da Silva a Del Lama (1997)
Nelore zebu	0,97	0,03			Da Silva a Del Lama (1997)
Pincgavský skot	0,53	0,47			Balteanu et al. (2010)

3.5 Plemeno brown swiss

Plemeno brown swiss (švýcarský hnědý skot) pochází původně ze Švýcarska, odtud se následně rozšířilo do všech oblastí Alp. Je jedním z nejstarších kulturních plemen skotu. Hojně se dnes chová po celé Evropě, v USA, Kanadě, Jižní Americe a dokonce i v Africe. Zbarvení je vždy plášťově hnědé s velkou variabilitou, od světle okrové po tmavě hnědou (viz obrázek 4). Paznehty a konce rohů mají tmavý pigment. Hmotnost dospělých krav se pohybuje od 550 do 650 kg a výška v kohoutku je od 135 do 140 cm. Brown swiss můžeme zařadit mezi plemena kombinovaná, ale v dnešní době se řadí hlavně mezi plemena mléčně užitková. Mléčná užitkovost se za normovanou laktaci (305 dní) pohybuje od 6 000 kg do 8 000 kg mléka. Mléko

obsahuje obvykle 3,8 – 4,5 % tuku a 3,3 – 3,7 % bílkovin. Podrobná užitkovost je zobrazena v tabulce 4. Velmi ceněnou vlastností je jejich dlouhověkost, objevují se i dojnice na patnácté laktaci. Dlouhověkost je dána pevností končetin a celkově výtečnou fitness. Mléko tohoto plemene je oblíbené u výrobců sýrů, protože frekvence alely *B* genu *CSN3* se celosvětově odhaduje mezi 65 – 75 %. Plemeno brown swiss se také používá pro užitkové křížení na holštýnské plemeno. Tyto pokusy se provádí i v ČR. Hlavní přednosti jsou tedy dlouhověkost, pevné končetiny, vysoká produkce kvalitní mléčné bílkoviny, přizpůsobivost na prostředí a dobrá fitness (Klub chovatelů Brown swiss 2014).

Do ČR bylo v minulosti dovezeno asi 200 jalovic, dále jsou dovážena embrya a používají se býci pro užitkové a převodné křížení. Předpokládá se, že jejich chov bude díky dobrým užitkovým a chovným vlastnostem dále narůstat. V červnu roku 2015 byl v ČR oficiálně ustanoven Svaz chovatelů skotu plemene brown swiss a vede se plemenná kniha. V současnosti se v ČR chová 537 čistokrevných zvířat a kolem 4 000 zvířat s minimálně polovičním podílem krve brown swiss. V ČR jsou evidováni tyto chovatelé: Farma Struky (Písek), Farma Bláto s.r.o. (Uhlířské Janovice), Fadom s.r.o. (Dolní Město), Miroslav Diviš (Láz), Josef Diviš (Chrástovice) a Petr Hruňek (Ondřejov) (Ježková 2016).

Tabulka 4: Výsledky kontroly užitkovosti u plemene brown swiss v roce 2012 – 2013 v ČR (Klub chovatelů Brown swiss 2014).

Laktace	Mléko (kg)	Tuk (%)	Tuk (kg)	Bílkoviny (%)	Bílkoviny (kg)
I.	5164	4,39	227	3,60	188
II.	8252	4,15	342	3,62	299
Všechny*	7690	4,18	321	3,63	279

* průměrná užitkovost za všechny laktace

3.6 Plemeno jersey

Plemeno jersey patří k nejstarším dojným plemenům, je známé více jak 600 let. Pochází z ostrova Jersey, který se nachází v Lamanšském průlivu. V současnosti je rozšířené po celém světě. Nejpočetnější chovy se nacházejí na Novém Zélandu, v USA, Anglii a Dánsku. Jerseyký skot je specializovaný na mléčnou produkci. Má malý tělesný rámec se slabým osvalením. V kohoutku dosahuje výšky 117 až 125 cm. Hmotnost dospělých krav je 350 až 420 kg. Zbarvení je žlutohnědé s odstíny od světlé po tmavou (viz obrázek 5). Paznehty jsou pevné s tmavým pigmentem. Charakteristická je štíčí hlava, obdélníkový tělesný rámec s hlubokým hrudníkem a břichem. Díky vysokému obsahu pevných složek mléka se také nazývá sýrašským

plemenem. Obsah bílkovin v mléce se pohybuje od 3,9 do 4,4 % a obsah tuku je 5 až 6,5 %. Podrobná užitkovost je zobrazena v tabulce 5. Mléko je žlutě zbarvené díky zvýšenému obsahu karotenu. Vyšší zastoupení *B* alely kappa kaseinu oproti ostatním plemenům zvyšuje výtěžnost při zpracování mléka na sýry až o 15 %. Plemeno vyniká pevnou konstitucí, plodností, dlouhověkostí a vysokou mléčnou užitkovostí. Vyžaduje pastvu a pohyb venku po celý rok (Český svaz chovatelů jerseyjského skotu 2014).

V ČR je tento skot chován od 60. let, kdy byl dovezen k pokusným účelům na školní statek v Lánech. V roce 2014 bylo v ČR evidováno 1 104 kusů čistokrevných plemenic a 2 729 plemenic s převažujícím podílem jerseyjské krve. Průměrná užitkovost českých jerseyjských krav je 6 000 kg mléka za laktaci u starších krav a 5 450 kg mléka u krav v 1. laktaci. V roce 2015 byli v Česku evidováni tři býci v přirozené plemenitbě, jeden býk po základním výběru do inseminace a dvanáct býků bylo využíváno k inseminaci (pět z USA, tři z Velké Británie a čtyři z Dánska). Od roku 1990 se v ČR vede plemenná kniha. Jerseyjský skot se v ČR chová na farmách v Tehově, v Lázu, Chorušicích, Dolním Částkově, Heřmanicích u Králík, u Brandýsa nad Labem či v Holubicích (Ježková 2016).

Tabulka 5: Výsledky kontroly užitkovosti u plemene jersey v roce 2012 – 2013 v ČR (Český svaz chovatelů jerseyjského skotu 2014).

Laktace	Mléko (kg)	Tuk (%)	Tuk (kg)	Bílkoviny (%)	Bílkoviny (kg)
I.	4499	5,16	232	3,84	173
II.	6081	5,48	333	4,00	243
Všechny*	5331	5,35	285	3,93	210

* průměrná užitkovost za všechny laktace



Obrázek 4: Plemeno brown swiss (Klub chovatelů Brown swiss 2015). **Obrázek 5:** Plemeno jersey (Zajíček 2016).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Použité vzorky

Ve své práci jsem analyzoval vzorky kravské krve, které byly získány od devíti chovatelů z České republiky. Celkový soubor činil 240 vzorků krve, z toho 78 plemene brown swiss a 162 plemene jersey. Vzorky byly analyzovány v laboratoři Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat.

4.1.2 Použité přístroje

- Box Ultra Cam Digital Imaging (Ultra Lum, Claremont, USA)
- Centrifuga Mikro 20 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Německo)
- Elektroforetická vana (Omni Bio, Brno, ČR)
- Elektrycký zdroj Power Pac 300 (Biorad, Hercules, USA)
- Fotoaparát Power Shot G6 (Canon, Tokyo, Japonsko)
- Termální cykler PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Quebec, Kanada)
- Termoblok Dry Bath Incubator (Major Science, Saratoga, USA)
- Termostat BE 200 (Mettler GmbH, Schwabach, Německo)
- Transiluminátor Electronic UV Transilluminator (Ultra Lum, Claremont, USA)
- Třepačka Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Váhy SBA 41 Scaltec (Sartorius, Bohemia, USA)

4.2 Metodika

4.2.1 Izolace DNA z krve

Pro izolaci DNA z krve byl použit komerční kit Blood/Cell DNA Mini Kit (GB100, GB300) (Geneaid Biotech, New Taipei City, Taiwan).

Reagencie

- RBC lyzační pufr
- GB pufr
- W1 pufr
- Promývací pufr
- Ethanol
- Eluční pufr
- GD kolonky + kompatibilní zkumavky (2 ml)

Příprava vzorku

- Do mikro-centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml napipetujeme 300 μ l krve.
- Přidáme 900 μ l RBC lyzačního pufru a promícháme převrácením zkumavky.
- Zkumavku inkubujeme při pokojové teplotě po dobu 10 minut.
- Centrifugujeme 5 minut při otáčkách 3 000 g/min, aby se supernatant zcela oddělil.
- Přidáme 100 μ l RBC lyzačního pufru k resuspendování pelet leukocytů.

Buněčná lize

- Přidáme 200 μ l GB pufru a důkladně protřepeme.
- Inkubujeme při 60 °C minimálně 10 minut, dokud není vzorek čirý. Během inkubace vzorek promícháme obrácením každé 3 minuty.
- Během inkubace vzorku si předehřejeme eluční pufr na 60 °C, který budeme potřebovat později.
- Po uplynutí inkubace vzorku se ujistíme, že je lyzát čirý a přidáme 5 μ l RNázy A (10 mg/ml) a důkladně protřepeme.
- Inkubujeme při pokojové teplotě 5 minut.

Vazba DNA

- K lyzátu napipetujeme 200 μ l absolutního ethanolu a promícháme intenzivním třepáním po dobu přibližně 10 sekund.
- GD kolonku umístíme do kompatibilní zkumavky o objemu 2 ml.
- Veškerý vzorek přeneseme na GD kolonku a centrifugujeme při 14 000 g/min po dobu 5 minut.
- GD kolonku vložíme do nové zkumavky o objemu 2 ml.

Promývání

- Na GD kolonku přidáme 400 μ l W1 pufru a centrifugujeme při 14 000 g/min 30 až 60 sekund.
- Odstraníme obsah zkumavky pod kolonku a vrátíme ji zpět prázdnou.
- Přidáme 600 μ l promývacího pufru na GD kolonku a opět centrifugujeme při 14 000 g/min 30 až 60 sekund.
- Znovu odstraníme obsah zkumavky a vrátíme ji zpět.
- GD kolonku centrifugujeme při 14 000 g/min další 3 minuty, aby byla kolonka suchá.

Eluce DNA

- Přeneseme vysušenou GD kolonku do čisté mikro-centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml.
- Přidáme 100 μ l předehřátého elučního pufru do středu GD kolonky.
- Necháme odstát alespoň 3 minuty, dokud se pufr neabsorbuje.
- GD kolonku centrifugujeme při 14 000 g/min 30 sekund.
- Odstraníme GD kolonku a čistou DNA ve zkumavce uschováme.

Ověření kvality a uskladnění DNA

- Kvalitu získané DNA zjistíme pomocí 1% agarózové elektroforézy. Popis metody naleznete níže.
- Zkumavky s izolátem DNA uschováme při -20 °C pro další použití.

4.2.2 PCR-RFLP

K identifikaci polymorfismů genu *CSN3* jsem použil metodu PCR-RFLP. Metodika byla převzata z práce Galila a Samah (2008).

4.2.2.1 PCR

Délka amplifikovaného fragmentu byla 379 bp. Návrhy primerů byly převzaty z práce Galila a Samah (2008).

Přímý: 5'-CAC GTC ACC CAC ACC CAC ATT TAT C - 3'

Zpětný: 5'-TAA TTA GCC CAT TTC GCC TTC TCT GT- 3'

Reagencie

- PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR): 2× koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl (pH8,8 při 25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva
- Primery (KRD s.r.o., Praha, ČR): zásobní roztok 100 pmol/μl, pracovní roztok 10 pmol/μl
- Ultračistá H₂O (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR)

Postup

- Reakční směs pro PCR připravíme na ledu podle tabulky 6 v uvedeném pořadí a promícháme.
- Přidáme 1 μl izolované DNA a zvortexujeme.
- PCR reakci provedeme v automatickém termálním cykleru.
- Termální cykler nastavíme podle tabulky 7.
- Úspěšnost PCR reakce otestujeme pomocí 3% agarózové elektroforézy.
- Produkt PCR uschováme při 4 °C pro další použití.

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR.

Složka	Množství
dH ₂ O	9,5 µl
PPP mix	12,5 µl
primer A	1 µl
primer B	1 µl
celkové množství	24 µl

Tabulka 7: Nastavení podmínek cyklování pro PCR reakci.

Kroky cyklování	Teplota	Čas
Úvodní denaturace DNA	95°C	2 min
Denaturace	95°C	60 s
Anealing	Cyklování 30 × 60°C	60 s
Elongance	72°C	45 s
Závěrečná elongance	72°C	7 min
Chlazení	4°C	∞

4.2.2.2 RFLP

K rozdělení PCR produktu na jednotlivé fragmenty jsem použil restrikční enzym *HinfI*.

Restrikční místo enzymu je:



N = A, T, C, G

Po štěpení má alela A velikost fragmentů 156 bp, 132 bp, 91 bp a alela B 288 bp a 91 bp.

Reagencie

- 10 U/µl enzymu *HinfI* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- Ultračistá H₂O (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR)
- Pufir R (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

Postup

- Reakční směs pro RFLP připravíme podle tabulky 8 v uvedeném pořadí.
- Přidáme 10 µl PCR produktu a zvertexujeme.
- Směs přendáme do termostatu vyhřátého na 37 °C a necháme inkubovat do dalšího dne.
- Výsledek štěpení RFLP zjistíme pomocí 3% agarózové elektroforézy.

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro RFLP.

Složka	Množství
dH ₂ O	3,4 µl
pufř	1,5 µl
enzym <i>Hinf</i> I	0,1 µl
celkové množství	5 µl

4.2.3 Agarózová elektroforéza

K vizualizaci a kontrole jednotlivých metod jsem použil horizontální agarózovou elektroforézu. Pro kontrolu izolované DNA jsem použil 1% roztok agarózy a marker M1kb. Při detekci amplifikovaných segmentů po PCR a pro identifikaci velikosti fragmentů po štěpení restriktázou jsem použil 3% agarózový gel a marker M50.

Reagencie

- Hmotnostní standard M1kb DNA Ladder a M50 DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- Agaróza (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- TBE pufř (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethidium bromid EtBr 0,5 mg/ml (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR)
- Nanášecí pufř (40% sacharóza, 0,25% bromfenolová modř)

Postup

- Do 60 ml TBE pufřu přidáme 0,6 g (1,8 g pro PCR-RFLP) agarózy, promícháme a vaříme v mikrovlnné troubě, dokud nám nevznikne homogenní roztok.
- Gel necháme ochladit na teplotu cca 60 °C.

- Pipetou přidáme 6 μl EtBr, promícháme a nalijeme do připravené elektroforetické misky. Nakonec vložíme hřebínky dle potřeby a gel necháme ztuhnout.
- Ponoříme misku s gelem do elektroforetické vany s TBE pufrem a opatrně vyjmeme hřebínky.
- Do vzniklých jamek nanese jednotlivé vzorky (5 μl), dle potřeby smícháme s nanášecím pufrem (1 μl).
- Do krajních jamek nanese 6 μl markeru M1kb (M50 pro PCR-RFLP) pro následné porovnání velikosti.
- K elektroforetické vaně připojíme zdroj stejnosměrného napětí a nastavíme napětí 5V/cm.
- Elektroforézu necháme běžet dle potřeby (cca 30 minut).
- Gel vyjmeme z vany a umístíme na UV transiluminátor a výsledný obraz vyfotografujeme.

4.3 Matematicko-statistické zpracování výsledků

4.3.1 Výpočet frekvence alel a genotypů

Ke stanovení frekvencí byly použity rovnice zobrazené v Tabulce 9 a 10.

Tabulka 9: Výpočet frekvence genotypů (Urban 2008).

Genotypy	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
<i>AA</i>	<i>D</i>	$d = \frac{D}{N}$
<i>AB</i>	<i>H</i>	$h = \frac{H}{N}$
<i>BB</i>	<i>R</i>	$r = \frac{R}{N}$
Součet	$D + H + R = N$	$d + h + r = 1$

Pozn.: *D*, *H*, *R* = absolutní frekvence genotypů; *d*, *h*, *r* = relativní frekvence genotypů; *N* = velikost populace

Tabulka 10: Výpočet frekvence alel (Urban 2008).

Alely	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
A	$P = 2D + H$	$p = \frac{2D + H}{2N} = \frac{P}{2N}$
B	$Q = 2R + H$	$q = \frac{2R + H}{2N} = \frac{Q}{2N}$
Součet	$P + Q = 2N$	$p + q = 1$

Pozn.: P, Q = absolutní frekvence alel; p, q = relativní frekvence alel; N = velikost populace; D, H, R = absolutní frekvence genotypů; d, h, r = relativní frekvence genotypů

4.3.2 Hodnocení genetické rovnováhy pomocí Hardy-Weinbergova principu

Rovnovážnost stavu zjištěných frekvencí byla posouzena dle Hardy-Weinbergova zákona, kde platí:

$$1 = \frac{p^2}{f(AA)} + \frac{2pq}{f(AB)} + \frac{q^2}{f(BB)}$$

K vyhodnocení byl použit chí-kvadrát (test dobré schody):

$$\chi^2_{(\alpha; n-p-1)} = \sum \frac{(P - O)^2}{O}$$

Kde platí, že:

P pozorovaná četnost genotypu

O očekávaná četnost genotypu

Σ suma

α hladina významnosti

$n - p - 1$ výpočet stupně volnosti

4.3.3 Asociační analýza

Ke statistickým výpočtům byla použita asociační analýza - procedura GLM (zobecněný lineární model) se dvěma pevnými faktory - gen a plemeno v programu SAS verze 9.4 (SAS Institute Inc. 2016).

K vypočítání asociační analýzy byla navržena tato rovnice:

$$y_{ijk} = \mu + CSN3_i + plem_j + lakt_k + e_{ijk}$$

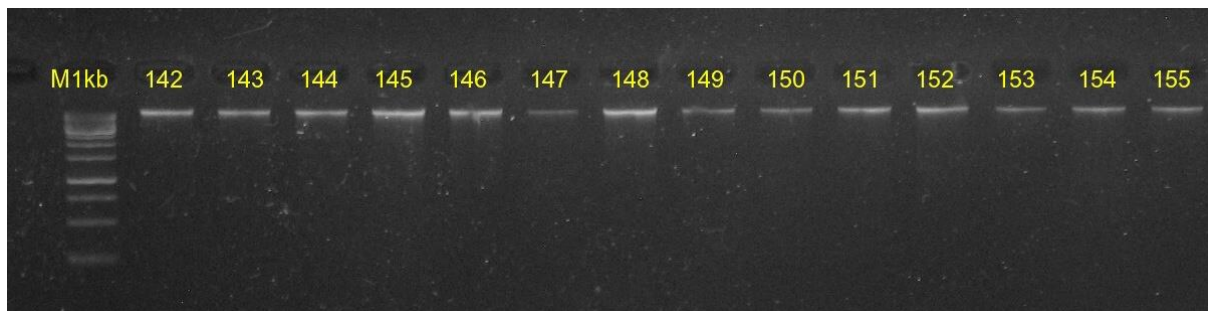
Kde platí, že:

y_{ij}	užitkový znak
μ	průměrná hodnota sledované vlastnosti
$CSN3_i$	pevný efekt genu $CSN3$
$plem_j$	pevný efekt plemene
$lakt_k$	regrese na počet dní laktace
e_{ij}	náhodná chyba

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Izolace DNA

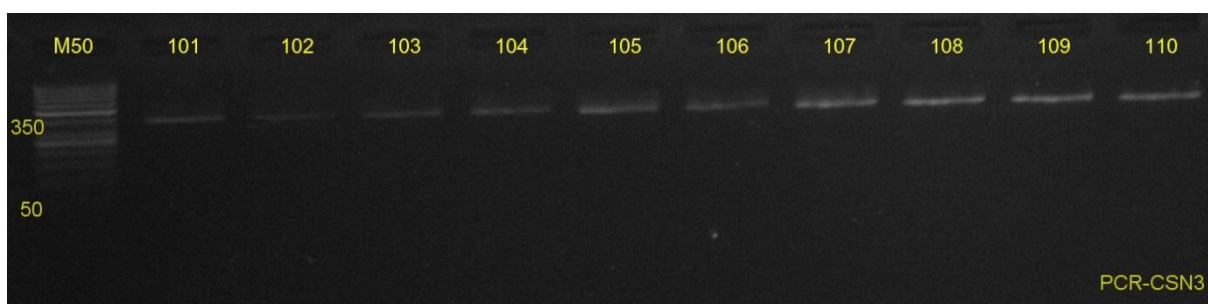
Kolonkovou metodou jsem izoloval 240 vzorků kravské krve. U tří vzorků se nepovedlo izolovat DNA z důvodu nekvalitní krve. Obrázek 6 zobrazuje výsledek izolace DNA na agarózovém gelu s použitím EtBr a velikostního markeru M1kb.



Obrázek 6: Vizualizace izolace DNA z kravské krve.

5.2 PCR

Polymorfismus genu *CSN3* byl amplifikován metodu PCR. Amplifikovaný fragment měl délku 379 bp. Pro ověření amplifikace jsem použil agarózovou elektroforézu. K vizualizaci byl přidán EtBr. Pro porovnání velikosti byl využit marker M50. Obrázek 7 zobrazuje výsledný gel pod UV světlem.



Obrázek 7: Amplifikované fragmenty genu *CSN3* o velikosti 379 bp.

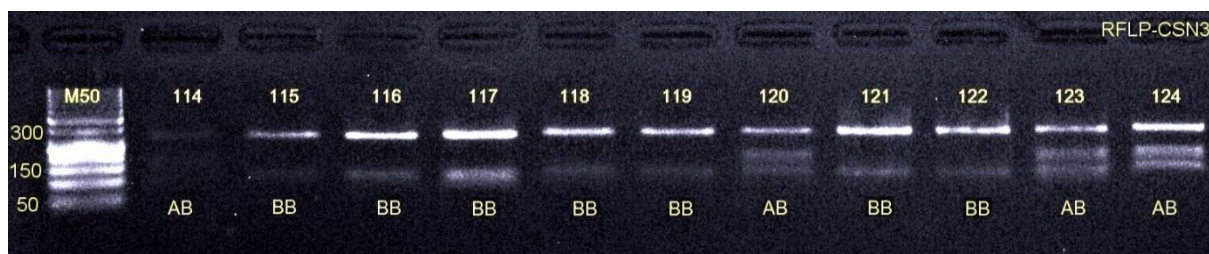
5.3 RFLP

Amplifikovaný produkt PCR reakce byl štěpen restriční endonukleázou *Hinf*I. V PCR produktu se nacházejí 3 restriční štěpná místa. Po štěpení vznikly u genotypu *AA* fragmenty o délce 91 bp, 132 bp a 156 bp, u genotypu *AB* fragmenty o délce 91 bp, 132 bp, 156 bp a 288 bp a u genotypu *BB* fragmenty o délce 91 bp a 288 bp (viz obrázek 8).

Velikost fragmentu	AA	AB	BB
288 bp		—————	—————
156 bp	—————	—————	
132 bp	—————	—————	
91 bp	—————	—————	—————

Obrázek 8: Vizualizace štěpení genu *CSN3* enzymem *Hinf*I.

K vyhodnocení byla použita horizontální agarózová elektroforéza. Výsledek štěpení je patrný na obrázku 9.



Obrázek 9: Výsledek štěpení PCR produktu restriční endonukleázou *Hinf*I.

5.4 Matematicko-statistické vyhodnocení

5.4.1 Stanovení frekvence alel a genotypů

Celkový soubor obsahoval 240 testovaných jedinců. U 237 jedinců byl zjištěn genotyp. Zbylé tři jedince se nepodařilo genotypizovat kvůli nekvalitním vzorkům krve. Výpočty frekvencí byly provedeny dle tabulek uvedených v kapitole 4.3.1. Tabulka 11 a 12 zobrazuje

frekvence genotypů a alel z celého souboru jedinců. Tabulka 14 a 15 zobrazuje jednotlivé frekvence dle příslušného plemene. V tabulce 13 je poměr zastoupených plemen.

Tabulka 11: Frekvence genotypů genu *CSN3*.

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
<i>AA</i>	9	0,0380
<i>AB</i>	74	0,3122
<i>BB</i>	154	0,6498
celkem	237	1

Tabulka 12: Frekvence alel genu *CSN3*.

Alela	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
<i>A</i>	92	0,1941
<i>B</i>	382	0,8059
celkem	474	1

Tabulka 13: Frekvence plemene brown swiss a jersey.

Plemeno	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
BSW	78	0,325
J	162	0,675

V celkovém souboru jedinců byl nejběžnější genotyp *BB* s četností 65 %. Genotyp *AB* byl druhý nejpočetnější s četností 31 %. Nejméně častý byl genotyp *AA*, který se vyskytoval jen u necelých 4 % jedinců. Nejvíce zastoupena byla alela *B* s frekvencí 80 %. Alela *A* měla frekvenci 20 %. Z celkového souboru bylo 78 jedinců plemene brown swiss a 162 plemene jersey.

Tabulka 14: Frekvence genotypů u jednotlivých plemen.

Genotyp	Brown swiss		Jersey	
	Absolutní frek.	Relativní frek.	Absolutní frek.	Relativní frek.
<i>AA</i>	6	0,0800	3	0,0185
<i>AB</i>	31	0,4133	43	0,2654
<i>BB</i>	38	0,5067	116	0,7160
celkem	75	1	162	1

Tabulka 15: Frekvence alel u jednotlivých plemen.

Alela	Brown swiss		Jersey	
	Absolutní frek.	Relativní frek.	Absolutní frek.	Relativní frek.
<i>A</i>	43	0,2867	49	0,1512
<i>B</i>	107	0,7133	275	0,8488
celkem	150	1	324	1

Pořadí četností genotypů se u plemen brown swiss a jersey nelišilo. Plemeno jersey má oproti brown swiss větší frekvenci genotypu *BB* a genotyp *AA* se vyskytuje jen zřídka. Plemeno brown swiss mělo frekvenci genotypů *AA* 8 %, *AB* 41 %, *BB* 51 % a frekvenci alel *A* 29 % a *B* 71 %. Plemeno jersey mělo frekvenci genotypů *AA* 2 %, *AB* 26 %, *BB* 72 % a frekvenci alel *A* 15 % a *B* 85 %.

Gustavsson et al. (2014) uvádějí ve své práci podobné četnosti genotypů a alel, jako v této studii. K analýze použili 406 vzorků dánského jerseyjského skotu. Genotyp *AA* se vyskytoval u 3,7 %, genotyp *AB* u 33,8 % a genotyp *BB* u 62,5 % populace. Četnost alely *A* byla 20,6 % a alely *B* 79,4 %. Zepeda-Batista et al. (2015) zkoumali polymorfismus genu *CSN3* u 400 kusů jerseyjského skotu chovaného v Mexiku. Ve zkoumané populaci detekovali u několika jedinců alelu *E* s četností 6 %. Alela *A* se vyskytovala u 27 % a alela *B* u 67 % populace. Oproti této studii byl nejčastější genotyp *AB*. Frekvence jednotlivých genotypů byla: *AA* 4 %, *AB* 45 %, *AE* 2 %, *BB* 42 %, *BE* 4 % a *EE* 0,02 %. Shetty et al. (2006) uvádí podobné frekvence alel a genotypů u 186 jedinců íránského jerseyjského skotu jako předešlá studie. Nejběžnější byl genotyp *AB* s četností 51 %. Druhý byl genotyp *BB* s četností 40 % a poslední genotyp *AA* s četností 9 %. Alela *A* měla frekvenci 35 % a alela *B* 65 %.

Caroli et al. (2004) detekovali podobnou frekvenci alel u plemene brown swiss jako v této studii. U 392 dojnic z Itálie uvádějí četnost alely *A* 34,7 % a alely *B* 65 %. Objevila se také alela *C* s četností pouhých 0,3 %. Chrenek et al. (2003) sledovali polymorfismus u 105 dojnic plemene brown swiss dovezených na Slovensko. Oproti mým výsledkům pozorovali větší výskyt genotypu *AA* s četností 21 %. Genotyp *AB* měl četnost 49 % a *BB* 30 %. Alela *A* měla frekvenci 46 % a alela *B* 54 %. Özdemir a Dođru (2005) uvádějí velice podobné výsledky jako předešlá studie provedená na Slovensku. Ze sta jedinců plemene brown swiss chovaných v Turecku mělo genotyp *AA* 22,78 %, *AB* 43,04 % a *BB* 34,18 %. Alela *A* měla četnost 43 % a alela *B* 57 %. Jiná studie provedená také v Turecku uvádí značně rozdílné výsledky. Akyüz a Çınar (2014) genotypizovali 108 jedinců plemene brown swiss. Rozložení genotypů bylo *AA* 44,4 %, *BB* 7,4 % a *AB* 48,2 %. Alela *A* se vyskytovala s četností 68,5 % a alela *B* s četností

31,5 %. Kim et al. (1998) sledovali také převahu alely *A* genu *CSN3* u dojnic stejného plemene. Zkoumaný soubor činil 1033 krav z Kanady. Frekvence genotypů byly *AA* 48,04 %, *AB* 44,11 %, *AC* 0,58 % a *BB* 7,27 %.

U českého strakatého skotu a holštýnského skotu převažuje ve většině případů alela *A* nad alelou *B*. Manga et al. (2008) testovali 111 krav českého strakatého skotu v 1. laktaci. Výsledné genotypy byly: *AA* 26 %, *AB* 58 % a *BB* 15 %. Četnost alely *A* byla 55 % a alely *B* 46 %. Dále testovali 67 krav holštýnského skotu. Výsledné genotypy byly: *AA* 60 %, *AB* 30 % a *BB* 10 %. Frekvence alel je poté *A* 75 % a *B* 25 %.

5.4.2 Test genetické rovnováhy populace dle Hardy-Weinbergova zákona

Výpočty stanovení genetické rovnováhy jsou uvedeny v tabulkách 16 a 17. Tabulky 18 a 19 zobrazují porovnání vypočítané hodnoty χ^2 s tabulkovou hodnotou.

Tabulka 16: Výpočet χ^2 testu pro plemeno brown swiss.

	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	Σ
P_A	6	31	38	75
O_R	0,0822	0,4090	0,5088	1
O_A	6,165	30,675	38,160	75
χ^2	0,0044	0,0034	0,0067	0,0146

Tabulka 17: Výpočet χ^2 testu pro plemeno jersey.

	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	Σ
P_A	3	43	116	162
O_R	0,0228	0,2567	0,7205	1
O_A	3,694	41,585	116,721	162
χ^2	0,1302	0,0481	0,0045	0,1828

Kde platí, že:

P_A pozorované absolutní frekvence genotypů

O_R očekávané relativní frekvence genotypů

O_A očekávané absolutní frekvence genotypů

χ^2 chí kvadrát

Tabulka 18: Porovnání hodnot χ^2 testu s tabulkovými hodnotami u plemene brown swiss.

Hladina významnosti	Tabulková hodnota pro stupeň volnosti 1	Hodnota χ^2
0,05	3,841	0,0146
0,01	6,635	0,0146

Tabulka 19: Porovnání hodnot χ^2 testu s tabulkovými hodnotami u plemene jersey.

Hladina významnosti	Tabulková hodnota pro stupeň volnosti 1	Hodnota χ^2
0,05	3,841	0,1828
0,01	6,635	0,1828

Stupeň volnosti pro gen se třemi genotypy a dvěma alelami je:

$$df = n - p - 1$$

$$df = 3 - 1 - 1 = 1$$

Kde platí, že:

df stupeň volnosti

n počet znaků

p počet kategorií

Pro dané populace byl určen stupeň volnosti 1. Vypočítané hodnoty χ^2 testu jsou nižší než dané tabulkové hodnoty. Proto můžeme potvrdit, že dané populace jsou v Hardy-Weinbergově genetické rovnováze.

5.4.3 Asociační analýza

Soubor testovaných krav činil 126 jedinců. K asociační analýze byla použita data mléčné užitkovosti za 1. laktaci. Data užitkovosti jednotlivých krav byla zjištěna z databáze plemenic PLEMDAT (PLEMDAT s.r.o. 2017). Ke statistickým výpočtům byla použita asociační analýza - procedura GLM (zobecněný lineární model) se dvěma pevnými faktory - gen a plemeno v programu SAS verze 9.4 (SAS Institute Inc. 2016).

V tabulce 20 jsou uvedeny průměrné hodnoty, střední odchylky, minimální a maximální hodnoty analyzovaných znaků. Tabulka 21 uvádí odhad nejmenších středních čtvercových hodnot u zvolených parametrů mléčné užitkovosti podle genotypů CSN3.

Tabulka 20: Popisná analýza hodnocených parametrů užitkovosti.

Genotyp		Dojivost (kg)	Tuky (%)	Tuky (kg)	Bílkoviny (%)	Bílkoviny (kg)
AA	průměr	5776	4,37	254,4	3,65	212,4
	střed. odchyl.	813	0,46	55,2	0,32	43,9
	min	4897	3,56	182,0	3,28	166,0
	max	7014	5,03	334,0	4,08	286,0
AB	průměr	5274	4,95	253,8	3,75	197,7
	střed. odchyl.	1645	0,75	64,8	0,37	61,8
	min	2080	3,78	42,0	3,02	25,0
	max	8235	7,12	366,0	4,51	311,0
BB	průměr	5272	4,98	256,4	3,85	202,3
	střed. odchyl.	1478	0,71	63,2	0,32	57,1
	min	1741	3,84	92,0	3,14	65,0
	max	9204	6,85	434,0	4,44	318,0

Tabulka 21: Odhad LSM u parametrů mléčné užitkovosti.

Genotyp		Dojivost (kg)		Tuky (%)		Tuky (kg)		Bílkoviny (%)		Bílkoviny (kg)	
CSN3	n	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
AA	7	5502	491	4,47	0,21	245,5	21,2	3,67	0,10	203,6	19,7
AB	46	5468	193	4,87	0,08	259,5	8,3	3,73	0,04	203,6	7,8
BB	73	5420	160	4,78	0,07	253,3	6,9	3,75	0,03	203,0	6,5

Pozn.: n = počet jedinců; LSM = nejmenší čtvercová střední hodnota (Least Square Mean);

SE = střední chyba průměru (Standard Error)

V tabulce 22 jsou uvedeny odhady účinku polymorfismu genu *CSN3* na jednotlivé znaky mléčné užitkovosti u testovaných jedinců.

Tabulka 22: Vliv genotypu genu *CSN3* na mléčnou užitkovost.

<i>CSN3</i>		Dojivost (kg)		Tuky (%)		Tuky (kg)		Bílkoviny (%)		Bílkoviny (kg)	
		H0	Pr	H0	Pr	H0	Pr	H0	Pr	H0	Pr
<i>AA</i>	<i>AB</i>	0,9495	N	0,0781	N*	0,5425	N	0,5568	N	0,9970	N
<i>AA</i>	<i>BB</i>	0,8757	N	0,1630	N	0,7297	N	0,4541	N	0,9785	N
<i>AB</i>	<i>BB</i>	0,8481	N	0,3892	N	0,5625	N	0,7573	N	0,9486	N

Pozn.: H0 = odhad rozdílu; Pr = průkaznost; N = neprůkazný rozdíl; * blíží se průkaznosti

V této studii nebyly zjištěny průkazné asociace genotypů genu *CSN3* k parametrům mléčné užitkovosti. Jedinci s genotypem *AA* měli nejvyšší průměrnou dojivost (5776 kg) a nejmenší průměrný obsah tuků (4,37 %) a bílkovin (3,65 %) v mléce. Jedinci s genotypy *AB* a *BB* měli srovnatelné průměrné hodnoty parametrů mléčné užitkovosti (genotyp *AB*: dojivost = 5274 kg; tuky = 4,95 %; bílkoviny = 3,75 %; genotyp *BB*: dojivost = 5272 kg; tuky = 4,98 %; bílkoviny = 3,85 %). Spojitost těchto výsledků s danými genotypy je ovšem statisticky neprůkazná. Jediný znak, který se blížil průkaznosti, ale průkazný nebyl, je obsah tuků u genotypů *AA* – *AB* (H0 = 0,0781).

Felenczak et al. (2008) zkoumali vliv κ -kaseinu na mléčnou užitkovost u simentálského skotu. Rozdíly v dojivosti mezi jedinci s různým genotypem byly minimální. Dle získaných hodnot LSM zvířata s genotypem *BB* produkovala mléko s nejvyšším obsahem tuků a bílkovin. Heterozygot *AB* měl mléko s podobným složením jako homozygot *BB*. Homozygot *AA* měl statisticky průkazný nižší obsah bílkovin a tuků v mléce vůči jedincům s genotypem *AB* a *BB*. Rachagani a Gupta (2008) zkoumali asociaci genu *CSN3* s mléčnou užitkovostí u sahiwalského skotu v Indii. Došli k podobnému závěru jako předešlá studie. Dle uvedených hodnot LSM krávy s genotypem *BB* měly vyšší obsah bílkovin v mléce. Sitkowska et al. (2008) sledovali nejvyšší dojivost u homozygotů *AA*. Homozygoti *AA* měli také nejvyšší obsah tuků a bílkovin v mléce. Dle uvedených průměrů měli jedinci s genotypy *AB* a *BB* podobné množství tuků a bílkovin v mléce, ale heterozygoti *AB* měli výrazně nižší dojivost oproti homozygotům *BB*. Kučerová et al. (2006) provedla asociční analýzu u českého strakatého skotu. Rozdíly mezi genotypy pro obsah bílkovin byly signifikantní. Genotyp *BB* byl asociován se zvýšeným obsahem bílkovin v mléce. Genotyp *BE* byl asociován s nižším obsahem bílkovin v mléce. To může znamenat, že alela *E* v kombinaci s alelou *B* má podobný vliv, jako genotyp *AA*.

Genotyp AA měl ze všech genotypů nejnižší obsah bílkovin. Trakovická et al. (2012) provedly asoiační analýzu u kříženců simentálského a holštýnského skotu. Dle uvedených hodnot LSM měli homozygoti AA nejvyšší dojivost i množství tuků a bílkovin vyprodukovaného za normovanou laktaci. Nejnižší dojivost i množství tuků a bílkovin měli homozygoti BB. Výsledky vztahu mezi genotypy CSN3 a mléčnou užitkovostí byly stejně jako v této práci neprůkazné. Deb et al. (2014) zkoumali vliv genotypu AA a AB genu CSN3 na mléčnou produkci u 200 kříženců holštýnského a sahiwalského skotu. Zvířata s genotypem AB měla výrazně vyšší dojivost oproti homozygotům AA. Hodnota P byla menší než 0,05, což značí průkazný rozdíl. Rozdíly v obsahu tuků a bílkovin v mléce nebyly signifikantní.

Tabulky 23, 24 a 25 zobrazují odhad vlivu plemene na mléčnou užitkovost u testovaných jedinců. Hodnoty $H_0 < 0,05$ znamenají průkazný rozdíl. Hodnoty $H_0 < 0,01$ znamenají vysoce průkazný rozdíl.

Tabulka 23: Vliv plemene na obsah tuku v mléce.

Plemeno	Tuky (%)			Tuky (kg)		
	LSM	SE	H0	LSM	SE	H0
BSW	4,22	0,10	<,0001	251,8	9,9	0,8656
J	5,19	0,09		253,6	9,1	

Pozn.: LSM = nejmenší čtvercová střední hodnota (Least Square Mean); SE = střední chyba průměru (Standard Error); H0 = odhad rozdílu

Tabulka 24: Vliv plemene na obsah bílkovin v mléce.

Plemeno	Bílkoviny (%)			Bílkoviny (kg)		
	LSM	SE	H0	LSM	SE	H0
BSW	3,49	0,05	<,0001	210,6	9,2	0,1465
J	3,94	0,04		196,2	8,5	

Pozn.: LSM = nejmenší čtvercová střední hodnota (Least Square Mean); SE = střední chyba průměru (Standard Error); H0 = odhad rozdílu

Tabulka 25: Vliv plemene na dojivost.

Plemeno	Dojivost (kg)		
	LSM	SE	H0
BSW	5957	229,3	<,0001
J	4969	211,2	

Pozn.: LSM = nejmenší čtvercová střední hodnota (Least Square Mean); SE = střední chyba průměru (Standard Error); H0 = odhad rozdílu

Vliv plemene na mléčnou užitkovost byl potvrzen jak u dojivosti, tak u obsahu tuků a bílkovin v mléce. Plemeno brown swiss mělo vyšší průměrnou dojivost (5853 kg), ale nižší průměrný obsah tuků (4,32 %) a bílkovin (3,50 %) v mléce. Plemeno jersey mělo nižší průměrnou dojivost (4994 kg), ale vyšší průměrný obsah tuků (5,27 %) a bílkovin (3,96 %) v mléce.

Podobné výsledky udávají kontroly užitkovosti plemene brown swiss a jersey v ČR provedené v roce 2012 – 2013 (viz tabulka 4 a 5). Plemeno brown swiss mělo v 1. laktaci průměrnou dojivost 5164 kg, obsah tuku 4,39 % a obsah bílkovin 3,6 % (Klub chovatelů Brown swiss 2014). Plemeno jersey mělo v 1. laktaci průměrnou dojivost 4499 kg, obsah tuku 5,16 % a obsah bílkovin 3,84 %. Jerseyký skot má nejvyšší obsah tuků a bílkovin ze všech dojných plemen (Český svaz chovatelů jerseyského skotu 2014).

6 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit případnou asociaci polymorfismu genu *CSN3* s mléčnou užitkovostí. V literárním přehledu byl zpracován základní přehled dané problematiky. Řada studií uvádí pozitivní vliv alely *B* genu *CSN3* na sýrařské vlastnosti mléka.

Celkový soubor testovaných jedinců činil 240 krav. U 237 jedinců byl pomocí metody PCR-RFLP zjištěn genotyp. Nejčastěji se vyskytovali homozygoti *BB* s četností 65 %. Heterozygoti *AB* měli četnost 31 % a homozygoti *AA* pouhé 4 %. Také se potvrdilo, že dle Hardy-Weinbergova zákona jsou obě populace v rovnováze.

Dalším krokem bylo posouzení vlivu polymorfismu genu *CSN3* na parametry mléčné užitkovosti. Ke statistickým výpočtům byla použita asociační analýza GLM programu SAS verze 9.4 (SAS Institute Inc. 2016). Testovaný soubor činil 126 jedinců s dostupnými údaji o mléčné užitkovosti za 1. laktaci. Ostatní jedinci nemohli být zařazeni do statistických výpočtů kvůli jejich nízkému věku a absenci údajů o mléčné užitkovosti. Jedinci s genotypy *AB* a *BB* měli vyšší průměrný obsah tuků a bílkovin v mléce oproti jedincům s genotypem *AA*, což by ukazovalo na pozitivní vliv alely *B*. Spojitost vlivu genotypů *AB* a *BB* na obsah tuků a bílkovin v mléce se ovšem ukázala jako statisticky neprůkazná. Tento výsledek mohl být zapříčiněn menším počtem sledovaných jedinců. Na mléčnou užitkovost má vliv řada faktorů (např. krmivo, stanoviště, nemoci), které mohly v malé populaci zastínit vliv genotypů.

Obě plemena se vyznačují vysokým obsahem tuků a bílkovin v mléce. Jerseyký skot má dokonce nejvyšší obsah tuků a bílkovin v mléce ze všech dojných plemen. Srovnáním užitkovosti obou plemen se potvrdilo, že jerseyký skot má vyšší obsah tuků a bílkovin v mléce a dojnice plemene brown swiss mají vyšší dojivost, což je způsobeno vyšším tělesným rámcem.

7 POUŽITÁ LITERATURA

Akyüz B., Çınar M. U., 2014. Analysis of Prolactin and Kappa-Casein Genes Polymorphism in Four Cattle Breeds in Turkey. *Annals of Animal Science*, 14(4): 799 – 806.

Alston-Mills B., 1995. Nonproteins nitrogen compounds in bovine milk. In: Jensen R. G., *Handbook of Milk Composition*, San Diego, Academic Press, s. 468 – 472.

Amills M., Serradilla J. M., Clop A., Zidi A., Jordana J., 2012. Genetics of caseins in domestic ruminants. In: Ventimiglia A. M., *Casein: Production, Uses and Health*, Nova Science Publishers, Inc. s. 59 – 81.

Balteanu V. A., Vlaic A., Suteu M., Carsai T. C., 2010. A comparative study of major milk protein polymorphism in six romanian cattle breeds. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 67: 345 – 350.

Boettcher P. J., Caroli A., Stella A., Chessa S., Budelli E., Canavesi F., Ghiroldi S., Pagnacco G., 2004. Effects of Casein Haplotypes on Milk Production Traits in Italian Holstein and Brown Swiss Cattle. *J. Dairy Sci*, 87: 4311 – 4317.

Bordin G., Cordeiro Raposo F., de la Calle B., Rodriguez A. R., 2001. Identification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 928: 63 – 76.

Cardak A. D., 2005. Effect of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. *South African Journal of Animal Science*, 35: 41 – 47.

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

Caroli A., Chessa S., Bolla P., Budelli E., Gandini G. C., 2004. Genetic structure of milk protein polymorphisms and effects on milk production traits in a local dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 121: 119 – 127.

Cecchinato A., Ribeca C., Chessa S., Cipolat-Gotet C., Maretto F., Casellas J., Bittante G., 2014. Candidate gene association analysis for milk yield, composition, urea nitrogen and somatic cell scores in Brown Swiss cows. *Animal*, 8: 1062 – 1070.

Český svaz chovatelů jerseyského skotu, 2014. Šlechtitelský program jerseyského skotu v české republice [online]. [cit. 2017-03-26]. Dostupný z: <http://www.jersey.cz/clanky/plemenna-kniha/slechtitelsky-program-jerseyskeho-skotu-v-ceske-republice/>.

Da Silva I. T., Del Lama M. A., 1997. Milk protein polymorphisms in Brazilian Zebu cattle, *Brazilian Journal of Genetics* [online]. [cit. 2017-03-28]. Dostupný z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84551997000400011.

Deb R., Singh U., Kumar S., Singh R., Sengar G., Sharma A., 2014. Genetic polymorphism and association of kappa-casein gene with milk production traits among Frieswal (HF × Sahiwal) cross breed of Indian origin. *Iran J Vet Res*, 15(4): 406 – 408.

Drbohlav J., Vodičková M., 2001. Tabulky látkového složení mléka a mléčných výrobků. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 83 s. ISBN 80-7271-005-2.

Dvořáková J., Kuprová V., Stádník L., Louda F., 2004. Vliv genotypu pro bílkoviny na mléčnou užitkovost [online]. [cit. 2017-03-18]. Dostupný z: http://www.agris.cz/Content/files/main_files/75/153041/49_06.pdf.

Farrell H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Swaisgood H. E., 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87: 1641 – 1674.

Felenczak A., Gil Z., Adamczyk K., Zapletal P., Frelich J., 2008. Polymorphism of milk κ -casein with regard to milk yield and reproductive traits of Simmental cows. *Journal of Agrobiology*, 25: 201 – 207.

Forman L., 1994. Mlékárenská technologie II. Praha: VŠCHT, 217 s.

Fournet B., Fiat A. M., Alais C., Jollés P., 1979. Cow κ -casein: Structure of the carbohydrate portion. *Biochim. Biophys. Acta*, 576: 339 – 346.

Fox P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T. M., Guinee T. P., 2004. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Applied Science, Amsterdam, 434 s.

Galila A., Samah F. D., 2008. A PCR-RFLP assay to detect genetic variants of kappa-casein gene in cattle and buffalo. *Arab J. Biotech.*, 11(1): 11 – 18.

Gorodetskii S. L., Kaledin A. S., 1987. Nucleotide sequence of the cDNA kappa casein in cows. *Genetika*, 23: 596 – 604.

Gustavsson F., Buitenhuis A. J., Johansson M., Bertelsen H. P., Glantz M., Poulsen N. A., Lindmark Mansson H., Stalhammar H., Larsen L. B., Bendixen C., Paulsson M., Andréén M., 2014. Effects of breed and casein genetic variants on protein profile in milk from Swedish Red, Danish Holstein, and Danish Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 97: 3866 – 3877.

Chrenek P., Huba J., Vasicek D., Peskovicová D., Bulla J., 2003. The Relation between Genetic Polymorphism Markers and Milk Yield in Brown Swiss Cattle Imported to Slovakia. *Asian - Aust. J. Anim. Sci.*, 16(10): 1397 – 1401.

Ježková A., 2016. Plemeno měsíce července – Jerseyký skot. *Náš chov*, 7: 9 – 12.

Ježková A., 2016. Plemeno měsíce: brown-swiss. *Náš chov*, 3: 8 – 11.

Jollés J., Schoentgen F., Alais C., Fiat A. M., Jollés P., 1972. Studies on the primary structure of cow κ -casein. Structural features of para- κ -casein: N-terminal sequence of κ -caseinoglycopeptide studied with a sequencer. *Helv. Chim. Acta*, 55: 2872 – 2883.

Jollés P., 1975. Structural aspects of the milk clotting proces. Comparative features with the blood clotting proces. *Mol Cell Biochem*, 7: 73 – 85.

Kim S., Ng-Kwai-Hang K. F., Hayes J. F., 1998. The Relationship between Milk Protein Phenotypes and Lactation Traits in Brown Swiss and Canadienne. *AJAS*, 11(3): 311 – 317.

Klub chovatelů Brown swiss, 2014. Šlechtitelský program brownswisského skotu [online]. [cit. 2017-03-10]. Dostupný z: <http://www.brownswiss.cz/clanky/plemennakniha/slechtitelsky-program-brownswisskeho-skotu/>.

Klub chovatelů Brown swiss, 2015. 1. národní šampionát Brown swiss skotu. [online]. [cit. 2017-03-10]. Dostupný z: <http://www.brownswiss.cz/fotoalbum/1.-narodni-sampionat-brownswiss-skotu/bozenaprohuvo.html>.

Krause L., Buchberger J., Weiß G., Klostermeyer H., 1988. Screening methods for genetic variants of milk proteins. In: Barth C. A., Schlimme E., Milk Proteins: Nutritional, Clinical, Functional and Technological Aspects. Darmstadt, Germany, s. 171 – 173.

Kučerová J., Matějčíková A., Jandurová O. M., Sorensen P., Němcová E., Štípková M., Kott T., Bouška J., Frelich., 2006. Milk protein genes *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LGB* and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. Czech J. Anim., 51: 241 – 247.

Kukovics S., Németh T., 2013. Milk Major and Minor Proteins, Polymorphisms and Non-protein Nitrogen. In: Haenlein G. F. W., Park Y. W. Milk and Dairy products in Human Nutrition: Production, Composition and Health. Chichester, West Sussex. Wiley-Blackwell, s. 80 – 110.

Law B. A., Tamime A. Y., 2010. Technology of Cheesemaking, 2nd edition. Wiley-Blackwell, Oxford, 512 s.

Legarová V., Kouřimská L., 2010. The effect of κ -casein genotype on the quality of milk and fresh cheese. Scienta Agriculturae Bohemica, 41: 213 – 217.

Manga I., Říha J., Vrtková I., 2008. Polymorphism of *CSN3*, *Pit-1*, *LGB* and its impact on milk performance traits at the Czech Fleckvieh and Holstein breed. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 56(1): 131 – 136.

Martin P., Szymanowska M., Zwierzchowski L., Leroux Ch., 2002. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. Reproduction Nutrition Development, 42: 433 – 459.

Mercier J. C., Brignon G., Ribadeu-Dumas B., 1973. Structure primare de la casein κ -bovine. Sequence complete. Eur. J. Biochem., 35: 222 – 235.

Navrátilová P., Králová M., Janštová B., Přidalová H., Cupáková Š., Vorlová L., 2012. Hygiena produkce mléka. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 129 s. ISBN 978-80-7305-625-4.

Özdemir M., Dođru Ü., 2005. Relationship Between Kappa-casein Polymorphism and Production Traits in Brown Swiss and Holstein. Journal of Applied Animal Research, 27(2): 101 – 104.

Pacheco Contreras V. I., Lourenco Jaramillo D. L., Parra Bracamonte G. M., Martinez Gonzales J. C., Sifuentes Rincon A. M., 2011. Convenient genotyping of nine bovine κ -casein variants. Electronic Journal of Biotechnology [online]. [cit. 2017-04-08]. Dostupný z: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v14n4-10/1333>.

PLEMDAT s.r.o., 2017. Databáze plemenic [online]. [cit. 2017-04-10]. Dostupný z: http://www.plemdat.cz/cz/sestava.php?root_id=33&in=1.

Prinzenberg E. M., Hiendleder S., Ikonen T., G. Erhardt G., 1996. Molecular genetic characterization of new bovine κ -casein alleles *CSN3-F* and *CSN3-G* and genotyping by PCR-RFLP. Anim. Gen., 27: 347 – 349.

Prinzenberg E. M., Jianlin H., Erhardt G., 2008. Genetic variation in the re-casein gene (*CSN3*) of chinese yak (*Bos grunniens*) and phylogenetic analysis of *CSN3* sequences in the genus *Bos*. J. Dairy Sci., 91: 1198 – 1203.

Rachagani S., Gupta I. D., 2008. Bovine kappa-casein gene polymorphism and its association with milk production traits. Genet. Mol. Biol., 31: 893 – 897.

Robinson R. K., Wilbey R. A., 1998. Cheesemaking Practice, 3rd edition. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 449 s.

Rosen J. M., Wyszomierski S. L., Hadsell D., 1999. Regulation of milk protein gene expression, Ann. Rev. Nutr., 19: 407 – 436.

SAS Institute Inc., 2016. SAS(r) 9.4 Statements: Reference, Fifth Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Shetty S., Patel R. K., Soni K. J., Singh K. M., Chauhan J. B., 2006. Allelic frequency of κ -casein and β -lactoglobulin in Jersey cattle. Iranian Journal of Veterinary Research, 15: 15 – 21.

Singh H., Flanagan J., 2006. Milk proteins. In: Hui Y. H., Handbook of Food Science, Technology and Engineering. New York, CRC Press, s. 26.1 – 26.20.

Sitkowska B., Neja W., Wisniewska E., 2008. Relations between kappa-casein polymorphism (*CSN3*) and milk performance traits in heifer cows. Journal of Central European Agriculture, 9: 641 – 644.

Swaisgood H. E., 1993. Genetic perspectives on milk proteins: comparative studies and nomenclature. Journal of Dairy Science, 76: 54 – 62.

Swaisgood H. E., 2003. Chemistry of the Caseins. In: McSweeney P. L. H., Advanced Dairy Chemistry – Proteins. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, s. 63 – 110.

Threadgill D. W., Womack J. E., 1990. Genomic analysis of the major bovine casein genes. Nucleic Acids Res., 18: 6935 – 6942.

Trakovická A., Moravčíková N., Navrátilová A., 2012. Kappa-casein gene polymorphism (*CSN3*) and its effect on milk production traits. Acta fytotechnica et zootechnica, 3: 61 – 64.

Urban T., 2008. Genetika populací a kvantitativních znaků. Virtuální svět genetiky 3 [online]. [cit. 2017-03-29]. Dostupný z: <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/pop/popul3b.html>.

Van Eenennaam A., Medrano J. F., 1991. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. Journal of Dairy Science, 74: 1730 – 1742.

Zajíček P., 2016. Za Jerseykami do Dánska - Landsskuet 2016. Inplem [online]. [cit. 2017-03-26]. Dostupný z: <http://www.inplem.cz/articles/za-jerseykami-do-danska-landsskuet-2016/>.

Zepeda-Batista J. L., Alarcón-Zúñiga B., Ruíz-Flores A., Núñez-Domínguez R., Ramírez-Valverde R., 2015. Polymorphism of three milk protein genes in Mexican Jersey cattle. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18: 1 – 4. ISSN 0717-3458.

8 SEZNAM ZKRATEK

AMK	aminokyselina
BSA	sérový albumin
CMP	kaseinový makropeptid
<i>CSNIS1</i>	gen pro α_{s1} -kasein
<i>CSNIS2</i>	gen pro α_{s2} -kasein
<i>CSN2</i>	gen pro β -kasein
<i>CSN3</i>	gen pro κ -kasein
H0	odhad rozdílu
IEF	izoelektrická fokusace
<i>LAA</i>	gen pro α -laktalbumin
<i>LGB</i>	gen pro β -laktoglobulin
LSM	nejmenší čtvercová střední hodnota
PCR	polymerázová řetězová reakce
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
SE	střední chyba průměru
SNP	jednonukleotidový polymorfismus

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Rozdělení mléčných bílkovin.....	11
Obrázek 2: Primární struktura referenční alely <i>A</i> u κ -kaseinu, <i>CSN3 A-IP</i>	13
Obrázek 3: Organizace genů mléčných bílkovin u skotu.....	15
Obrázek 4: Plemeno brown swiss.....	21
Obrázek 5: Plemeno jersey.....	21
Obrázek 6: Vizualizace izolace DNA z kravské krve.....	31
Obrázek 7: Amplifikované fragmenty genu <i>CSN3</i> o velikosti 379 bp.....	31
Obrázek 8: Vizualizace štěpení genu <i>CSN3</i> enzymem <i>HinfI</i>	32
Obrázek 9: Výsledek štěpení PCR produktu restriční endonukleázou <i>HinfI</i>	32

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení kravského mléka.	10
Tabulka 2: Variabilita genu <i>CSN3</i> u <i>Bos genus</i>	17
Tabulka 3: Frekvence alel genu <i>CSN3</i> u vybraných plemen.	19
Tabulka 4: Výsledky kontroly užítkovosti u plemene brown swiss.	20
Tabulka 5: Výsledky kontroly užítkovosti u plemene jersey.	21
Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR.	26
Tabulka 7: Nastavení podmínek cyklování pro PCR reakci.	26
Tabulka 8: Složení reakční směsi pro RFLP.	27
Tabulka 9: Výpočet frekvence genotypů.	28
Tabulka 10: Výpočet frekvence alel.	29
Tabulka 11: Frekvence genotypů genu <i>CSN3</i>	33
Tabulka 12: Frekvence alel genu <i>CSN3</i>	33
Tabulka 13: Frekvence plemene brown swiss a jersey.	33
Tabulka 14: Frekvence genotypů u jednotlivých plemen.	33
Tabulka 15: Frekvence alel u jednotlivých plemen.	34
Tabulka 16: Výpočet χ^2 testu pro plemeno brown swiss.	35
Tabulka 17: Výpočet χ^2 testu pro plemeno jersey.	35
Tabulka 18: Porovnání hodnot χ^2 testu s tabulkovými hodnotami u plemene brown swiss. ...	36
Tabulka 19: Porovnání hodnot χ^2 testu s tabulkovými hodnotami u plemene jersey.	36
Tabulka 20: Popisná analýza hodnocených parametrů užítkovosti.	37
Tabulka 21: Odhad LSM u parametrů mléčné užítkovosti.	37
Tabulka 22: Vliv genotypu genu <i>CSN3</i> na mléčnou užítkovost.	38
Tabulka 23: Vliv plemene na obsah tuku v mléce.	39
Tabulka 24: Vliv plemene na obsah bílkovin v mléce.	39
Tabulka 25: Vliv plemene na dojivost.	39