شناسایی آلل A2 ژن بتاکازئیندر گاو های شیری

علی جوادمنش[1*] و زهرا رشیدیان[2]

1. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
2. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

*ایمیل نویسنده مسئول: javadmanesh@um.ac.ir

چکیده

اخیرا تقاضای جهانی برای تولید شیر A2، ژنوتیپی از بتاکازئین، افزایش پیدا کرده و با توجه به برتری های تغذیه ای و قیمت بالاتر، روند انتخاب به نفع این آلل و ژنوتیپ هموزیگوت آن تغییر کرده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی روشی دقیق برای تشخیص ژنوتیپ های ژن بتا کازئین در گاو است. بدین منظور از تعداد 72 راس گاو براون سویس خونگیری بعمل آمد. پس از استخراج DNA و بررسی کیفیت، قطعه ای بطول 251 نوکلئوتید از ژن بتاکازئین در واکنش PCR تکثیر شد. محصول PCR توسط آنزیم برشی DdeI مورد هضم قرار گرفت و تعیین ژنوتیپ پس از الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. نتایج نشان داد که فراوانی آلل A2 52/1 درصد و نیز فراوانی ژنوتیپی A2A2، 29 درصد در جمعیت مورد مطالعه بود. روش مورد استفاده نشان داد که می توان با دقت و اطمینان بالا آلل A2 ژن بتاکازئین را شناسایی کرد.

کلمات کلیدی: PCR، بتاکازئین، پروتئین شیر، چند شکلی

مقدمه

پلی‌مورفیسم پروتئین‌های شیر به دلیل ارتباط با صفات تولید شیر، ترکیب شیر و حتی متابولیت‌های شیر استقبال زیادی را در صنایع لبنی به خود اختصاص داده است. اخیراً، انواع بتا کازئین A1 و A2 مورد توجه محققان و مصرف کنندگان شیر قرار گرفته و روند جدیدی را در بازار شیر و لبنیات ایجاد کرده که منجر به این شده است که دامپروران در بسیاری از کشورهای جهان شروع به تولید شیر A2 کنند (بنتیوگلیو و همکاران، 2020). کازئین‌ها 80 درصد پروتئین های شیر گاو را تشکیل می‌دهند و به چهار شکل αS1(CSN1-S1)، α-S2(CSN1-S2)، β-(CSN2) و κ-(CSN3) به ترتیب با نسبت‌های تقریبی 4:1:4:1 می‌باشند. ژن بتاکازئین دارای 13 گونه آللی است که فراوان‌ترین آن‌ها در شیر گاوها انواع A1 و A2 هستند (فارل و همکاران، 2004). تفاوت بین آلل‌های A1 و A2 به جهش در اسید آمینه موقعیت 67 (پرولین در A2 و هیستیدین در A1) مرتبط است (بونفتی و همکاران، 2010). β کازومورفین‌ها (BCMs) پپتیدهای شبه اپیوئید (طول زنجیره 4-11 اسید آمینه) هستند که از بتاکازئین شیر گاو یا انسان در طی فرآیندهای تکنولوژیکی و یا هضم آنزیمی در روده آزاد می شوند. برش آنزیمی در هیستیدین موقعیت 67 (تنوع آللی A1) منجر به برش 7 اسید آمینه شده که تولید پپتید زیست فعالی به نام β-کازومورفین-7 (βCM-7) می‌کند (جینسوا و یوشیواکا، 1999).

هومن و همکاران (2021) سطوح سرمی βCM-7 را در گوساله هایی که با شیر حاوی بتا کازئین A1 یا A2 تغذیه شده بودند، ارزیابی کردند و تأیید کردند که میزان βCM-7 در آن هاییکه با A1 تغذیه شده بودند 5 برابر بیشتر بود. بارنت و همکاران (2014) به این نتیجه رسیدند که مصرف فرآورده های شیری حاوی بتاکازئین A1 با فعال کردن مسیر Th2 باعث ایجاد پاسخ التهابی در روده موش‌ها و رت (موش صحرائی) می‌شود. علاوه بر این، مصرف شیر حاوی بتاکازئین A1 با افزایش التهاب در لوله‌ی گوارش و وخیم‌تر شدن علائم ناراحتی گوارشی همراه بود. تعدادی از مطالعات β-CM-7 گاوی را به عنوان یک علت احتمالی برای ایجاد بیماری‌های قلبی عروقی (مک لاچلان، 2001)، دیابت نوع 1 (تاکور و همکاران، 2020)، سندرم مرگ ناگهانی نوزاد و اختلالات عصبی مانند

اوتیسم و اسکیزوفرنی (جیانقین و همکاران، 2016) گزارش کرده‌اند. از سوی دیگر، اثرات فیزیولوژیکی مختلف این پپتیدها نیز مانند ترشح مخاط، افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، افزایش سطح پرولاکتین و نقش ضد درد به اثبات رسیده است.

طی چند سال اخیر آزمایش‌های ژنوتیپی ژن بتا کازئین CNS2 برای انتخاب گاو با ژنوتیپ A2A2 به دلیل تقاضای بیشتر برای شیر و محصولات لبنی منحصراً از نوع A2 به طور قابل‌توجهی افزایش یافته است. از روش‌هایی که امروزه مورد استقبال قرار گرفته است می‌توان به تکنیک‌های مختلف PCR برای تکثیر DNA مانند bidirectional allele-specific PCR، RFLP، (ACRS)-PCR، High Resolution Melt (HRM) و تجزیه و تحلیل چندشکلی ترکیبی تک رشته‌ای (SSCP) اشاره کرد (مایر و همکاران، 2021). در این تحقیق با استفاده از روش PCR-RFLP به بررسی فراوانی آلل های A1 و A2 ژن بتا کازئین گاوهای براون سویس پرداخته شد.

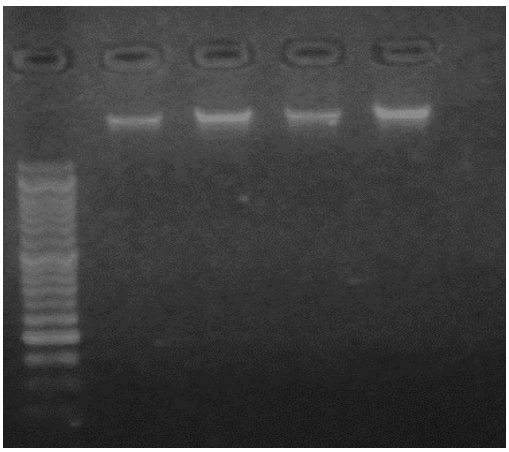
مواد و روش‌ها

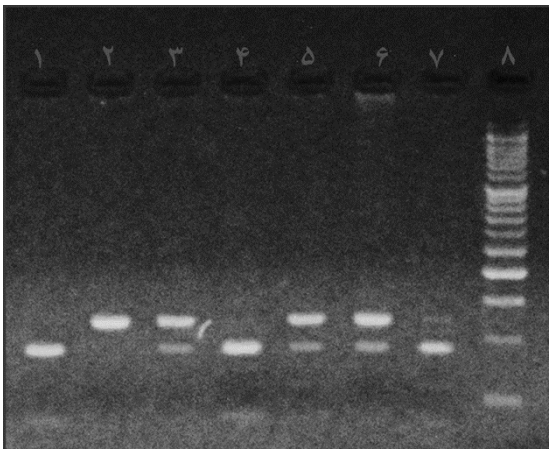
نمونه‌گیری از 72 راس گاو براون سویس با استفاده از لوله ونوجکت حاوی EDTA به عمل آمد و با حفظ زنجیر سرد به آزمایشگاه انتقال یافت. DNA خون‌ها با استفاده از کیت Animal Blood/Tissue کاوش ژن (مشهد، ایران) استخراج و در فریزر نگهداری شدند (شکل 1). جهت تکثیر قطعه مورد نظر از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مطابق جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR برای تکثیر قسمتی از ژن بتاکازئین

نام پرایمرها	توالی	طول قطعه (bp)
CSN2 -F	CCTTCTTTCCAGGATGAACTCCAG	251 bp
CSN2 -R	GAGTAAGAGGAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTCT	

برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل 40 چرخه تکثیر با دمای واسرشت اولیه ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه، سپس دمای واسرشت ۹۴°C به مدت ۲۵ ثانیه، دمای اتصال 60°C به مدت 40 ثانیه، دمای تکثیر ۷۲°C به ۲۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه بود. واکنش هضم آنزیمی به مدت ۲ ساعت, در دمای ۳۷ °C و توسط آنزیم *Dde*I انجام شد. پس از هضم آنزیمی محصولات PCR، الکتروفورز نمونه‌ها با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد انجام شد (شکل 1). سپس نتایج روش PCR-RFLP، مجدد توسط پرایمرهای اختصاصی جهش به روش ARMS نیز تایید شدند.





شکل 1 . سمت راست: الکتروفورز ژل آگارز 1 درصد DNA استخراج شده. سمت چپ: الکتروفورز ژل آگارز 2 درصد محصولات هضم آنزیمی.

نمونه‌های شماره ۱، ۴و ۷ دارای ژنوتیپ A2A2 نمونه‌ی ۲ فاقد ژنوتیپ A1A1، شماره‌های ۳، ۵ و ۶ هتروزایگوت (-A2) و شماره ۸ لدر 50bp می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که فراوانی آلل A2 در جمعیت مورد مطالعه 52/1 درصد و فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت A2A2، 29 درصد بودند. مطالعه دیگری نشان داد که فراوانی ژنوتیپ A2 در جمعیت گاوهای هلشتاین استرالیایی در سال 2017 به حدود 50 درصد رسیده است که روند افزایشی بیست درصدی را نسبت به سال 2010 نشان می دهد (Scott et al., 2023). روند افزایش مشابهی در گاوهای هلشتاین ایتالیایی بعد از سال 2000 گزارش شده است که نشانگر افزایش تمایل انتخاب در جهت افزایش فراوانی آلل A2 است (Sebastiani et al., 2020). این مقایسات نشان می دهد که ممکن است روند انتخاب خاصی جهت افزایش این آلل در گاوهای شیری ایران وجود نداشته باشد، هر چند که نتیجه گیری قطعی تر با تعداد نمونه بالاتر ممکن است.

در مطالعه‌ای که توسط مایر و همکاران (2021) انجام شد نشان داده شد که PCR اختصاصی ژن مورد نظر یک روش بسیار قابل اعتماد برای تشخیص انواع رایج بتا-کازئین (A1، A2، B، C) است؛ اما شرایط باید با دقت زیاد و بهینه سازی برای فرآیند PCR انجام شود. به‌عنوان مثال در صورت عدم تطابق بین الگو و پرایمر (در موقعیت انتهایی 3)، ممکن است نتایج مثبت کاذب رویت شود. در مقابل، روش ACRS یک فرآیند دو مرحله‌ای (PCR و آنزیم های محدود کننده) است که به سه آنزیم محدود کننده مختلف برای تمایز آلل‌های بتاکازئین (A1، A2، A3، B) نیاز دارد که امکان تشخیص واریانت را نیز فراهم می‌کند. در نهایت، روش PCR-RFLP (فقط با استفاده از یک آنزیم محدود کننده) امکان تمایز آسان و قابل اعتماد بین A2 (هموزیگوت/هتروزیگوت) و حیوانات غیر A2 را فراهم کرد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اهمیت روزافزون بهبود کیفیت غذا بخصوص شیر و لبنیات، توصیه می شود که به تولید شیر A2 که در دنیا کاملا شناخته شده است در کشور اهمیت بیشتری داده شود و روش ارایه شده در این تحقیق می تواند با دقت و سهولت بالا به شناسایی و انتخاب این ژنوتیپ کمک نماید.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد و شرکت کاوش ژن سرودشت انجام شد.

منابع

1. Barnett, M. P., McNabb, W. C., Roy, N. C., Woodford, K. B., and Clarke, A. J. (2014). Dietary A1 β-casein affects gastrointestinal transit time, dipeptidyl peptidase-4 activity, and inflammatory status relative to A2 β-casein in Wistar rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(6), 720-727.
2. Bentivoglio, D., Finco, A., Bucci, G., and Staffolani, G. (2020). Is there a promising market for the A2 milk? Analysis of Italian Consumer Preferences. *Sustainability*, 12(17), 6763.
3. Bonfatti, V., Di Martino, G., Cecchinato, A., Vicario, D., and Carnier, P. (2010). Effects of β-κ-casein (CSN2-CSN3) haplotypes and β-lactoglobulin (BLG) genotypes on milk production traits and detailed protein composition of individual milk of Simmental cows. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3797-3808.
4. Farrell Jr, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., ... & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641-1674.
5. Jianqin, S., Leiming, X., Lu, X., Yelland, G. W., Ni, J., and Clarke, A. J. (2015). Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on

gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. *Nutrition Journal*, 15(1), 1-16.
6. Jinsmaa, Y., and Yoshikawa, M. (1999). Enzymatic release of neocasomorphin and β-casomorphin from bovine β-casein. *Peptides*, 20(8), 957-962.
7. Mayer, H. K., Lenz, K., and Halbauer, E. M. (2021). "A2 milk" authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques. *Food Research International*, 147, 110523.
8. McLachlan, C. N. S. (2001). β-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses*, 56(2), 262-272.
9. Scott BA, Haile-Mariam M, MacLeod IM, Xiang R and Pryce JE (2023) Evaluating the potential impact of selection for the A2 milk allele on inbreeding and performance in Australian Holstein cattle. *Frontiers Animal Scienc*. 4:1142673.
10. Sebastiani, C., Arcangeli, C., Ciullo, M., Torricelli, M., Cinti, G., Fisichella, S., et al. (2020). Frequencies evaluation of b-casein gene polymorphisms in dairy cows reared in central Italy. *Animals*, 10 (2), 252. doi: 10.3390/ani10020252
11. Thakur, N., Chauhan, G., Mishra, B. P., Mendiratta, S. K., Pattanaik, A. K., Singh, T. U., ... and Garg, L. (2020). Comparative evaluation of feeding effects of A1 and A2 cow milk derived casein hydrolysates in diabetic model of rats. *Journal of Functional Foods*, 75, 104272.

Detecting A2 allele of beta-casein in dairy cows

Ali Javadmanesh[1*] and Zahra Rashidian[2]

1. Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. PhD Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
*Corresponding author e-mail: javadmanesh@um.ac.ir

Abstract
Recently, the global demand for the production of A2 milk, a genotype of beta-casein, has increased, and due to its nutritional advantages and higher price, the selection process has changed in favor of this allele and its homozygous genotype. The purpose of this study was to investigate a precise method for detecting beta-casein genotypes in cattle. For this purpose, blood sampling was done from 72 Brown Swiss cows. After DNA extraction and quality check, a 251 nucleotide fragment of beta-casein gene was amplified by PCR reaction. The PCR product was digested by *Dde*I restriction enzyme and genotype was determined after agarose gel electrophoresis. The results showed that the frequency of A2 allele was 52.1% and the frequency of A2A2 genotype was 29% in the studied population. The method used in this research showed that the A2 allele of the beta-casein gene can be identified with a high accuracy and confidence.

Keyword(s): PCR, Beta casein, Milk protein, Polymorphism