JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělská specializace (N4106)
Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů
Katedra: Katedra biologických disciplín
Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv polymorfismu kandidátního lokusu na technologické vlastnosti mléka

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.
Autor diplomové práce: Bc. Adéla Vaňková

České Budějovice, 2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: **2016/2017**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Adéla VAŇKOVÁ**
Osobní číslo:	**Z16336**
Studijní program:	**N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor:	**Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu:	**Vliv polymorfismu kandidátního lokusu na technologické vlastnosti mléka**
Zadávající katedra:	**Katedra speciální produkce rostlinné**

Zásady pro vypracování:

Kvalita mléka je významným faktorem ekonomiky celého odvětví jeho výroby, zpracování a marketingu. Úspěšný chovatel mléčného skotu musí nabízet produkt kvalitní nejen z hlediska obsahu bílkovin, tuku a mikrobiologických ukazatelů, významná je i technologická kvalita mléka. Využití molekulárně genetických metod se přitom stává běžnou součástí šlechtění hospodářských zvířat. Jedná se zejména o genotypizaci jednoduchých bodových polymorfismů na čipech, dále potom o genotypizaci kandidátních lokusů, genů velkého účinku.
Cílem diplomové práce je provést genotypizaci kandidátního lokusu s potenciálním vztahem k užitkovým vlastnostem dojeného skotu.
Zavedete metodiku pro laboratorní analýzu kandidátního lokusu. Provedete genotypizaci panelu krav. Výběr lokusu provede vedoucí práce v závislosti na aktuální potřebě tak, aby výsledky bylo možné použít pro zpracování komplexní analýzy. Provedete asociační analýzu vztahu genotypů resp. alel k vybraným ukazatelům kvality mléka. Datové soubory vyhodnotíte vhodnými statistickými metodami. Provedete interpretaci zjištěných výsledků.

Rozsah grafických prací: **10 - 15 stran**

Rozsah pracovní zprávy: **40 - 50 stran**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vlášková H., Trešlová H. (2008): Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Sborník textů. Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha.
Cecchinato A., Chessa S., Ribeca C., Cipolat-Gotet C., Bobbo T., Casellas J., Bittante G. (2015): Genetic variation and effects of candidate-gene polymorphisms on coagulation properties, curd firmness modeling and acidity in milk from Brown Swiss cows. Animal, 9, 1104-1112, DOI: 10.1017/S1751731115000440.
Lukac D., Jovanovac S., Nemes Z., Vidovic V., Popovic-Vranjes A., Raguz N., Lopicic-Vasic T. (2015): Association of polymorphism kappa-casein gene with longevity and lifetime production of Holstein-Friesian cows in Vojvodina. Mljekarstvo, 65, 232-237.
Szewczuk M. (2015): Polymorphism of the Insulin-like growth factor 1 receptor gene (IGF1R/e10/MspI and IGF1R/e16/RsaI) in four dairy breeds and its association with milk traits. Livestock Sci., 181, 43-50, DOI: 10.1016/j.livsci.2015.09.026.
Yudin N. S., Voevoda M. I. (2015): Molecular genetic markers of economically important traits in dairy cattle. Russian J. Genet., 51, 506-517, DOI: 10.1134/S1022795415050087.
Li X., Buitenhuis A. J., Lund M. S., Li C., Sun D., Zhang Q., Poulsen N. A., Su G. (2015): Joint genome-wide association study for milk fatty acid traits in Chinese and Danish Holstein populations. J. Dairy Sci., 98, 8152-8163, DOI: 10.3168/jds.2015-9383.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Jiřich Čítek, CSc.**
Katedra speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: **Ing. Irena Jelínková**
Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: **30. března 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2018**

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1668, 370 05 České Budějovice

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 30. března 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích…….. ……

Bc. Adéla Vaňková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala panu prof. Ing. Jindřichu Čítkovi, CSc. za odborné a cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat paní Ing. Ireně Hoštičkové, za odborné vedení při laboratorních analýzách. Poděkování v neposlední řadě patří i mé rodině za podporu po celou dobu inženýrského studia.

Práce byla finančně podpořena projektem QJ1510339 a GAJU028/2019/Z Genetika, zdraví zvířat a kvalita produktů jako základ konkurenceschopnosti.

Abstrakt:

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv polymorfních variant lokusu mléčného proteinu betakaseinu (*CSN2*) na znaky produkce a technologickou jakost mléka u plemen český strakatý skot a holštýnský skot.

DNA byla izolována z mléka. Pro zjištění genotypu byly použity metody PCR a RFLP. Stanovení genotypů *A1A1*, *A1A2* a *A2A2* bylo uskutečněno u 702 dojnic. Ve zkoumané populaci u všech vzorků byl genotyp *A1A1* zastoupen 11,40 %, *A1A2* 38,46 % a genotyp *A2A2* 50,14 %. Vybranými parametry mléčné užitkovosti byly: dojivost (kg), procento bílkovin a procento tuku. Pro statistické vyhodnocení byl použit program STATISTICA 12.

Ve výsledcích nebyl zjištěn statisticky průkazný vliv genotypu *CSN2* na zvolené znaky mléčné užitkovosti. Tento výsledek mohl být způsoben malým počtem jedinců zahrnutých do analýzy, výzkum bude dále v rámci grantu QJ1510339 a GAJU028/2019/Z pokračovat.

Klíčová slova: mléčná užitkovost, mléko, genetický polymorfismus, skot, betakasein, *CSN2*

Abstract:

The aim of this diploma thesis was to investigate the influence of milk betacasein locus (*CSN2*) polymorfic variants on production characteristics and milk technological qualities in Czech Simmental cattle and Holstein cattle.

DNA extracted from milk of 702 cows was genotyped using PCR and RFLP methods. The genotypes *A1A1, A1A2,* and *A2A2* had the following distribution within the population studied: *A1A1* in 11,40 %, *A1A2* in 8,46 %, and *A2A2* in 50,14 % cows. The studied milk parameters were the milk yield (kg), protein and fat percentage and protein and fat yield (kg). The statistical evaluation was made STATISTICA 12 program.

We found no statisticaly significant influence of *CSN2* genotype on the selected milk yields. The results might be biased by the relatively low amount of individuals studied. Research will continue within the QJ1510339 and GAJU028/2019/ Z grant.

Keywords: milk yields, milk, genetic polymorphism, cattle, betacasein, *CSN2*

OBSAH

1 Úvod ... 10
2 Cíl práce ... 11
3 Literární přehled ... 12
3.1 Struktura bovinního genu a genomu ... 12
3.1.1 Genetický polymorfismus ... 14
3.1.2 Mitochondriální DNA ... 15
3.1.3 Transkripce a translace ... 16
3.1.4 Regulace genové exprese ... 16
3.1.5 Genetické markery ... 17
3.1.6 Kandidátní lokusy ... 18
3.1.7 Lokusy kvantitativních znaků (QTL, Quantitative Trait Loci) ... 19
3.1.8 Genetické mapy a mapování ... 20
3.1.9. Význam a mapování QTL u hospodářských zvířat ... 21
3.2 Mléčná žláza ... 21
3.2.1 Mléko, jeho vlastnosti a složení ... 22
3.3 Bílkoviny ... 25
3.4 Mléčné bílkoviny ... 26
3.4.1 Celkový kasein ... 26
3.4.2 αs1 kasein (*CSN1S1*) ... 28
3.4.3 αs2 kasein (*CSN1S2*) ... 28
3.4.4 β-kasein (*CSN2*) ... 29
3.4.5 κ-kasein (*CSN3*) ... 31
3.4.6 Ostatní mléčné bílkoviny ... 32
3.5 Syrovátkové bílkoviny ... 32
3.6 Tuk a další látky v mléce ... 34
3.7 Použitá plemena ... 35
3.7.1 Český strakatý skot ... 35
3.7.2 Holštýnský skot ... 35
4 Materiál a laboratorní metody ... 37
4.1 Materiál ... 37
4.2 Laboratorní metody ... 37
4.2.1 Izolace DNA ... 37
4.2.2 Metoda PCR ... 37
4.2.3 Metoda RFLP ... 39

4.2.4 Gelová elektroforéza 41
4.3 Statistické vyhodnocení výsledků 41
5 Výsledky a diskuze 42
5.1 Genotypové a alelické frekvence 42
5.2 Testování Hardy-Weinbergovy rovnováhy - χ^2 test 43
5.3 Vliv genotypů β-kaseinu na produkci a složení mléka 45
6 Závěr 50
7 Seznam zkratek 51
8 Seznam použité literatury 52

1 ÚVOD

Kravské mléko má dlouhou tradici v lidské výživě. Význam mléka se odráží už v severské mytologii, kde se v Niflheimu podle legendy z tajícího ledu vyvinula prakráva jménem Audhumla. Ze struků se jí řinulo mléko, jako čtyři řeky a bylo důležité pro první existující stvoření obra Ymera. V současnosti je mléko nezbytnou součástí lidské výživy pro důležitý obsah živin. Zpracovává se na různé mléčné výrobky jako jsou smetana, máslo, jogurt, sýr, syrovátka a další. Je proto potřebné znát jeho složení a účinky na lidské zdraví.

Celkový výzkum *CSN2* probíhá v oblasti asociace tohoto genotypu s užitkovými vlastnostmi krav, jako je množství mléka a obsah jeho složek. Dále se výzkum soustředí na pozitivní vliv na lidské zdraví beta kaseinu alely *A2* a škodlivý vliv genotypu *A1A1,* který představuje rizikový faktor při některých onemocněních, jako je např.: kolísání hladiny cholesterolu, diabetes, skleróza, autismus, ischemická choroba srdce a chronický zápal artérií. Existují však i názory, které pozitivní vliv alely *A2* zpochybňují. Výsledky výzkumů z různých publikací jsou nejednotné, a proto je nutné další zkoumání v této oblasti.

Kdyby se potvrdily výsledky publikovaných studií posuzující pozitivní vliv alely *A2* na lidské zdraví, znamenalo by to pro chovatele určitou výhodu selektovat zvířata s genotypem *A2A2* a zaujmout tím řady konzumentů. Škodlivý genotyp *A1A1* by po potvrzení výsledků mohl být úplně vyselektován.

2 CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce:

- Provést genotypizaci kandidátního lokusu s možným vlivem na technologické vlastnosti a jakost mléka.
- Provést asociační analýzu vztahu genotypů k technologickým vlastnostem mléka.
- Vyhodnotit zjištěná data statistickými programy.
- Vhodně interpretovat dosažené výsledky.

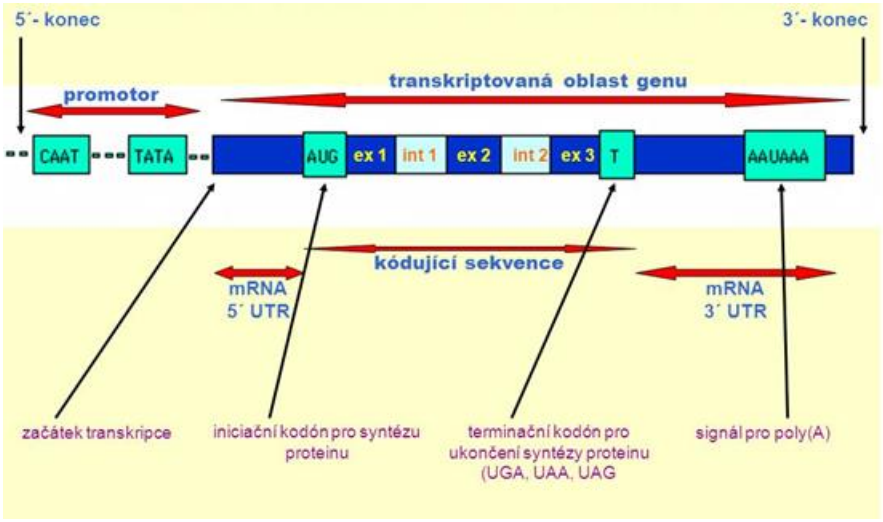
Diplomová práce byla zpracována s podporou projektů QJ1510339 a GAJU028/2019/Z.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Struktura bovinního genu a genomu

Specificky uložená jednotka dědičné informace se nazývá gen. Nese genetickou informaci z jedné generace do další. Gen má specifické pořadí nukleotidů. Kóduje primární strukturu buď funkční molekuly translačního produktu (polypeptid, protein) nebo funkční molekuly produktu transkripce (tRNA, rRNA). Do jeho struktury patří i regulační sekvence, jako je promotor nebo terminátor, které jsou rozeznány polymerázami a umožní tak správné zpracování dědičné informace nesené konkrétním genem (Šípek, 2010; Urban, 2012).

Rozeznáváme několik funkčních částí savčího genu (Obr. č. 1). První část, nazývaná promotor, je lokalizována na 5´-konci, kde se nachází tzv. TATA-box (Hognessův box), který slouží k iniciaci transkripce. Další část je iniciační oblast, kde se nachází kodon kódující metionin a označuje začátek translace. Na 3´-konci v posledním exonu se nachází stop kodon (Ferák a Sršeň, 1990; Snustad a kol., 2017). Geny, které jsou sekvenčně a funkčně podobné a mají společného předka, označujeme jako genovou rodinu. Savci mají mnoho genů v genových rodinách (Friedman a Hughes, 2001). Součástí genu jsou i nefunkční kopie genů tzv. pseudogeny (Hirotsune a kol., 2003).



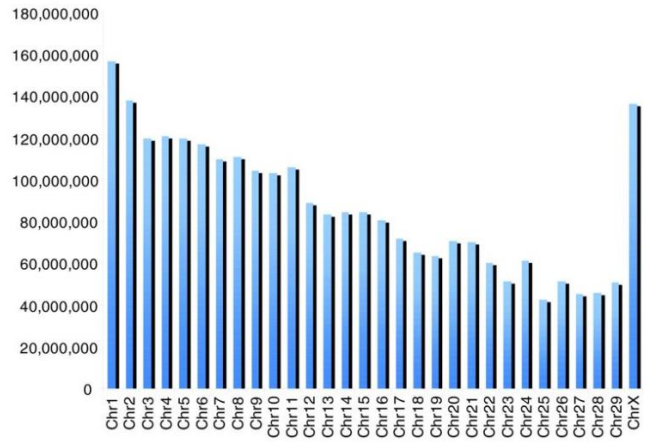
Obr. č. 1: Struktura genu (převzato z: https://slideplayer.cz/slide/2315983/)

Genom je definován jako celkový genetický materiál neboli kompletní sada DNA sekvence organizmu. U eukaryotních organismů je označen jako veškerá genetická informace, přítomna v jedné úplné haploidní sadě chromozomů (Urban, 2005).

Zimin a kol. (2009) uvádí, že genom skotu je mnohem podobnější lidskému než třeba myšímu. Genom skotu obsahuje 22000 genů kódujících proteiny. Skot ve srovnání s člověkem má zvýšenou expresi 71 genů. Jsou to geny, které se podílí na regulaci reprodukce, metabolismu tuků a laktace (Petr, 2010).

Za pomoci odborných technik bylo přečteno 35 milionů sekvencí, které vytváří 2,86 miliard párů bází. Sestava genomu skotu (Graf 1) obsahuje 2 857 605 192 párů bází umístěných na jednom z 30 chromosomů (29 autozomů a 1 pohlavní chromosom). (Zimin a kol., 2009).

Graf 1: Počet párů bází na 30 chromozomech (převzato z Zimin a kol., 2009)



Genom skotu byl popsán dvěma různými týmy. Tým na lékařské fakultě Baylor College sestavil z přečtených úseků genom označovaný jako *BCM4*. Tým z Univerzity v Marylandu sestavil ze stejných dat jako druhý tým genom s kódovým označením *UMD2*. Sestava genomu *UMD2* je o 6 % větší než *BCM4*. Jedním z nejvýraznějších rozdílů mezi sestavami *UMD2* a *BCM4* je sestavení na chromosomu X. *UMD2* má

sekvenci na X chromozomu 136 milionů párů bází, zatímco sestava *BCM4* má pouze 83 milionů párů bází (Zimin a kol., 2009).

Genom *BCM4* je poslední verze předešlých kompletací genomu skotu s označením *BCM1, BCM2* a *BCM3.1*. Nejnovější genom je oproti jeho předchůdcům přesnější v tzv. repetitivních sekvencích, kde se určité úseky mnohokrát opakují. Při kompletace genomu *BCM4* byly zahrnuty výsledky sekvence DNA býka a jeho dcery. Lze předpokládat sníženou přesnost čtení sekvencí chromosomu Y, který byl v daném souboru obsažen jen v jednom „výtisku" (u býka). Chromozom X se vyskytoval vícekrát, a to dva u dcery s konstelací pohlavních chromosomů XX a jeden u jejího otce s pohlavními chromosomy XY. Genom *BCM4* má u 90 % všech sekvencí zjištěno, na kterém chromosomu se nacházejí. Celkem je v genomu zkompletována DNA obsahující 2,54 miliardy bází s pokryvem 95 % všech genů. Zjistilo se přesně 17482 SNP s přesností 99, 2 % (Petr, 2010; Zimin a kol., 2009). Sestavení genomu *UMD2* na Univerzitě v Marylandu bylo prováděno s odlišnými postupy. Celkem je v genomu *UMD2* zkompletována DNA obsahující 2,86 miliard bází a z nich 91 % má určeno místo na chromosomu. V genomu *UMD2* byly navíc identifikovány i některé sekvence z chromosomu Y a chromozomu X. Genom *UMD2* je v porovnání s genomem *BCM4* více přesný. Genom *BCM4* pokryl v chromosomu X jen 83 milionů bází, zatímco v genomu *UMD2* byla na chromosomu X pokryta poloha 136 milionů bází. Celkový odhad je, že genom *BCM4* má třikrát více chyb než genom *UMD2* (Petr, 2010).

3.1.1 Genetický polymorfismus

Genetický polymorfismus je definován jako přítomnost dvou a více genetických variant, vedoucích k výskytu několika forem znaku v jedné populaci či druhu (Bull, 2013; Heck a kol., 2008). Genetický polymorfismus se vyskytuje jak v intronech, tak i v exonech genomu (Karki a kol., 2015). Na výsledné struktuře mléčného proteinu se podílí kromě účinků polymorfismu v kódující části genu také polymorfismus v nekódující oblasti tím, že ovlivňuje transkripci proteinu (Hallén a kol., 2008). Od mutace se polymorfismus odlišuje frekvencí v populaci, která je pro polymorfismus vyšší než 1 %. Polymorfismus může být spojován s nemocí, ale na

rozdíl od mutace není pro jedince smrtelný (Karki a kol., 2015). Bonfatti a kol. (2011) uvádí, že polymorfismus mléčných proteinů má vliv na složení mléčných bílkovin, koagulační vlastnosti mléka a na změny v relativní koncentraci frakcí mléčných proteinů.

3.1.2 Mitochondriální DNA

Mitochondriální genom je tvořen veškerou DNA nacházející se v mitochondriích. Mitochondriální DNA kóduje 37 genů z toho: 22 genů pro tRNA, 2 geny pro rRNA, 13 různých genů, které kódují proteiny zapojené do respirace a DNA replikace, transkripce a translace. Pouze malá oblast cirkulárního genomu je nekódující (Vaněk, 2015; Luo a kol., 2011).

Geny vymezené mitochondriální DNA kódují především enzymy Krebsova cyklu. Mitochondriální DNA, označována jako maternální typ dědičnosti, je děděná pouze od matky prostřednictvím cytoplasmy vajíčka. Jejich distribuce do gamet je náhodná. Mitochondriální dědičnost není řízena Mendelovými zákony (Frynta, 2004; Otová a Mihalová, 2012).

Velikost genomu je mezi druhy velmi variabilní a množství mitochondriální DNA (mtDNA) je závislé na tom, z jaké buňky je mtDNA izolována. Variabilní je i počet molekul mtDNA v mitochondriích, může se pohybovat v rozmezí od méně než 1 000 molekul (somatická buňka) až po 108 molekul mtDNA (oocyt obratlovců) (Snustad a kol., 2017).

Mitochondriální DNA je vhodnější pro druhovou identifikaci pomocí DNA barcodingu, než jaderná DNA, protože mitochondriální geny mají vyšší rychlost evoluce, jsou méně vystaveny rekombinaci, nachází se v buňkách v mnoha kopiích a neobsahují téměř žádné introny. Pro rutinní amplifikaci fragmentů pomocí PCR jsou tyto znaky mitochondriální DNA důležité (Luo a kol., 2011).

První sekvence lidské mtDNA byla provedena v roce 1981, nebyla však zcela přesná, protože vzorek byl kontaminován kravskou mtDNA (Andrews a kol., 1999).

3.1.3 Transkripce a translace

Transkripce je enzymatický proces, kde se přepisuje genetická informace z DNA do RNA a jako enzym se využívá DNA dependentní RNA-polymeráza**,** která hledá v DNA startovní sekvenci nukleotidů, tzv. promotor**.** Transkripční faktory jsou důležité ke správnému navázání polymerázy, vytváří spolu trojrozměrný komplex, který zajistí správné nasednutí polymerázy na sekvenci, od které má být zahájena transkripce (Urban, 2012; Šípek, 2010).

Translace je sekundární proces syntézy bílkovin. Přenáší genetický kód mRNA do pořadí aminokyselin v polypeptidovém vláknu. Ukončuje dráhu DNA-RNA-protein. Translace probíhá mimo jádro, v cytoplazmě na ribozomech. Genetická informace uložená v sekvenci nukleotidů mRNA se překládá podle pravidel genetického kódu do sekvence aminokyselin v polypeptidovém genovém produktu se zapojením mnoha makromolekul. Translaci můžeme rozdělit do čtyř fází: aktivace aminokyselin, iniciace translace, elongace polypeptidového řetězce a terminace translace. (Snustad a kol., 2017; Urban, 2012; Šípek, 2010). Iniciační fáze translace začíná tím, že se molekula mRNA váže na místo na ribozomu a na svou sekvenci obsahující iniciační kodon AUG se dále naváže tRNA nesoucí aminokyselinu metionin, který se stane N koncem rostoucího polypeptidu. U elongace se karboxylová skupina aminokyseliny na jedné tRNA v místě P ribozomu spojí s další aminokyselinou a vzniká peptidická vazba na druhé tRNA v místě A. Ribozom se tak posune o 3 nukleotidy směrem k 3´konci mRNA. Tento pohyb vystaví další kodon a dovolí přidání další aminokyseliny. U terminace dochází k naražení ribozomu na nesmyslný (stop) kodon a ukončuje se tak translace uvolněním mRNA a odpojením kompletního polypeptidu od poslední tRNA. (Urban, 2012).

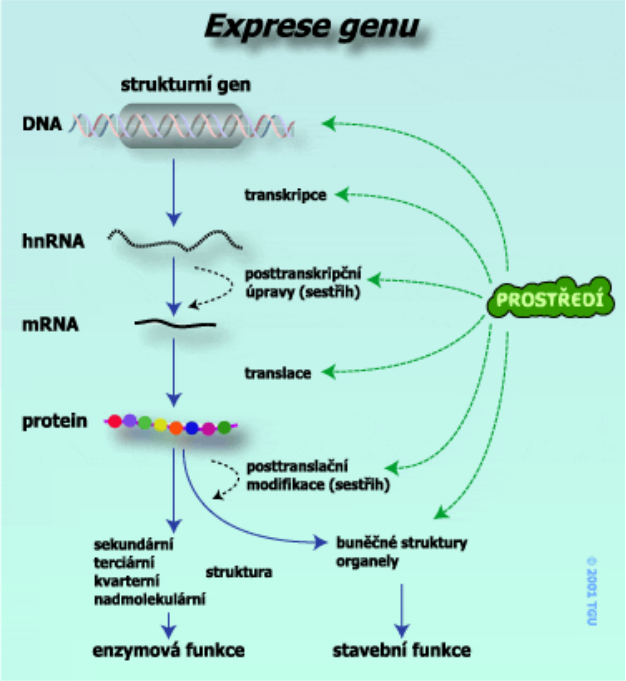
3.1.4 Regulace genové exprese

V buňce jsou slučovány stovky proteinů různých funkcí, které zabezpečí její život, růst a vývoj. Všechny proteosyntézy jsou řízeny geny. Regulace exprese genetické informace je systém správného zapínání a vypínání exprese různých genů ve vývojovém stupni buňky. Syntéza nukleových kyselin a proteinů se reguluje na

všech stupních exprese: transkripce, posttranskripční úpravy, translace a posttranslační úpravy (Urban a Vyhnánek, 2012).

Exprese genů se u strukturního genu vyjadřuje jako genetická informace v primární struktuře a funkci polypeptidu (proteinu). Dále exprese genu vyjadřuje u genu pro funkční RNA (tRNA a rRNA) jeho genetickou informaci v primární struktuře a funkci RNA neurčené k translaci (Urban a Vyhnánek, 2012).

Prostředí může ovlivnit expresi strukturních genů na všech stupních procesu přenosu genetické informace (Obr. 2). Genetická informace ve strukturních genech se tím však nemění. Vlivy prostředí mají vliv na zastavení, zpomalení nebo urychlení exprese genů (Urban a Vyhnánek, 2012).



Obr. 2: Schéma exprese genu (převzato z Urban a Vyhnánek, 2012)

3.1.5 Genetické markery

Genetický marker je gen, nebo úsek chromosomu, kde je známé jeho umístění na chromosomu a používá se jako orientační bod (Rosypal, 2001). Díky genetickému

markeru lze identifikovat pozici neznámého genu a mapovat kvantitativní znaková místa u hospodářských zvířat (Gomez-Raya a kol., 2002).

Molekulárně-genetické markery jsou početné a snadno identifikovatelné. Mají vysokou informativnost, jelikož mohou být zjištěny i z malého množství tkáně v jakémkoliv věku jedince (včetně embryí a mrtvého jedince). K analýze DNA se lze opakovaně vracet i po několika letech, jelikož může být DNA dlouhodobě archivována (Knoll a Vykoukalová, 2002).

DNA markery se rozdělují dle charakteru svého polymorfismu na: polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP – restriction fragment length polymorphism), polymorfismus v délce sekvence (SSLP – simple sequence length polymorphism). Tam se zahrnují mikrosatelity a minisatelity. Posledním typem genetického markeru je polymorfismus jednotlivých nukleotidů (SNP – single nukleotide polymophism). Jedná se o bodové mutace (Knoll a Vykoukalová, 2002).

Dále se genetické markery rozdělují dle využití při mapování genomu (Knoll a Vykoukalová, 2002):

První typem jsou kódující exprimované geny, které mohou být kandidátními geny pro QTL. Pro jejich nízkou hladinu polymorfismu jsou málo použitelné pro studie diverzity rodin a populací. Využívají se ale významně ve srovnávacím mapování.

Druhým typem je vysoce variabilní sekvence DNA. Využívají se především mikrosatelity a minisatelity. Mikrosatelity jsou díky vysokému stupni polymorfismu vysoce informativní v populačních studiích, při určování rodičovství a jsou nezbytným základem pro vazbové mapování genů.

Třetím typem jsou jednonukleotidové polymorfismy (SNP), které leží buď uvnitř kódujících genů, nebo častěji v nekódujících intronech nebo intergenových oblastech. Jsou využitelné pro populační a rodinné studie.

3.1.6 Kandidátní lokusy

Kandidátní geny jsou obecně geny se známou biologickou funkcí, přímo nebo nepřímo regulující vývojové procesy zkoumaných znaků. Hrály svou roli při výzkumu genových chorob a studii genetických asociací (Zhu a Zhao, 2007). Identifikace

polymorfních míst a následné vyhodnocení rozdílů alel kandidátních genů mezi zvířaty různých fenotypových hodnot poskytuje potencionální možnost identifikace markerového genu asociovaného s fenotypovou hodnotou (Urban, 2008). Analýza kandidátních genů je obvykle nepostradatelný proces pro následné poziční klonování QTL ovládajících hlavní genetickou variabilitu (Zhu a Zhao, 2007).

Urban (2008) uvádí jako příklad genetického markeru identifikovaného u skotu v 1. laktaci:

kandidátní geny

- růstový hormon a zvýšení produkce mléka: somatotropní osa v regulaci laktace
  - GHRH (somatocrinin, growth hormone releasing hormone; (chr. 13) a GHRHR (receptor; chr. 4) – regulují GH
  - GH (růstový hormon; chr. 19) a GHR (receptor; chr. 20)
- buněčně specifický transkripční faktor pro aktivaci prolaktinu (PRL) a GH genů v adenohypofýze
  - Pit-1 (Pituitary-Specific Transcription Factor) (chr. 1)
  - IGF-1 (Insuline growth factor 1; chr. 5) a IGF-1 receptor (chr. 21)

3.1.7 Lokusy kvantitativních znaků (QTL, Quantitative Trait Loci)

QTL jsou lokusy (neboli úseky DNA), které méně nebo více ovlivňují kvantitativní znaky (především užitkové). QTL, které ovlivňují ekonomicky významné znaky jsou označovány jako lokusy ekonomicky významných vlastností (ETL, Economic Trait Loci). Růstem znalostí o QTL se rozšiřují i úvahy o jejich využití v chovu a šlechtění hospodářských zvířat, jako možnosti vylepšení či nahrazení metod založených pouze na kvantitativní genetice (Urban, 2008).

Urban (2008) uvádí, že u hospodářských zvířat bylo zmapováno velké množství QTL, které se může tát silným nástrojem k tvorbě ideálního genotypu pro daná prostředí.

3.1.8 Genetické mapy a mapování

Genetickou mapou se rozumí znázornění distribuce určitého počtu genů v genomu. Mapování má různé metodické postupy a podle toho se dělí mapy na (Urban, 2008):

Cytogenetické (chromozomové) mapy – jsou založeny na fyzické podobě chromozomů (karyotyp). Při identifikaci je možné určitým způsobem upravené a obarvené chromozomy pruhovat a porovnávat se standardními ideogramy. Na cytogenetické mapě je poloha genu označená číslem chromozomu, písmenem označujícím raménko a čísly jednotlivých oblastí dle pruhů. U druhů s dobře definovaným karyotypem (např. prase), se k sestavování cytogenetických map používá hybridizace *in situ*. Umístění genu je prováděno pomocí hybridizace určitého značeného úseku DNA (sonda) s denaturovanou DNA chromozomu. Značení je prováděno radioaktivně nebo fluorescenčně. Metoda slučuje buňky dvou biologických druhů (např. skot a křeček), tím se vytvoří buněčná linie, u které dochází ke ztrátě chromozomů a v konečné fázi je linie upevněna s jedním nebo několika chromozomy vyšetřovaného druhu (skot) a kompletní chromozomovou sadou druhého druhu (křeček). Podobné metody jsou použity i při mapování QTL.

Vazbové (rekombinační) mapy – informují nás o vzdálenosti a pořadí genů na chromozomu. Vazba je detekovaná na základě počtu crossing-overů. Analýza vazby je hlavním předpokladem při mapování QTL.

Fyzické mapy – jsou založeny na přímé analýze DNA. Vzdálenost mezi lokusy se určují počtem párů bází.

Komparativní (srovnávací) mapy –jsou zde vyznačeny homologní úseky s geny u různých druhů. Lze takto nalézt kandidátní geny pro QTL.

3.1.9. Význam a mapování QTL u hospodářských zvířat

Plemenné hodnoty se v současné době odhadují prováděnou analýzou fenotypu nebo fenotypové užitkovosti zvířat. Fenotyp však nemůže být vždy rozpoznatelný z fyziologických důvodů (např. krávy rodí telata až po dvou letech života). Některé vlastnosti nelze zjistit u živých zvířat (např. ukazatele jatečního těla, kvalita masa), nebo je zaznamenávání fenotypu nepřesné (snadnost telení) (Urban, 2008).

Urban (2008) uvádí, že v posledních desetiletích se zkoumá, jestli je variabilita v DNA (polymorfizmus) určitých zvířat vázána k diferencím v produkčních nebo jiných ekonomických vlastností. V mapování genomu se zkoumají lokusy QTL, které by mohly být využity při šlechtění, vedoucímu ke zlepšení ekonomiky produkce. Jestliže je polymorfní lokus asociován s užitkovou vlastností, jedná se o důsledek vazby s QTL, a proto mapování QTL vyžaduje populaci zvířat, ve které je genetická proměnlivost ve zkoumaných vlastnostech a genotypování těchto populací zastoupená v určité hustotě. Výhodou QTL ve šlechtitelských programech je zvýšení přesnosti v selekci pomocí doplňkových informací přímo vztažených ke genotypu jedince.

3.2 Mléčná žláza

Mléčná žláza (*Mamma glandula lactifera*) je charakteristickým znakem třídy savců (*Mammalia*). Představuje největší žlázu s vnější sekrecí. Funkčně patří mezi sekundární pohlavní znaky a má vztah k pohlavnímu cyklu, kde dochází k významným strukturním změnám. Mléčná žláza je složená ze žláznaté (sekreční), pojivové a tukové tkáně, kde podíl sekreční tkáně v období laktace dosahuje až 80 % (Strapák, 2013).

Z anatomického hlediska vytváří mléčná žláza jednotný orgán nazývaný vemeno (Strapák, 2013). Vemeno se u skotu dělí na čtyři struky, které tvoří jeden celek, ale nejsou navzájem spojené. Pravá a levá strana vemene jsou oddělené podélnou brázdou. Malé alveoly, které tvoří aktivní část mléčné žlázy mají v průměru 0,1 – 0,3 mm a jsou vnitřně vystlané jednovrstvým epitelem z mlékotvorných sekrečních buněk. Zde probíhá selekce a přestavba živin krmiva přinášené krví na složky mléka. V sekrečních

buňkách epitelu vzniká mléčný tuk a téměř všechny bílkoviny a probíhá zde i přestavba minerálních látek. Potřebná energie pro syntézu složek mléka je získávána katabolickým biochemickým procesem (Urban, 1997; Pijanowski, 1977).

Produktem mléčné žlázy je v prvních pěti dnech po narození telete mlezivo, poté je produkováno mléko, obě varianty slouží pro výživu novorozených mláďat (Strapák, 2013).

Mlezivo je žlutě až hnědočerveně zbarvený sekret, hořkoslané chutě a lepkavé konzistence. Žluté zbarvení je způsobeno vyšším obsahem provitaminu A, hnědočervená barva signalizuje příměs krve, která však není pro tele škodlivá (Doležal, 2001). Mlezivo se liší od zralého mléka až pětkrát vyšším obsahem tuku, bílkovin a minerálních látek. Pro novorozené tele je mlezivo velmi důležité, jelikož je to jediný zdroj živin a potřebných imunoglobulinů (Strapák, 2013; Haug a kol., 2007).

3.2.1 Mléko, jeho vlastnosti a složení

Činností jednovrstvého epitelu žlaznaté tkáně v alveolách mléčné žlázy je tvořeno mléko. Vzniká ze specifických látek, které jsou krví transportovány z trávicí soustavy dojnice. Na vytvoření 1 litru mléka proteče vemenem až 500 litrů krve (Frelich, 2011). Bovinní mléko je tekutý sekret, který obsahuje živiny (Tab. 1) potřebné pro růst a vývoj tele a je zdrojem lipidů, proteinů, aminokyselin, vitamínů a minerálů. Obsahuje imunoglobuliny, hormony, růstové faktory, cytokiny, nukleotidy, peptidy, polyaminy, enzymy a další bioaktivní peptidy. Lipidy v mléce jsou emulgovány v globulích potažených membránami. Proteiny jsou v koloidních disperzích jako micely. Kaseinové micely se vyskytují jako koloidní komplexy proteinů a solí, především vápníku (Haug a kol., 2007; Javaid a kol., 2009).

Obsah kyseliny olejové, kyseliny linolové, mastných kyselin, vitaminů, minerálů a bioaktivních látek může podporovat pozitivní účinky na zdraví. Bylo prokázáno, že plnotučné mléko zvyšuje dobu vyprazdňování žaludku ve srovnání s polotučným mlékem, čímž zvyšuje dobu průchodu gastrointestinálním traktem. Nízké pH může ve fermentovaném mléce oddálit vyprazdňování žaludku (Haug a kol., 2007).

Tab. 1: Složení mléka, koncentrace v 1 litru plnotučného mléka a jejich účinky na zdraví (převzato z Haug a kol., 2007)

Složky mléka	Koncentrace v 1 l plnotučného mléka	Účinky na zdraví
Tuk	33 g/l	Bohatý na energii
Nasycené mastné kyseliny	19 g/l	Zvyšuje HDL, LDH a celkový cholesterol. Inhibice bakterií a virů.
Kyselina olejová	8 g/l	Prevence srdečních onemocnění, posílení membrán
Kyselina laurová	0,8 g/l	Antivirové a antibakteriální účinky
Kyselina myristová	3 g/l	Zvyšuje LDL a HDL
Kyselina palmitová	8 g/l	Zvyšuje LDL a HDL
Kyselina linolová	1,2 g/l	Omega-6 FA
α-linolenová	0,75 g/l	Omega-3 FA
Bílkoviny	32 g/l	Esenciální aminokyseliny, bioaktivní proteiny, zvýšená biologická dostupnost
Laktóza	53 g/l	Umožňuje vstřebání vápníku a fosforu
Vápník	1,1 g/l	Posiluje kosti, zuby, zlepšuje krevní tlak, reguluje metabolismus tuku
Hořčík	100 mg/l	Prevence srdečních onemocnění, léčba astmatu
Zinek	4 mg/l	Imunitní funkce, genová exprese
Selen	37 µg/l	Prevence rakoviny, alergiím, srdečních onemocnění
Vitamin E	0,6 mg/l	Antioxidant
Vitamin A	280 µg/l	Posiluje zrak, podporuje dělení buněk
Kyselina listová	50 µg/l	Podpora syntézy DNA, dělení buněk a metabolismus aminokyselin
Riboflavin	1,83 mg/l	Zabraňuje ariboflavinoze
Vitamin B12	4,4 µg/l	Klíčová role v metabolismu folátů

Produkce mléka je důležitá hospodářská vlastnost v chovu skotu. Přijaté živiny skotem z krmiva se vrací v mléce 20-30 % energetické hodnoty, což při srovnání u výkrmu skotu v mase se vrací jen 8-12 % energetických hodnot (Frelich, 2011). Produkce mléka má nízkou hodnotu koeficientu dědivosti a ovlivňují ji především vlivy z prostředí. Významný vliv na produkci mléka má plemenná příslušnost, věk při prvním otelení, věk dojnice, výživa, pořadí laktace, březost, období stání na sucho, zdravotní stav, welfare a technologie ustájení (Frelich, 2011).

Barva je díky obsahu tuku, kaseinu a částečně nerozpustného fosforečnanu vápenatého bílo krémová a neprůhledná. Karotenoidy a vitamín B2 způsobují lehký

nádech žlutého odstínu. Vůně není nijak výrazná, většinou souvisí se stupněm znečištění z prostředí. Nasládlou chuť způsobuje laktóza. Chuť mléka se váže na laktózu a tuk a mohou ji ovlivnit i některé látky z krmiva. Tekutá konzistence je dána vysokým obsahem vody v mléku a to 875 g. l^{-1} (Grieger a kol., 1990).

Měrná hmotnost závisí na obsahu látek v mléce. Zvýšený obsah tuku v mléku jeho hmotnost snižuje, naopak zvýšení hmotnosti má za následek obsah bílkovin, laktózy a minerálních látek. Hmotnost mléka se pohybuje v rozpětí 1,0290-1,0330 g. cm^{-3}. Bod mrznutí mléka je velmi konstantní, pohybuje se od -0,54 do -0,57 °C a souvisí se stálostí osmotického tlaku mléka. Prakticky se využívá na kryoskopické měření teploty mrznutí mléka při vyšetřování zvodnění mléka. Přidáním vody do mléka se bod mrznutí zvyšuje a zvyšováním kyselosti snižuje. Mléko má nižší povrchové napětí než voda v důsledku obsahu bílkovin. Při teplotě 20 °C je povrchové napětí mléka 45-48.10^{-3} N. m^{-1}. Zvyšováním teploty mléka klesá hodnota povrchového napětí. Čím větší obsah tuku se vyskytuje v mléku, tím je jeho povrchové napětí vyšší. Zvyšující se kyselost mléka má za následek zvyšování elektrické vodivosti. Pěnění mléka je větší než pěnění vody. Je to dáno obsahem bílkovin. Souvisí s nízkým povrchovým napětím. Pěna je špatným vodičem tepla a může ztížit správný průběh pasterizace. Silnou pěnu tvoří odstředěné mléko (Grieger a kol., 1990).

Kyselost mléka a mléčných výrobků je dána množstvím organických kyselin, bílkovin a minerálních látek. Dělí se na celkovou (titrační) a na aktivní kyselost. Titrační kyselost je udávána spotřebou roztoku hydroxidu sodného s koncentrací 0,25 mol. l^{-1} při titraci 100 cm^3 vyšetřovaného mléka podle Soxhlet-Henkelovo metody. Titrační kyselost čerstvého mléka je 6,2 – 8 mol. l^{-1}. Aktivní kyselost naopak udává koncentraci vodíkových iontů. Hodnota pH čerstvého mléka se pohybuje v rozpětí 6,4-6. Srážení mléka souvisí s přechodem ze stavu koloidního roztoku do stavu sraženiny. Srážení může probíhat pomocí kyseliny, kde vzniká sraženina vyloučením čistého kaseinu v důsledku odštěpení vápníku. Toho se využívá při výrobě tvarohových sýrů. Další způsob srážení je pomocí syřidla. Vzhled sraženiny je stejný jako při srážení mléka kyselinou, rozdíl je však v pH, kde se u syřidla se nemění. Charakter sýřeniny je ovlivněn výživou a plemenem dojnice. Když je krmná dávka nevyvážená, mléko má špatnou sýřitelnost (Grieger a kol., 1990).

3.3 Bílkoviny

Bílkoviny (proteiny) jsou polymery aminokyselin, vzniklé procesem proteosyntézy. V jedné molekule obsahují více než 100 aminokyselin vzájemně vázaných peptidovou vazbou do nerozvětvených řetězců (Velíšek a Hajšlová, 2009). Nacházejí se v každém živém organismu jako velké biomolekuly (McMurry, 2007). Jsou nezbytnou součástí potravy, jelikož jsou hlavním zdrojem dusíku a esenciálních aminokyselin (Drbohlav a Vodičková, 2001). Existuje mnoho různých typů bílkovin s odlišnou biologickou funkcí (McMurry, 2007).

Bílkoviny katalyzují chemické reakce v živých organismech, regulují průběh dějů v organismu, účastní se transportu látek (například kovových iontů, kyslíku a glukosy). Dále bílkoviny zprostředkovávají pohyb ve formě svalových vláken, snímají smyslové informace (rhodopsin v sítnici oka), jsou součástí imunitního systému ve formě imunoglobulinů anebo plní podpůrnou funkci přítomností v kolagenu (Klouda, 2005).

Bílkovina je polypeptidový řetězec vytvořený z aminokyselinových zbytků spojených dohromady v určité sekvenci (Snustad a kol., 2017).

Kelley a Sternberg (2009) uvádějí, že stanovení struktury proteinu je základním kamenem mnoha aspektů moderní biologie. Během posledních desetiletí bylo vyvinuto množství výpočetních nástrojů pro určení struktury.

Molekuly bílkovin jsou tak velké, že je zde nutnost chápat mnohem šíře, než je obvyklé u jednodušších organických sloučenin (McMurry, 2007).

Podle Kloudy (2005) existují čtyři úrovně struktury: primární, sekundární, terciální a kvartérní.

Primární struktura bílkovin se skládá z polypeptidového řetězce zabaleného více nebo méně rovnoměrně kolem vnějšího povrchu jediného hydrofobního jádra a označuje se zde pořadí aminokyselinových zbytků (McMurry, 2007). Klouda (2005) uvádí, že sekundární struktura je prostorové uspořádání v určitém místě hlavního polypeptidového řetězce bez ohledu na postranní řetězce. Terciární struktura bílkovin je popsána jako způsob, kde je celá molekula bílkoviny orientovaná do trojrozměrného

útvaru (McMurry, 2007). Prostorové uspořádání u kvartetní struktury je dáno dvěma nebo více polypeptidy spojenými do velkých agregátů (McMurry, 2007).

Bílkoviny se dělí podle složení dělí na jednoduché a na složené neboli konjugované (McMurry 2007). Nebílkovinný podíl se váže na polypeptidový řetězec. Dělí se na nukleoproteiny, lipoproteiny, glykoproteiny, fosfoproteiny, chromoproteiny a metaloproteiny (Velíšek a Hajšlová, 2009). Dále se rozdělují na strukturní, katalytické, transportní, pohybové, obranné, zásobní, senzorické, regulační a výživové. Mléčné bílkoviny patří mezi proteiny výživové. (Velíšek a Hajšlová, 2009; Koolman a Röhm, 2012).

3.4 Mléčné bílkoviny

Mléčné bílkoviny jsou syntetizovány v buňkách žláznatého epitelu z volných aminokyselin, které se nachází v krvi (Frelich, 2011). Dělí se do dvou velkých skupin. První skupina je označována jako celkový kasein, složený ze čtyř různých frakcí, které se od sebe liší primární strukturou. Druhou skupinou jsou syrovátkové bílkoviny, které jsou tvořeny několika frakcemi, kde důležitou frakcí je β–laktalbumin, α–laktalbumin, které se vyznačují vysokým obsahem lysinu (Drbohlav a Vodičková, 2001).

3.4.1 Celkový kasein

Kaseiny jsou rodinou fosforylovaných proteinů, které jsou v mléku v agregované formě známé jako kaseinové micely, představující velké koloidní částice suspendované v mléčném séru (Horne, 2002; Fox a Brodkorb, 2008). Kaseinové micely jsou sférické a na vnější vrstvě mají molekulární řetězce vyčnívající do mléčného séra. Tyto kaseinové micely také dopravují velkou část minerálů (vápníku a fosfátu), které jsou pro novorozence důležité pro růst kostí. Funkce kaseinových micel není jen nutriční, ale zabraňuje také patologické kalcifikaci mléčné žlázy (Horne, 2002).

Kaseinové micely se liší od polymerů jednotlivých kaseinů v tom, že obsahují anorganický fosforečnan vápenatý jako malé mikrokrystalické inkluze, nazývané nanoklustery. Začlenění fosfátových aniontů do směsi αs1 kaseinu a vápníku mění

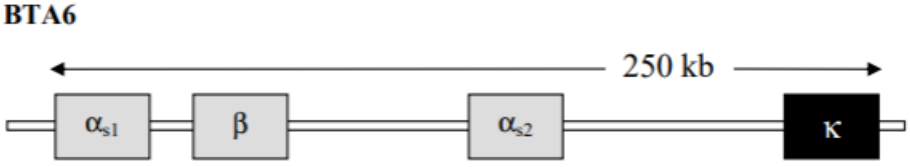
precipitační dráhu, přičemž fosfát přebírá aktivní úlohu a vytváří společně vysrážené druhy. Nanoklustery se vážou na shluky fosfoserinových zbytků kaseinů. Tato interakce je kontrolním faktorem při omezování patologických precipitací fosforečnanu vápenatého, které by se jinak vyskytovaly při těchto koncentracích v minerálech (Horne, 2002).

Kasein, jež je vázán na vápník, je produktem syntézy mléčné žlázy, je tvořen z glykoproteinových frakcí globulinů, částečně z doplňujících aminokyselin a kyseliny fosforečné (Grieger a kol., 1990). Celkový kasein se skládá ze čtyř různých frakcí, které se od sebe liší primární strukturou (Medrano a Cordová, 1990).

Kasein je složen z uhlíku, kyslíku, dusíku, vodíku, fosforu, síry a nachází se v něm 21 druhů aminokyselin, které jsou v potravě pro lidské tělo důležité (Santoso a Estiasih, 2014). Představuje 76-86 % z celkového obsahu bílkovin (Swaisgood, 2003).

Kasein je vysoce povrchově aktivní. Kaseinát sodný připravený sráţením kaseinových micel snížením pH mléka na 4,6 se v potravinářském průmyslu široce používá jako emulzní stabilizátor. Jednotlivé kaseiny vykazují silné tendence sdružovat se (Horne, 2002). Při nízkém pH se kasein sráží, protože má nízkou rozpustnost v kyselém prostředí. Není odolný při vysokých teplotách a denaturuje se při teplotě 100 °C (Santoso a Estiasih, 2014). Kasein se v praxi sráží syřidlem nebo kyselinou, čehož se využívá při výrobě sýrů. Při srážení kyselinou se kasein odštěpí z rozpustných vápenatých solí, vyvločkuje se a tím vytvoří sraženinu. Při použití syřidla se molekula kaseinu přemění v molekulu parakaseinu a syrovátkovou proteózu (Griger a kol., 1990; Santoso a Estiasih, 2014).

Celkový kasein se skládá z několika frakcí, αs1 – kasein, αs2– kasein, β – kasein, κ – kasein, nacházejících se velmi blízko sebe (Obr. 3) na BTA 6q31 (Anggraeni, 2012). Jsou přítomny v genomové skupině na 250 kb fragmentu (Rijnkels, 2002; Martin a kol., 2002).



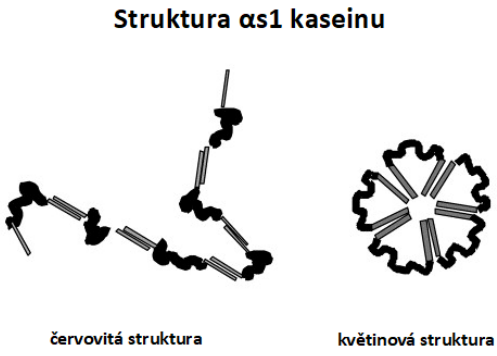
Obr. 3: uspořádání kaseinových genů na BTA6 (převzato z Martin a kol., 2002)

U specifické exprese, probíhající v době laktace v epiteliálních buňkách mléčné žlázy, je nutné aktivovat geny mléčných proteinů. Aktivace genů vyžaduje TATA a CAAT boxy signalizující začátek transkripce RNA polymerázy II, rozpoznávací místa pro tkáňové efektory a indukci a modulaci exprese. Aktivaci genů kontroluje komplex multihormonálního procesu, který zahrnuje prolaktin, glukokortikoidy, inzulín a růstový hormon. Interakce mezi epiteliálními buňkami mléčné žlázy a extracelulárním matrixem hraje důležitou roli v expresi genů mléčných proteinů (Martin a kol., 2002).

3.4.2 αs1 kasein (*CSN1S1*)

Gen αs1 kasein se vyskytuje v genetických variantách *A, B, C, D, E, F, G, H*. Obsah mléčných bílkovin je 290-460 g . l^{-1} (Koczan a kol., 1991; Grieger a kol., 1990). αs1 kasein představuje 36-40 % z celkového obsahu kaseinu v kravském mléce (Rodrigues a kol., 2015).

Struktura αS1-kaseinu (Obr. 4) je buďto červovitá, kde je polymer s řetězcem podobný červům, nebo květinová, která se vyskytuje pouze při vhodných podmínkách pH, iontové síly nebo v přítomnosti nízkých hladin iontového vápníku (Horne, 2002).



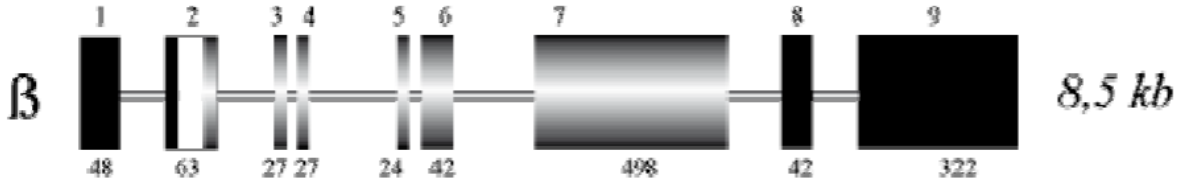
Obr. 4: Struktura αs1 kaseinu (Horne, 2002)

3.4.3 αs2 kasein (*CSN1S2*)

Gen αs2 kasein se vyskytuje v genetických variantách *A, C, D, F, H, K*. Obsah mléčných bílkovin je 80-110 g . l^{-1} (Stewart a kol., 1987; Griger a kol., 1990).

3.4.4 β-kasein (*CSN2*)

Gen bovinního beta kaseinu (*CSN2*) tvoří až 45 % mléčného kaseinu a skládá se z 209 aminokyselin (Miluchová a kol., 2014). Při uskladnění mléka v chladničce se uvolňuje až 50 % beta kaseinu z micel, při oteplení dochází k regeneraci a beta kasein se vrací zpět do micel. Obsah mléčných bílkovin je 250-350 g. l^{-1} (Grieger a kol., 1990). Exony mají rozměry od 24 do 498 bp (Obr. 5). Introny jsou však mnohem větší a tvoří 85 % genu (Keating a kol., 2006).



Obr. 5: Strukturní organizace Beta kaseinu (převzato z Martin a kol., 2002)

Pozn: Volné proužky představují introny, velké černé proužky představují exony (5´a 3´netranslatované regiony), bílé proužky označují část exonu kódující signální peptid a šedé proužky znázorňují exony a část exonů kódující protein.

Beta kasein má 12 genetických variant: *A1*, *A2*, *A3*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H1*, *H2*, *I*. Genetické varianty *A1*, *A2*, *A3* a *B* se vyskytují u všech plemen *Bos taurus* a u plemen dobytka *Bos indicus*. Varianta *A2* beta kaseinu je běžně detekována v mléce plemene Guernseyského a Jerseyského skotu (Darwish a kol., 2018).

Kamiński a kol. (2007), uvádí, že existuje 13. genetická varianta s označením *A4*, vyskytující se u korejského skotu, není však zatím více prozkoumána.

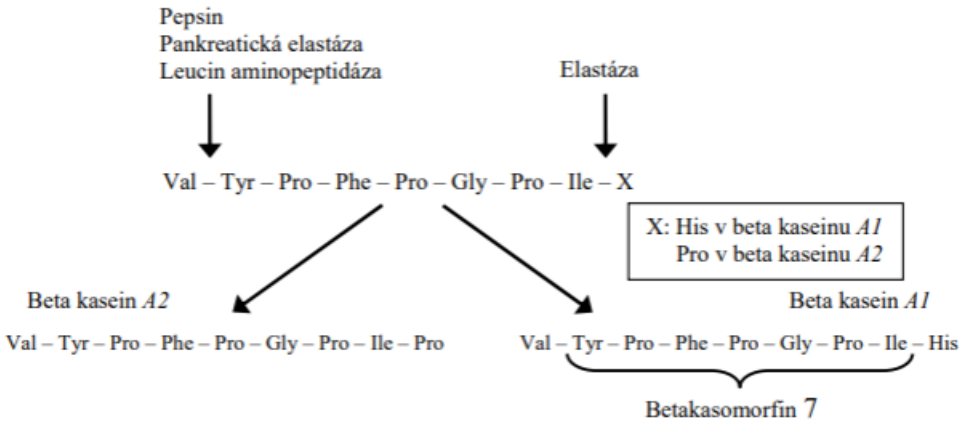
U většiny plemen chovaných v Evropě je největší výskyt alely *A1*. U plemene český strakatý skot a český holštýnský skot se vyskytuje alela *A1* a *A2* ve zhruba stejné frekvenci (Manga, 2007). Rozdíly v aminokyselinách jednotlivých variant jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2: Polymorfismus aminokyselin beta kaseinu (převzato z Kamiński a kol., 2007)

Varianta	Pozice aminokyseliny v proteinu													
	18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	117	122	137	138
A2	Ser-P	Arg	Ser-P	Glu	Glu	Pro	Glu	Leu	Gln	His	Gln	Ser	Leu	Pro
A1						His								
A3										Gln				
B						His						Arg		
C			Ser		Lys	His								
D	Lys													
E				Lys										
F						His								Leu
G						His						Leu		
H1		Cys						Ile						
H2							Glu		Leu					Glu
I									Leu					

Varianty beta kaseinu *A1, B, F* a *G* se liší od varianty *A2* v poloze 67, kde histidin nahrazuje prolin. Navíc se varianta *B* liší od varianty *A1* v substituci argininu za serin v pozici 122 (Darwish a kol., 2018).

Rozdíl mezi variantami *A1* a *A2* je v DNA, kde se na alele *A1* nachází triplet CAT, zatímco u alely *A2* se vyskytuje CCT triplet. Další rozdíl je u těchto variant na 67. poloze, kde *A1* obsahuje histidin a varianta *A2* prolin. Tato substituce zapříčiní rozdíly v produktech vznikajícím proteolytickým štěpením v trávicím traktu člověka (Obr. 6) Enzym elastáza, vyskytující se pouze u varianty *A1*, štěpí konec mezi 66. a 67. pozicí aminokyselin a hraje klíčovou roli při uvolňování tzv. β-kasomorfinu 7 (BCM-7), který představuje rizikový faktor při některých onemocněních např. kolísání hladiny cholesterolu, diabetes, skleróza, autismus, ischemická choroba srdce a chronický zápal artérií. Varianta *A2* naopak příznivě redukuje sérový cholesterol a napomáhá při normální funkci srdce a cév. Jelikož varianta *A1* obsahuje škodlivou látku, uvažuje se do budoucna o selekci této alely a možnostech perspektivnějšího šlechtění (Manga, 2007).



Obr. 6: Schéma štěpení A1 a A2 variant beta kaseinu (převzato z Kamiński a kol., 2007)

Existují publikace, které kritizují hypotézu vlivu alel *A1* a *A2* na lidské zdraví. Výzkum McLachlana (2001) byl zpochybněn jako nepřesný, jelikož v analýze nezahrnuje konzumaci sýra. Sýr je vyroben ze stejného mléka, takže varianty *A1* a *A2* se vyskytují v sýru ve stejném rozsahu jako v mléce nebo jogurtu. Zůstává však otázka, jestli je sýr zdroj BCM-7. Existuje několik studií (Muehlenkamp a Warthensen 1996; Jarmołowska a kol. 1999; Norris a kol. 2003), které potvrzují tuto hypotézu. BCM-7 zde byl ale přítomen jen v malém množství, což vyvolává další kritiku. Kritici naznačují, že nežádoucí vliv může pocházet jak z kravského mléka, tak z mléka mateřského (Kamiński a kol., 2007).

3.4.5 κ-kasein (*CSN3*)

κ-kasein je mléčný fosfoglykoprotein, který hraje důležitou roli při elektrostatické stabilizaci suspenzí kaseinových micel (Hidalgo a kol., 2010). Představuje až 12 % celkového kaseinu v mléce skotu. Obsah mléčných bílkovin je 80-150 g. l^{-1} (Grieger a kol., 1990; Hasinah a Handiwirawan, 2014). Tento protein je kódován lokusem znaků na chromozomu 6 a obsahuje sekvenci 162 aminokyselin. Dvě hlavní varianty κ-kaseinu *A* a *B* se liší v aminokyselinách v pozicích 136 (Thr pro Ile) a 148 (Asp pro Ala) (Botaro a kol., 2009). Molekuly κ-kaseinu na micelárním povrchu jsou rozloženy nerovnoměrně a mají mezi sebou mezery, které mohou dovolit průchod jiných molekul (Dalgleish, 1998). κ-kasein má hydrofobní N-koncový peptid, ale nemá ve své sekvenci shluk fosfoserinových zbytků, není tudíž schopen pokračovat v růstu polymeru a řetězec zde končí. Všechny růstové řetězce končí tímto způsobem,

takže kaseinová micelka se stabilizujícím povlakem κ-kaseinu stabilizuje, protože omezuje růst micel a tím umožňuje obsah k-kaseinu regulovat velikost micel (Horne, 2002). Vlastnosti k-CN, jako je jeho aminokyselinová kompozice a její vysoká teplota denaturalizace, činí tento protein vynikající živinou. Enzymatická destabilizace κ-kaseinu je základem výroby sýrů a jogurtu (Hidalgo a kol., 2010). κ-kasein jako jediný kasein obsahuje sacharid glykomakropeptid, který se při rozpuštění syřidlem odštěpí z polypeptidového řetězce (Grieger a kol., 1990).

3.4.6 Ostatní mléčné bílkoviny

Mezi ostatní mléčné bílkoviny se řadí například proteázové peptony a laktoferin. Proteázové peptony vznikají štěpením β-kaseinu (Borková a Snášelová, 2005). Jejich přítomnost negativně ovlivňuje pěnění mléka (Corradini a Innocente 1994). Vyšší koncentrace proteázových peptonů je u starších krav (Muir a kol., 1978). Laktoferin je kulatý glykoprotein řadící se do skupiny transferinů (Šrubářová a Dvořák, 2010). Molekulární hmotnost proteinu je 80 kDa (Marfiyanti a kol., 2013). Laktoferin je složen z jediného polypeptidového řetězce obsahujícího 703 aminokyselin (Adlerová a kol., 2008). Protein je schopen vázat a přenášet ionty železa (Rachman, 2010). Dělí se na tři formy. Laktoferin-α je forma vázající železo bez ribonukleázové aktivity. Další formy laktoferin-β a laktoferin-γ vykazují ribo-nukleázovou aktivitu, ale nejsou schopné vázat železo (Adlerová a kol., 2008). Protein hraje důležitou roli v obranném mechanismu mléčných žláz. (Šrubářová a Dvořák, 2010). Laktoferin je antimikrobiální, je schopen vázat ionty železa z mikrobů, což brání růstu těchto mikroorganismů (Anggraeni, 2012). Kromě mléka se protein vyskytuje např. ve slinách, slzách, žluči, moči, nosních a průduškových sekretech a pankreatické šťávě (Adlerová a kol., 2008).

3.5 Syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové bílkoviny jsou tvořeny několika frakcemi, kde důležitou frakcí je β-laktalbumin a α – laktalbumin, které se vyznačují vysokým obsahem lysinu.

(Drbohlav a Vodičková 2001). Z celkového obsahu bílkovin tvoří syrovátkové bílkoviny 12–18 % (Anggraeni, 2012).

Alfa laktalbumin s molární hmotností 17000 tvoří 25 % syrovátkových bílkovin a leží na chromozomu 5. Vytváří se stejně jako beta laktoglobulin v mléčné žláze. Obsahuje nejvyšší množství tryptofanu ze všech přírodních bílkovin. Má genetické varianty A a B (Martin a kol., 2002; Grieger a kol., 1990). Alfa laktalbumin je nezbytný pro biosyntézu laktózy v mléčné žláze. Zvyšuje afinitu substrátu b-1,4-galaktosyltansferázou, která katalyzuje tvorbu laktózy z glukózy a UDP galaktózy (Martin a kol., 2002).

Beta laktalbumin s molární hmotností 35000 má globulinový charakter. Tvoří asi 53 % syrovátkových bílkovin. Má 12 genetických variant, nejvíce se vyskytují genetické varianty A a B, nacházejících se na chromozomu 11. Liší se od sebe tepelnou odolností, vazbou jiných látek, nebo aminokyselinovou skladbou (Grieger a kol., 1990; Martin a kol., 2002). Vyznačuje se vysokým obsahem sirných aminokyselin, zvláště cystinu (Drbohlav a Vodičková, 2001). Vyskytuje se v mléce zejména přežvýkavců. Jeho přítomnost chybí v mléce lidí, hlodavců, králíků a velbloudů. Jeho úlohu zde nahrazuje jiný syrovátkový protein (Martin a kol., 2002).

Imunoglobuliny patří mezi vysokomolekulární glykoproteiny, které mají účinnost protilátek (Drbohlav a Vodičková, 2001). Vyskytuje se ve formě IgG, která je zastoupena 85-90 %. Další formy jsou IgA, která se vyskytuje 3,6 % a IgM, která je zastoupena v 7-10 % (Grieger a kol., 1990).

Serumalbumin je bohatým proteinem v krevní plazmě a slouží jako transportní protein pro řadu endogenních látek s vysokou afinitou k proteinu (Kragh-Hansen, 1981). Tvoří asi 6 % obsahu syrovátkových bílkovin a jeho molekulová hmotnost je 69000 (Grieger a kol., 1990).

Minoritní bílkoviny se vyskytují v syrovátkových bílkovinách v nepatrném množství. Jejich význam souvisí se stabilitou a senzorickými vlastnostmi mléka (Grieger a kol., 1990).

3.6 Tuk a další látky v mléce

Řadí se sem albumózy a peptony, které se tvoří rozkladem bílkovin, dále kyselina močová, močovina, kreatin, xantin a další. Syntézou mastných kyselin vzniká tuk. Hlavním zdrojem je kyselina octová, která vzniká spolu s kyselinou máselnou a propionovou enzymatickou činností mikroflóry bachoru z přijatých sacharidů z krmné dávky. Tuk v mléce je ve formě tukových kuliček velikosti 1-10 mikronů (Frelich, 2011; Pijanowski, 1977). Složení mléčného tuku ovlivňuje například krmení skotu, způsob ustájení, březost a průběh laktace (Gajdůšek a kol., 1996).

Ze sacharidů obsahuje mléko především laktózu, která je syntetizována z glukózy krve, která vzniká v játrech glukogenezí (Frelich, 2011). Průměrný obsah laktózy v mléce je 4,8 %. Hlavní význam laktózy z hlediska fyziologie výživy je v tom, že kyselina mléčná, která vzniká v intestinálním ústrojí mikrobiální činností, zvyšuje absorpci vápníku (Grieger a kol., 1990).

V mléce bylo doposud objeveno více než 30 enzymů. Kromě bakteriální lipázy a proteinázy jsou všechny enzymy v mléce citlivé na teplo. Inaktivace enzymů teplem se využívá k průkazu tepelného ošetření mléka a mléčných výrobků (Grieger a kol., 1990).

Vitamíny rozpustné v tucích jsou vitamín A (retinol), který se podílí na žlutém zbarvení mléčného tuku, Vitamín D (kalciferol), který se ničí při teplotě 150 °C, Vitamín E (tokoferol), působící antioxidačně a má příznivý vliv na trvanlivost mléka a vitamín K (fylochinon), který je odolný vůči vysokému zahřívání. Mléko obsahuje i další vitamíny, které jsou rozpustné ve vodě jako například vitamín B1, B2, B5, PP, B12, C a další (Grieger a kol., 1990).

Minerální látky jsou přiváděny z krve (Frelich, 2011). Vyskytují se v podobě rozpustné, kde jsou rozpuštěny v mléčném séru, nebo koloidně vázané součástmi některých organických látek v mléce, jako je fosfor v esterech kyseliny fosforečné a síra v aminokyselinách (Grieger a kol., 1990). V porovnání mléka a krevní plazmy vyplývá, že mléko obsahuje 10krát více draslíku a fosforu a 15krát více vápníku (Grieger a kol., 1990). Z celkového obsahu vápníku v mléce se 65 % vyskytuje v kaseinových micelách (Swaisgood, 2003).

3.7 Použitá plemena

3.7.1 Český strakatý skot

Český strakatý skot (Obr. 7) patří do skupiny simenských plemen, která jsou rozšířena na území České republiky a jsou i celosvětově rozšířena pro svoje vynikající vlastnosti a široké využití. Chovný cíl tohoto plemene je zaměřen na vysokou produkci kvalitního mléka a masa. Cílový požadavek je 6000 až 7500 kg mléka s obsahem bílkovin nad 3,5 % a obsahem tuku 4–4,1 %. U masné užitkovosti je v intenzivním výkrmu býků průměrný denní přírůstek nad 1300 g a jatečná výtěžnost nad 58 % (Svaz chovatelů českého strakatého skotu, 2008; Ježková, 2018) Plemeno vzniklo ve 30. letech. Po druhé světové válce se plemeno používalo jen na produkci masa a mléka, produkce tažné práce ztratila význam. Od roku 1971 se v České republice provádělo zušlechťovací křížení českého strakatého skotu s červenou varietou holštýnského skotu, které přineslo mírné zvýšení mléčné užitkovosti (Skládanka, 2014).

Obr. 7: Český strakatý skot (převzato z<http://www.cestr.cz/files/prerov_05/0000005.jpg>)

3.7.2 Holštýnský skot

Černostrakatý skot (Obr. 8) pochází ze severozápadní Evropy a postupně se rozšířil do celého světa. Plemeno se vyznačuje černostrakatým zbarvením a černou hlavou, která má bílou hvězdu nebo lysinu. Některá zvířata jsou nositeli alel pro červenostrakaté zbarvení. Plemeno se v Evropě vyšlechtilo na exteriérově vyvážený typ středního rámce s dobrým osvalením a velmi dobrou mléčnou produkcí. Černostrakatý skot dovezený z Evropy na území Severní Ameriky se vyvíjel odlišným

směrem (Kolektiv autorů Svazu chovatelů holštýnského skotu, 2015). Vedle vysoké užitkovosti má holštýnský skot vysokou přizpůsobivost klimatickým podmínkám (Urban, 1997).

Zvířata byla vyšlechtěna především na produkci mléka a později se pro ně vžilo pojmenování holštýnský skot. Plemeno je využíváno k zušlechťování řady plemen. První zmínky o chovu černostrakatého skotu na dnešním území České republiky se datují od roku 1830. V průběhu druhé světové války a těsně po jejím skončení bylo plemeno téměř zlikvidováno (Kolektiv autorů Svazu chovatelů holštýnského skotu, 2015). V 60. letech byly proto realizovány rozsáhlejší dovozy ze zahraničí do ČSR (Urban, 1997).

Obr. 8: Holštýnský skot (převzato z <http://www.holstein.cz/images/igallery/resized/2301-2400/tn_DSC_0004-2390-900-800-80.jpg>)

4 MATERIÁL A LABORATORNÍ METODY

4.1 Materiál

Výzkumná část této diplomové práce byla provedena v genetické laboratoři na Jihočeské univerzitě. K analýze bylo použito 702 vzorků mléka dojnic pocházejících z pěti farem v blízkosti Českých Budějovic. Na farmě Chyšná bylo odebráno 239 vzorků holštýnského skotu, 220 vzorků mléka českého strakatého skotu z farmy Sedlec, 128 vzorků mléka z plemene holštýnský skot i český strakatý skot z farmy Munice, 92 vzorků mléka českého strakatého skotu z farmy Týnice a 79 vzorků mléka českého strakatého skotu z farmy Pražák. Po odebrání byly všechny vzorky mléka zmrazeny v -20 °C a uskladněny až do izolace.

4.2 Laboratorní metody

4.2.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena na automatickém izolátoru pomocí komerčně prodávané soupravy kitu (od firmy MagCore®) určeného pro izolaci DNA z krve. Následně byla provedena spektrofotometrická kontrola množství a kvality získané DNA.

Výhodou automatického izolátoru je jeho efektivní izolace čisté DNA, založena na patentovaných paramagnetických částicích. Izolace je rychlá, pohodlná a ekonomická. Kapacita izolátoru je maximálně 16 vzorků. Kity jsou speciálně rozřazeny na konkrétní typ a množství vzorku. Izolační kity obsahují potřebné složky pro izolaci DNA a filtrační kolonku s vrstvou silikagelu, na kterou se naváže DNA a ostatní nežádoucí kontaminanty kolonkou protečou. Proces promývání kolonkou se několikrát opakuje a na závěr je použit pufr, který uvolní zachycené molekuly DNA z nosiče.

4.2.2 Metoda PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je velmi používaná metoda v molekulární biologii. Umožňuje *in vitro* amplifikaci požadovaného úseku

DNA v termocykleru. Metoda PCR probíhá ve třech krocích – denaturace, annealing a elongace. Přímo navazuje na izolaci DNA, kde je třeba cílovou DNA namnožit.

Prvním krokem byla příprava reakční směsi (Tab. 3) skládající se ze složek Mastermix Go Taq (složen z PCR pufru, MgCl2, dNTP´s), forward primer, reverse primer, DNA a H_2O. Bylo analyzováno vždy 10 vzorků s objemem pro 11 vzorků (kvůli možné nepřesnosti pipety).

Tab. 3: Složení reakční směsi

Reagencie	**Objem pro 1 vzorek (µl)**	**Objem pro 11 vzorků (µl)**
Mastermix Go Taq	12,5	137,5
Forward primer	0,5	5,5
Reverse primer	0,5	5,5
DNA	1,5	x
Taq DNA polymeráza 10 U	1,0	x
H_2O	10,0	110
Celkem	**26,0**	**258,5**

Připravená reakční směs byla pipetována do označených mikrozkumavek na chladící destičce a do každé z nich byl přidán příslušný vzorek DNA a Taq DNA polymeráza. Mikrozkumavky byly následně vloženy do termocykleru a spuštěn program PCR pro BCN.

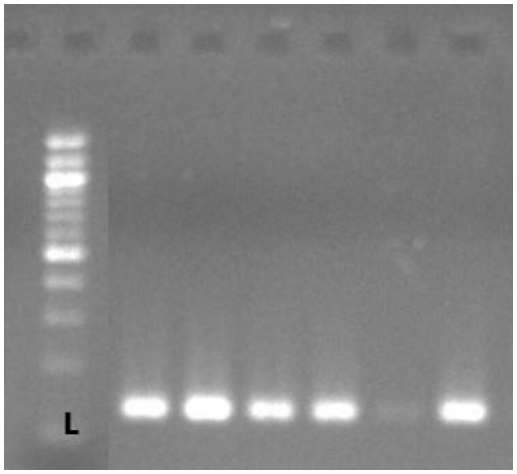
První fáze byla úvodní denaturace při 95 °C po dobu 5 minut, kde došlo k rozrušení a rozvolnění vodíkových můstků ve dvouřetězcové molekule DNA. V následující fázi bylo v celé PCR reakci opakováno 30 cyklů skládajících se z denaturace při 95 °C po dobu 40 sekund. Dalším krokem je annealing, kde dochází k nasednutí primerů na 3´konce vlákna za snížené teploty 58 °C po dobu 60 sekund. Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab 4: Sekvence primerů použitých pro PCR

Gen	Primer	Sekvence primerů (5´-3´)
CSN2	Foward-BCNA1	5´- CCTTCTTTCCAGGATGAACTCCAGG -3´
	Reverse-BCNA2	5´-GAGTAAGAGGAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTCT -3´

Následná elongace vytvoří nové vlákno pomocí termostabilní DNA polymerázy (*Taq* polymeráza), která připojí volné nukleotidy od 5´ k 3´ konci komplementárně k matričnímu řetězci. V této fázi byla teplota 72 °C na 90 sekund. Konečná elongace poté trvá při stejné teplotě 10 minut.

Vzniklý produkt je dlouhý 121 bp. Vizualizace přítomnosti PCR byla ověřena elektroforeticky na 2 % agarozovém gelu s ethidiumbromidem pomocí elektroforézy na 60 min při 90 V napětí. Výsledek je ukázán na obrázku 9.



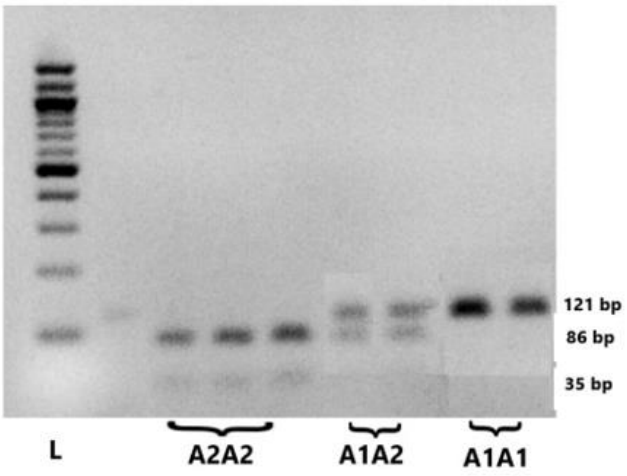
Obr. 9: Vizualizace přítomnosti PCR Pozn. L – ladder 50 bp, velikost od 1000 po 50 bp.

4.2.3 Metoda RFLP

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism) je metoda navazující na polymerázovou řetězovou reakci.

Principem je štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz za vzniku specificky dlouhých fragmentů, které jsou detekovatelné elektroforeticky na agarózovém gelu. Úsek DNA, který bude endonukleázou rozpoznán a štěpen, je dlouhý zpravidla jen několik párů bazí. Díky tomu může vytvořit smyčku, kterou enzym snáze najde a odstřihne. Pokud jedna alela určitého genu obsahuje rozpoznávací sekvenci, zatímco jiná nikoliv, bude DNA první alely rozštěpena, zatímco DNA druhé alely zůstane vcelku. Při elektroforéze fragmentů pak pro rozštěpenou sekvenci lze nalézt dva kratší úseky, kdežto nerozštěpená DNA vytvoří v gelu jen jeden proužek odpovídající delší sekvenci o původní délce.

V našem případě bylo k 15 µl PCR produktu přidáno 2 µl pufru, 10 U restrikční endonukleasy *HpyF3I* (*Dde*I) z 1 µl a 13 µl H_2O. S restrikční endonukleázou se manipulovalo pouze na chladícím stojánku. Takto připravený vzorek byl nechán přes noc v inkubátoru při 37 ˚C. PCR produkt, dlouhý 121 bp, byl štěpen na alely *A1* a *A2*. Štěpné místo je přítomno pouze v alele *A2*, která má po rozštěpení dva fragmenty o délce 86 bp a 35 bp, kdežto alela *A1* zůstane neštěpená v délce 121 bp. Následná vizualizace naštípaných fragmentů byla prováděna na 2 % agarozovém gelu s ethidiumbromidem pomocí elektroforézy na 60 min při 90 V napětí. Výsledek je ukázán na obrázku 10.



Obr. 10: Výsledek vizualizace RFLP na agarozovém gelu Pozn. L – ladder 50 bp, velikost od 1000 po 50 bp.

4.2.4 Gelová elektroforéza

Metoda využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli, přičemž rychlost pohybu částic v agarózovém či polyakrylamidovém gelu je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku. Menší molekuly se pohybují gelem rychleji než větší molekuly. Pro vizualizaci polohy molekul se vzorek obarví barvivem (ethydiumbromid, SYBR). V přístroji zvaném transiluminátor pod UV světlem lze pozorovat jasně viditelné proužky. Transiluminátor emituje světlo o vlnové délce 302 nm a porovnáváme proužky vzorků s markerem, u kterého známe přesnou velikost jednotlivých fragmentů a dáváme ho do první jamky na gelu.

Vizualizace štěpných produktů byla provedena na 2 % agarózovém gelu, který byl připraven z 100 ml TBE pufru + 2 g agarózy + 4 μl ethidium bromidu. TBE pufr se namíchal ze 180 g TRIS, 55 g kyseliny borité, 800 ml destilované vody a 40 ml EDTA. Odměřené složky byly smíchány a doplněny destilovanou vodou do objemu 1 l.

Elektroforéza byla prováděna v horizontální elektroforézní vaně při 90 V po dobu 60 min. Jako elektrolyt do elektroforetické vany byl vždy použit TBE pufr. Do každé jamky bylo napipetováno 10 μl vzorku. K odečtení výsledků byl použit DNA ladder 50 bp.

4.3 Statistické vyhodnocení výsledků

Ze získaných laboratorních výsledků genotypů byly vypočítány alelické a genotypové frekvence. Dále byly závěry výzkumu zpracovány do potřebných tabulek v programu Microsoft Office Excel 2010 a vyhodnocovány ve statistickém programu STATISTICA 12. Zkoumány byly vlivy různých genotypů β-kaseinu na vybrané parametry mléka za první laktaci. Byly analyzovány rozdíly mezi genotypy v produkci mléka v kg za laktaci, produkce tuku a bílkovin v % z celkového složení mléka a produkce tuku a bílkovin v kg za laktaci. K těmto analýzám byla použita statistika nezávislých proměnných a jednofaktorová analýza rozptylu tzv. ANOVA. Ke konečnému porovnání pomocí post-hoc testu byl použit Fisherův LSD test.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Genotypizace byla provedena u celkem 702 vzorků mléka. Genotypy β-kaseinu *A1A1*, *A1A2* a *A2A2* byly stanoveny metodou PCR-RFLP.

5.1 Genotypové a alelické frekvence

V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky frekvence genotypů *A1A1*, *A1A2* a *A2A2* a alel *A1* a *A2* u krav plemene český strakatý skot, kde bylo 388 vzorků DNA a plemene holštýnský skot, které zahrnují 314 vzorků DNA.

Ve zkoumané populaci u všech vzorků byl genotyp *A1A1* zastoupen u 11,40 % jedinců, *A1A2* 38,46 % a genotyp *A2A2* 50,14 %. Relativní frekvence u plemene český strakatý skot činily pro genotyp *A1A1* (0,1057), pro genotyp *A1A2* (0,3531) a pro *A2A2* (0,5413). U alely *A1* byla relativní frekvence (0,2822) a u alely *A2* (0,7178). U plemene holštýnský skot byly genotyp *A1A1* (0,1242), pro heterozygoty *A1A2* byla frekvence (0,4236) a pro *A2A2* (0,4522). U alely *A1* se vyskytovala relativní frekvence (0,3359) a u alely *A2* (0,6640.)

Tab. 5: Frekvence genotypů a alel u krav plemen český strakatý skot a holštýnský skot

		ČESTR		**H**	
		Relativní frekvence	**Počet jedinců**	**Relativní frekvence**	**Počet jedinců**
frekvence genotypů	***A1A1***	0,1057	41	0,1242	39
	A1A2	0,3531	137	0,4236	133
	A2A2	0,5413	210	0,4522	142
Celkem		**1**	**388**	**1**	**314**
frekvence alel	***A1***	0,2822	219	0,3359	211
	A2	0,7178	557	0,6640	417

Zjištěné výsledky frekvencí nejsou v rozporu se studiemi v jiných publikacích. Manga (2007) uvádí, že plemena český strakatý skot a holštýnský skot se vyznačují zhruba podobnou frekvencí alel *A1* a *A2* genu *CSN2*, případně dominancí alely *A2*.

Manga a Dvořák (2010) analyzovali frekvence genotypů u 120 vzorků DNA holštýnského skotu. Frekvence pro genotypy byly následující: *A1A1* (0.20), *A1A2* (0.51) a *A2A2* (0.29). Frekvence alel byla pro *A1* (0.45) *A2* (0.55).

Kučerová a kol. (2006) ve své publikaci uvádí, že u jimi 428 testovaných jedinců plemene český strakatý skot bylo zastoupení genotypu *A1A1* (2,8 %), A1A2 (29,7 %) a u genotypu A2A2 (64,7 %). Zbývajících 2,8 % připadá na ostatní pozorované genotypy. Nejfrekventovanější alelou byla A2 (80,9 %) dále alela A1 (17,7 %) a ostatní alely byly minimálně zastoupeny (0,14 %).

Gazdová a kol. (2007) analyzovali frekvence genotypů u 244 vzorků DNA holštýnského skotu a u 402 vzorků DNA českého strakatého skotu. Výsledky pro frekvence genotypů českého strakatého skotu byly následující: *A1A1* (0,10) *A1A2* (0,46) a *A2A2* (0,44). Frekvence alel byla pro *A1* 0,33 a pro *A2* 0,67. Výsledky pro frekvence genotypů holštýnského skotu byly *A1A1* (0,15) *A1A2* (0,52) a *A2A2* (0,33). Frekvence alel byla pro *A1* (0,41) a pro *A2* (0,59).

Kamiński a kol. (2006) analyzovali frekvence alel u 143 polských holštýnských býků, kteří mají uplatnění v inseminaci. Frekvence pro alelu *A1* byla 0,402 a 0,598 pro alelu *A2*.

5.2 Testování Hardy-Weinbergovy rovnováhy - χ^2 test

V rámci statistické analýzy bylo stanoveno, zda se vybrané populace neliší od Hardy-Weinbergovy rovnováhy

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

kde: O – pozorované počty
E – očekávané počty
df – stupně volnosti (df = p-n-1)
Stupně volnosti pro gen se třemi genotypy a dvěma alelami: df=1.

U testování Hardy-Weinbergovy rovnováhy byla stanovena nulová hypotéza H_0– mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi není rozdíl.

Tab. 6: Genotypový výpočet χ^2 testu pro plemeno český strakatý skot

	A1A1	*A1A2*	*A2A2*	**Celkem**
Pozorované počty	**41**	**137**	**210**	**388**
Očekávané frekvence	0,0796	0,4051	0,5152	1
Očekávané počty	30,9027	157,1946	199,9027	388
d = (O – E)	-10,0973	20,1946	-10,0973	
χ^2 test				**6,4036**

(Pozn.: d – diference, O – pozorované počty, E – očekávané počty)

Po srovnání výsledku (6,4036) a tabulkové hodnoty (6,64) na hladině významnosti $P \leq 0,01$ je populace krav českého strakatého skotu pro daný lokus v genetické rovnováze (Tab. 6).

Tab. 7: Genotypový výpočet χ^2 testu pro plemeno holštýnský skot

	A1A1	*A1A2*	*A2A2*	**Celkem**
Pozorované počty	**39**	**133**	**142**	**314**
Očekávané frekvence	0,1129	0,4462	0,4409	1
Očekávané počty	35,4467	140,1067	138,4467	314
d = (O – E)	-3,5533	7,1067	-3,5533	
χ^2 test				**0,8079**

Pozn.: d – diference, O – pozorované počty, E – očekávané počty)

Po srovnání výsledku (0,8079) a tabulkové hodnoty (6,64) na hladině významnosti $P \leq 0,01$ je populace krav holštýnského skotu pro daný lokus v genetické rovnováze (Tab. 7).

5.3 Vliv genotypů β-kaseinu na produkci a složení mléka

Při analýze vlivu *CSN2* na mléčnou užitkovost byly hodnoceny tyto ukazatele:

-mléko v kg za laktaci

-tuk v % z celkového složení mléka

-tuk v kg za laktaci

-bílkoviny v % z celkového složení mléka

-bílkoviny v kg za laktaci

Při statistickém vyhodnocení bylo použito 701 dojnic z farem Chyšná, Sedlec, Munice, Týnice a Pražák. Vzorky obsahují DNA dvou plemen: český strakatý skot a holštýnský skot. Jeden vzorek byl v následujících analýzách z původního počtu 702 vzorků vyřazen, pro neproběhnutou první laktaci.

V tabulce 8 je uveden průměr, rozptyl, směrodatná odchylka, minimum a maximum pro uvedené ukazatele (délka první laktace, mléko kg, tuk %, tuk kg, bílkovina %, bílkovina kg) u plemene český strakatý skot. V tabulce 9 se nachází obdobná data u holštýnského skotu.

Tab. 8: Popisná statistika pro český strakatý skot

Proměnná	Celkový součet	Průměr	Rozptyl	SE	Minimum	Maximum
Délka 1 lakt	111973	288,5902	999,2417	31,6108	48	305
Mléko kg	2568429	6619,6624	1925151,765	1387,4983	912	10172
Tuk %	1603,18	4,1319	0,1088	0,3298	2,5	5,28
Tuk kg	105902	272,9433	3337,0741	57,7674	30	426
Bílkovina %	1392,53	3,5890	0,0324	0,1801	3,01	4,14
Bílkovina kg	91978	237,0567	2384,9968	48,8364	30	347

Při porovnání s publikací Plemenná ročenka (2018) můžeme zjistit, že procento tuku u českého strakatého skotu je u našich výsledků v průměru o něco málo vyšší

(4,13 %) než v plemenné ročence (4,08 %). Průměr procenta bílkovin bylo v našich výsledcích (3,59 %) a v plemenné ročence v porovnání o něco vyšší (3,62 %).

Tab. 9: Popisná statistika pro holštýnský skot

Proměnná	Celkový součet	Průměr	Rozptyl	Stand. Odchylka	Minimum	Maximum
Délka 1 lakt	93920	300,0639	593,8426	24,3689	58	305
Mléko kg	3002509	9592,6805	3348378,537	1829,8575	566	13285
Tuk %	1281,39	4,0939	0,1116	0,3339	2,65	5,11
Tuk kg	122465	391,2619	5207,6758	72,1642	15	573
Bílkovina %	1032,38	3,2983	0,0305	0,1746	2,76	3,87
Bílkovina kg	98670	315,2396	3217,8819	56,7264	19	436

Při porovnání s publikací Plemenná ročenka (2018) můžeme zjistit, že procento tuku u holštýnského skotu je u našich výsledků v průměru vyšší (4,09 %) než v plemenné ročence (3,85 %). Průměr procenta bílkovin bylo v našich výsledcích (3,30 %) a v plemenné ročence v porovnání o něco vyšší (3,41 %).

V tabulce 10 a tabulce 11 jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky parametrů mléčné užitkovosti od obou plemen český strakatý skot a holštýnský skot pro genotypy *A1A1*, *A1A2* a *A2A2* genu *CSN2*. Mezi genotypy nebyl prokázán statisticky významný rozdíl.

Tab. 10: Mléčná užitkovost v závislosti na genotypu *CSN2* u plemene český strakatý skot

Genotypy[1]	**Všechny vzorky**		***A1A1***		***A1A2***		***A2A2***	
n	388		41		137		210	
	Průměr	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**
Mléko kg	6619,6624	1387,4983	6950,5854	1255,4671	6614,2847	1390,6983	6558,5619	1400,8385
Tuk %	4,1319	0,3298	4,1654	0,3133	4,1334	0,3358	4,1244	0,3286
Tuk kg	272,9433	57,7674	289,4878	55,1928	272,5985	57,5869	269,9381	57,8349
Bílk.%	3,5889	0,1801	3,6280	0,1685	3,5988	0,1814	3,575	0,1799
Bílk. kg	237,0567	48,8364	251,7560	44,8296	237,2919	47,9927	234,0333	49,6004

[1] rozdíly mezi genotypy nebyly statisticky významné

Tab. 11: Mléčná užitkovost v závislosti na genotypu *CSN2* u plemene holštýnský skot

Genotypy[1]	**Všechny vzorky**		***A1A1***		***A1A2***		***A2A2***	
n	313		39		133		141	
	Průměr	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**
Mléko kg	9592,6805	1829,8575	8590,5897	2311,2062	9577,3609	1690,5460	9884,3049	1701,9483
Tuk %	4,0938	0,3339	4,1387	0,4141	4,0959	0,3201	4,0796	0,32055
Tuk kg	391,2619	72,1642	356,4871	92,1595	390,8872	68,3427	401,2340	66,1157
Bílk.%	3,2983	0,1746	3,3113	0,1709	3,2960	0,1683	3,2969	0,1812
Bílk. kg	315,2396	56,7264	283,2564	73,3385	315,1129	54,7457	324,2057	49,6504
[1] rozdíly mezi genotypy nebyly statisticky významné								

Kučerová (2006) ve své publikaci uvádí, že genotyp *A1A1* u plemene český strakatý skot je spojen s nejvyšší reprodukcí mléka v kg. V porovnání s našimi výsledky toto tvrzení můžeme potvrdit pouze u českého strakatého skotu, kde průměr mléka v kg u genotypu *A1A1* byl 6950,59, u *A1A2* 6614,28 a u genotypu *A2A2* 6,558,56.

V následujících tabulkách 12 až 16 jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky parametrů mléčné užitkovosti pro genotypy *A1A1*, *A1A2* a *A2A2* genu *CSN2* z pěti farem, pro každou zvlášť: Chyšná, Munice, Pražák, Sedlec a Týnice. Mezi genotypy z žádné farmy nebyl prokázán efekt genotypu na produkci a složení mléka.

Tab. 12: Mléčná užitkovost v závislosti na genotypu *CSN2* z farmy Chyšná

Genotypy[1]	**Všechny vzorky**		***A1A1***		***A1A2***		***A2A2***	
n	205		15		90		100	
	Průměr	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**
Mléko kg	10246,6470	1542,0042	9859,8	1823,5632	10087,1333	1596,0507	10450,2727	1411,6475
Tuk %	4,1132	0,3524	4,238	0,4289	4,1084	0,3480	4,0988	0,3398
Tuk kg	418,9559	57,7364	412,6667	61,2282	412,2333	62,3310	426,0202	51,6919
Bílk.%	3,2890	0,1650	3,2867	0,2042	3,3097	0,1582	3,2706	0,1623
Bílk. kg	336,0147	46,7551	322,2	52,9354	333,1556	50,7326	340,7070	41,0100
[1] rozdíly mezi genotypy nebyly statisticky významné								

Z farmy Chyšná bylo analyzováno 205 vzorků plemene holštýnský skot, kde z genotypu *A1A1* bylo 15 jedinců, *A1A2* 90 jedinců a *A2A2* 100 jedinců.

Tab. 13: Mléčná užitkovost v závislosti na genotypu *CSN2* z farmy Munice

Genotypy[1]	**Všechny vzorky**		***A1A1***		***A1A2***		***A2A2***	
n	126		29		50		47	
	Průměr	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**
Mléko kg	8179,7857	1715,2666	7827,8965	2115,5337	8288,48	1433,0283	8281,2765	1685,8375
Tuk %	4,0738	0,2878	4,1207	0,3749	4,0698	0,2489	4,0491	0,2597
Tuk kg	332,8412	68,1309	325,3103	86,2115	337	60,1678	333,0638	62,8762
Bílk.%	3,3508	0,2084	3,3837	0,1939	3,3012	0,2064	3,3831	0,2087
Bílk. kg	272,5158	52,5449	264,2759	70,3782	272,2	42,1046	277,9361	48,8695
[1] rozdíly mezi genotypy nebyly statisticky významné								

Z farmy Munice bylo analyzováno 126 vzorků plemene český strakatý a holštýnský skot, kde z genotypu *A1A1* bylo 29 jedinců, *A1A2* 50 jedinců a *A2A2* 47 jedinců.

Tab. 14: Mléčná užitkovost v závislosti na genotypu *CSN2* z farmy Pražák

Genotypy[1]	**Všechny vzorky**		***A1A1***		***A1A2***		***A2A2***	
n	66		11		20		35	
	Průměr	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**
Mléko kg	6878,2121	1209,1211	7106,7272	692,8477	6816,4	1216,4510	6841,7142	1319,2783
Tuk %	4,3711	0,3621	4,3772	0,3330	4,429	0,3981	4,336	0,3445
Tuk kg	299,0303	51,3163	310,2727	33,4720	300,15	49,5219	294,8571	56,1641
Bílk.%	3,6455	0,1637	3,6736	0,1571	3,6685	0,1777	3,6234	0,1539
Bílk. kg	250,5455	42,7275	260,3636	20,5747	249,1	40,4040	248,2857	48,3750
[1] rozdíly mezi genotypy nebyly statisticky významné								

Z farmy Pražák bylo analyzováno 66 vzorků plemene český strakatý skot, kde z genotypu *A1A1* bylo 11 jedinců, *A1A2* 20 jedinců a *A2A2* 35 jedinců.

Tab. 15: Mléčná užitkovost v závislosti na genotypu *CSN2* z farmy Sedlec

Genotypy[1]	**Všechny vzorky**		***A1A1***		***A1A2***		***A2A2***	
n	218		20		89		109	
	Průměr	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**
Mléko kg	6641,2155	1510,1835	6677,05	1395,0150	6630,1461	1497,9642	6643,6789	1540,0383
Tuk %	4,0659	0,2898	4,0405	0,2348	4,069	0,2895	4,0677	0,2987
Tuk kg	269,7339	61,2786	269,9	57,3993	269,3146	61,7278	270,0459	61,5968
Bílk.%	3,6165	0,1540	3,6485	0,1278	3,6110	0,1587	3,6152	0,1537
Bílk. kg	239,5366	52,7649	243,5	51,9321	238,6853	51,8857	239,5046	53,5890
[1] rozdíly mezi genotypy nebyly statisticky významné								

Z farmy Sedlec bylo analyzováno 218 vzorků plemene český strakatý skot, kde z genotypu *A1A1* bylo 20 jedinců, *A1A2* 89 jedinců a *A2A2* 109 jedinců.

Tab. 16: Mléčná užitkovost v závislosti na genotypu *CSN2* z farmy Týnice

Genotypy[1]	**Všechny vzorky**		***A1A1***		***A1A2***		***A2A2***	
n	87		5		21		61	
	Průměr	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**	**Průměr**	**SE**
Mléko kg	6301,4022	1116,6302	6677,2	715,6855	6250,9047	1031,0058	6287,9836	1165,2269
Tuk %	4,1071	0,3312	4,032	0,3315	4,1452	0,3277	4,1001	0,3309
Tuk kg	257,7471	45,5790	267,4	17,5454	257,6667	40,6194	256,9836	48,5948
Bílk.%	3,4798	0,2057	3,416	0,1845	3,5109	0,2163	3,4743	0,2018
Bílk. kg	218,4942	37,9169	227,6	22,4286	219,0476	37,2436	217,5574	39,0378
[1] rozdíly mezi genotypy nebyly statisticky významné								

Z farmy Týnice bylo analyzováno 87 vzorků plemene český strakatý skot, kde z genotypu *A1A1* bylo 5 jedinců, *A1A2* 21 jedinců a *A2A2* 61 jedinců.

U výsledků můžeme porovnat některé aspekty měření mezi farmami. Nejvyšší průměr pro všechny vzorky v kategorii „mléko kg“ měla farma Chyšná. Nejnižší průměr farma Týnice. Nejvyšší průměr v procentu tuku měla farma Pražák, kdežto nejnižší průměr byl u farmy Sedlec. Nejvíce tuku v kilogramech měla v průměru farma Chyšná a naopak nejnižší průměr v této kategorii byla zaznamenána u farmy Týnice. V průměru nejvíce tuku v procentech byl u farmy Pražák a nejnižší u farmy Chyšná. Nejvyšší průměr u bílkoviny v kilogramech měla farma Chyšná, kdežto nejnižší farma Týnice. Toto porovnání je ovlivněno rozdílným počtem jedinců v každé farmě.

6 ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo analyzovat vybranou populaci dojnic holštýnského a českého strakatého skotu pro polymorfismy genu *CSN2* metodou PCR-RFLP. Byly posuzovány možné vlily genotypů *A1A1, A1A2* a *A2A2* genu *CSN2* na vybrané parametry mléčné produkce za první laktace. V literárním přehledu byl zpracován základní přehled o problematice. Při jeho zpracování byly nalezené rozporuplné informace o vlivu na mléčnou užitkovost či vlivu na zdraví.

Pro zjištění polymorfismu *CSN2* byly použity metody PCR a RFLP. Ke statistické analýze byl použit program Statistica 12.

Pro všechny analýzy byly posuzovány dojnice z farem Chyšná, Sedlec, Munice, Týnice a Pražák vždy nejprve dohromady a poté pro každé plemeno, holštýnský a český strakatý skot, odděleně. Po vyhodnocení asociace genotypů *A1A1*, *A1A2* a *A2A2* pro gen *CSN2* pro produkci a složení mléka nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými genotypy. Tyto výsledky mohly být způsobeny malým počtem zkoumaných jedinců a silné nerovnováze výskytu genotypů v populaci, výzkum bude dále v rámci grantů QJ1510339 a GAJU028/2019/Z pokračovat. Genotyp *A1A1* byl zastoupen jen 11,40 %, *A1A2* 38,46 % a genotyp *A2A2* 50,14 %. Relativní frekvence u plemene český strakatý skot činily pro genotyp *A1A1* 0,1057, pro genotyp *A1A2* 0,3531 a pro *A2A2* 0,5413. U alely *A1* byla relativní frekvence 0,2822 a u alely *A2* 0,7178. U plemene holštýnský skot byly genotyp *A1A1* 0,1242, pro heterozygoty *A1A2* byla frekvence 0,4236 a pro *A2A2* 0,4522. U alely *A1* se vyskytovala relativní frekvence 0,3359 a u alely *A2* 0,6640.

Porovnávací studie byly u výsledků frekvencí podobné, ale i přesto musíme brát zřetel na rozdílné četnosti zkoumaných dojnic, genetický vliv otce nebo jiné selekční metody.

7 SEZNAM ZKRATEK

A1, *A2*– alela *A1 / alela A2*

Ala – Alanin

Asp – kyselina asparagová

BCM7 – betacasomorphin 7

bp – páry bází (base pairs)

BTA6 – bovinní chromozom 6

CSN1S1 – αs1 kasein

CSN1S2 – αs2 kasein

CSN2 – beta kasein

CSN3 – κ-kasein

ČESTR – český strakatý skot

DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleid acid)

ETL – lokusy ekonomicky významných vlastností (economic trait loci)

H – holštýnský skot

Ile – Isoleucin

Kb – tisíce párů bází

mRNA – mediátorová RNA (messenger RNA)

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

QTL – lokusy kvantitativních znaků (quantitive traits locus)

RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)

RNA – ribonukleová kyselina (ribonucleid acid)

rRNA – ribozomální RNA (ribosomal RNA)

SE – směrodatná odchylka (standard error)

SNP – jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphysm)

Thr – Threonin

tRNA – transferová RNA (transfer RNA)

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADLEROVA, L., BARTOSKOVA, A., & FALDYNA, M. (2008). by Christian Santi/15 Mar/In Articles, Lactoferrin. *Veterinarni Medicina*, *53*(9), 457-468.

ANDREWS, R. M., KUBACKA, I., CHINNERY, P. F., LIGHTOWLERS, R. N., TURNBULL, D. M., & HOWELL, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature genetics*, *23*(2), 147.

ANGGRAENI, A. (2012). Perbaikan genetik sifat produksi susu dan kualitas susu sapi Friesian Holstein melalui seleksi. *Wartazoa*, 22: 1-11.

BONFATTI, V., CECCHINATO, A., GALLO, L., BLASCO, A., & CARNIER, P. (2011). Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental cattle. *Journal of dairy science*, *94*(10), 5183-5193.

BORKOVA, M., SNASELOVA, J. (2005). Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products–a review. *Czech J. Food Sci*, 23.2: 41-50.

BOTARO, B. G., LIMA, Y. V. R. D., CORTINHAS, C. S., RENNÓ, F. P., & SANTOS, M. V. D. (2009). Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *38*(12), 2447-2454.

BULL, L. (2013). Genetics, Mutations, and Polymorphisms. *Landes Bioscience.* dostupné na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6475/.

CORRADINI, C., & iNNOCENTE, N. (1994). Influence of proteoso peptone fraction on milk foaming capacity [Friuli-Venezia Giulia, Veneto]. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia (Italy)*.

DALGLEISH, D. G. (1998). Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *Journal of dairy science*, *81*(11), 3013-3018.

DARWISH, A. M., EL NADY, G. H., ALI, N. I., & ABDELSALAM, A. Z. (2018). Evaluation of β-casein variants in Egyptian goat, sheep and cattle by allele specific PCR and relevance to β-casomorphin. *Indian Journal of Animal Research*, *52*(6).

DOLEŽAL, O. (2001). Odchov telat ve 222 otázkách a odpovědích. *Praha: Agrospoj, Semafor*. ISBN 80-239-4228-X.

DRBOHLAV, J.; VODIČKOVÁ, M. (2001). Tabulky látkového složení mléka a mléčných výrobků, *ÚZPI Praha*. ISBN 80-7271-005-2

FERÁK, V., SRŠEŇ Š. (1990). Genetika človeka: celoštátna vysokoškolská učebnica pre skupinu študijných odborov biologickej vedy. *2., preprac. vyd. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo*. ISBN 80-08-00349-9.

FOX, P. F., & BRODKORB, A. (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, *18*(7), 677-684.

FRELICH, J. (2011). Chov hospodářských zvířat I. *České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.* ISBN 978-80-7394-298-4.

FRIEDMAN, R., & HUGHES, A. L. (2001). Gene duplication and the structure of eukaryotic genomes. *Genome research*, *11*(3), 373-381.

FRINTA, D. Triumf mitochondriální DNA. *Vesmír* [online]. 2004, **83**(5), 291-292 [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2004/cislo-5/triumf-mitochondrialni-dna.html

GAJDŮŠEK, S., ŠUSTOVÁ, K., HABÁŇ, R. (1996). Mikrobiologická kvalita syrového kravského mléka. In Nové poznatky v technologii výroby a zpracování mléka. *Č. Budějovice: SPP*, s 72–73. ISBN 80-85645-23-8.

GAZDOVÁ, V., HUMPOLÍČEK, P., DÉDUCHOVÁ, V., FILKUKOVÁ, J., & DVOŘÁK, J. (2014). Effect of C-CSN and B-CSN genotypes on milk production traits in Czech Flekvieh and Holstein breed. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, *55*(1), 55-58.

GOMEZ-RAYA, L., OLSEN, H. G., LINGAAS, F., KLUNGLAND, H., VÅGE, D. I., OLSAKER, I., ... & LIEN, S. (2002). The use of genetic markers to measure genomic response to selection in livestock. *Genetics*, *162*(3), 1381-1388.

GRIEGER, C., HOLEC, J., BURDOVÁ, O., KRČÁL, Z., LUKÁŠOVÁ, J., MATYÁŠ, Z., & PLEVA, J. (1990). *Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov*. Príroda.

HALLÉN, E., WEDHOLM, A., ANDRÉN, A., & LUNDÉN, A. (2008). Effect of β-casein, κ-casein and β-lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. *Journal of Animal Breeding and genetics*, *125*(2), 119-129.

HASINAH, H., & HANDIWIRAWAN, E. (2014). Pemanfaatan penciri gen K-kasein untuk seleksi pada sapi dan kerbau. *JITV*, *19*(2).

HAUG, A., HØSTMARK, A. T., & HARSTAD, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition–a review. *Lipids in health and disease*, *6*(1), 25.

HECK, J. M. L., OLIEMAN, C., SCHENNINK, A., VAN VALENBERG, H. J. F., VISKER, M. H. P. W., MEULDIJK, R. C. R., & VAN HOOIJDONK, A. C. M. (2008). Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*, *18*(5), 548-555.

HIDALGO, M. E., PIRES, M. S., & RISSO, P. H. (2010). A study on bovine kappa-casein aggregation after the enzymatic action of chymosin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *76*(2), 556-563.

HIROTSUNE, S., YOSHIDA, N., CHEN, A., GARRETT, L., SUGIYAMA, F., TAKAHASHI, S., ... & YOSHIKI, A. (2003). An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature*, *423*(6935), 91.

HORNE, D. S. (2002). Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *7*(5-6), 456-461.

JARMOŁOWSKA, B., KOSTYRA, E., KRAWCZUK, S., & KOSTYRA, H. (1999). β-Casomorphin-7 isolated from Brie cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(13), 1788-1792. In KAMIŃSKI, S., CIEŚLIŃSKA, A., & KOSTYRA, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of applied genetics*, *48*(3), 189-198.

JAVAID, S. B., GADAHI, J. A., KHASKELI, M., BHUTTO, M. B., KUMBHER, S., & PANHWAR, A. H. (2009). Physical and chemical quality of market milk sold at Tandojam, Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal*, *29*(1).

JEŽKOVÁ, A. Vznik a užitkovost českého strakatého skotu. *Náš chov* [online]. 2018 [cit. 2018-12-10]. Dostupné z: https://naschov.cz/vznik-a-uzitkovost-ceskeho-strakateho-skotu/

KAMIŃSKI, S., CIEŚLIŃSKA, A., & KOSTYRA, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of applied genetics*, *48*(3), 189-198.

KARKI, R., PANDYA, D., ELSTON, R. C., & FERLINI, C. (2015). Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC medical genomics*, *8*(1), 37.

KEATING, A. F., SMITH, T. J., ROSS, R. P., & CAIRNS, M. T. (2006). A single nucleotide polymorphism in the bovine β-casein promoter region across different bovine breeds. *Journal of dairy research*, *73*(2), 193-196.

KELLEY, L. A., & STERNBERG, M. J. (2009). Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature protocols*, *4*(3), 363.

KLOUDA, P. (2005). Základy biochemie. 2., přeprac. *vyd. Ostrava: Pavel Klouda*. ISBN 80-86369-11-0.

KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z. (2002): Molekulární genetika zvířat: (metody detekce polymorfizmů DNA genů). vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7616-6

KOCZAN, D., HOBOM, G., & SEYFERT, H. M. (1991). Genomic organisation of the bovine alpha-S1 casein gene. *Nucleic acids research*, *19*(20), 5591-5596.

KOLEKTIV AUTORŮ SVAZU CHOVATELŮ HOLŠTÝNSKÉHO SKOTU. Holštýnské plemeno. *Náš chov* [online]. 2015, (12), 10-14 [cit. 2018-12-10]. Dostupné z: https://energie21.cz/wp-content/uploads/pdf/nas_chov/CH1215.pdf

KOOLMAN, J. A RÖHM, K. H. (2012). Barevný atlas biochemie. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2977-0.

KRAGH-HANSEN, U. (1981). Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacological Reviews*, *33*(1), 17-53.

KUCEROVA, J., MATEJICEK, A., JANDUROVÁ, O. M., SORENSEN, P., NEMCOVA, E., STIPKOVA, M., ... & FRELICH, J. (2006). Milk protein genes

CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science*, *51*(6), 241.

LUO, A., ZHANG, A., HO, S. Y., XU, W., ZHANG, Y., SHI, W., ... & ZHU, C. (2011). Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. *Bmc Genomics*, *12*(1), 84.

MANGA, I., DVOŘÁK, J. (2010). TaqMan allelic discrimination assay for A1 and A2 alleles of the bovine CSN2 gene. *Czech Journal of Animal Science*, *55*(8), 307-312.

MANGA, I. Polymorfizmus β-kazeínu u skotu – selekcie na A2 alelu. Náš chov. 2007. roč. 68, č. 4, s. 50-51. ISSN 0027-8068

MARFIYANTI, F. V. K., SAYUTHI, S. M., AL-BAARRI, A. N. M., & LEGOWO, A. M. (2013). Karakteristik dangke dari susu dengan waktu inkubasi berbeda pasca perendaman dalam larutan laktoferin. *Jurnal aplikasi teknologi pangan*, *2*(3).

MARTIN, P., SZYMANOWSKA, M., ZWIERZCHOWSKI, L., & LEROUX, C. (2002). The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reproduction nutrition development*, *42*(5), 433-459.

MCLACHLAN, C. N. S. (2001). β-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses*, *56*(2), 262-272. In KAMIŃSKI, S., CIEŚLIŃSKA, A., & KOSTYRA, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of applied genetics*, *48*(3), 189-198.

MCMURRY, J. (2007). Organická chemie. V Brně: VUTIUM. ISBN 978-80-214-3291-8.

MEDRANO, J. F., & CORDOVA, E. A. (1990). Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Nature Biotechnology*, *8*(2), 144-146.

MILUCHOVÁ, M., GÁBOR, M., & TRAKOVICKÁ, A. (2014). Analysis of beta-casein gene (CSN2) polymorphism in different breeds of cattle. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, *47*(2), 56-59.

MUEHLENKAMP, M. R., & WARTHESEN, J. J. (1996). β-Casomorphins: Analysis in cheese and susceptibility to proteolytic enzymes from Lactococcus lactis ssp. cremoris. *Journal of dairy science*, *79*(1), 20-26. In KAMIŃSKI, S., CIEŚLIŃSKA, A., & KOSTYRA, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of applied genetics*, *48*(3), 189-198.

MUIR, D. D., KELLY, M. E., PHILLIPS, J. D., & WILSON, A. G. (1978). The quality of blended raw milk in creameries in south-west Scotland. *International Journal of Dairy Technology*, *31*(3), 137-144.

NORRIS, C. S., COKER, C. J., BOLAND, M. J., & HILL, J. P. (2003). Analysis of cheeses for [beta]-casomorphin-7, its precursors and its analogues. *Australian Journal of Dairy Technology*, *58*(2), 201. In KAMIŃSKI, S., CIEŚLIŃSKA, A., & KOSTYRA, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of applied genetics*, *48*(3), 189-198.

OTOVÁ, B. A MIHALOVÁ, R. (2012). Základy biologie a genetiky člověka. *V Praze: Karolinum*. ISBN 978-80-246-2109-8.

PETR, J. (2010). Co odhalil genom skotu. *Náš chov*. LXX. (1), 52-54. ISSN 0027-8068. Dostupné z: https://profipress.cz/archiv/nas-chov-012010/?text=genom%20skotu#page/52

PIJANOWSKI, E. (1977). Základy chémie a technológie mliekárstva. Bratislava: Príroda.

PLEMENNÁ ROČENKA [online]. 2018 [cit. 2019-03-06]. Dostupné z: https://www.holstein.cz/cz/rocenky/109-rocenka-2018-ku/file

RACHMAN, A. B. (2010). Telaah Komposisi dan Isolasi Laktoferin pada Kolostrum dan Susu dari Berbagai Bangsa Kambing.

RICHARDSON, J. S. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Advances in protein chemistry*, *34*, 167-339.

RIJNKELS, M. (2002). Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, *7*(3), 327-345.

RODRIGUES, M. T., SOARES, M. A. M., ZACARO, A. A., SILVA, M. M. C., GARCIA, O. S. R., & MAGALHÃES, A. C. M. (2015). Differences in the defective alleles E and F for the locus CSN1S1 in goats affects the profile of milk caseins. *Small Ruminant Research, 123*(1), 47-54.

ROSYPAL, S. (2001). Terminologie molekulární biologie: české odborné termíny, jejich definice a anglické ekvivalenty. 1. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, ISBN 80-902-5623-6.

SANTOSO, W. E. A., & ESTIASIH, T. (2014). jurnal review: kopigmentasi ubi jalar ungu (ipomoea batatas var. ayamurasaki) dengan kopigmen na-kaseinat dan protein whey serta stabilitasnya terhadap pemanasan [in press oktober 2014]. *Jurnal Pangan dan Agroindustri, 2*(4), 121-126.

SKLÁDANKA, J. (2014). Chov strakatého skotu. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014. ISBN 978-80-7509-258-8.

SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J., RELICHOVÁ, J., ed. (2009). Genetika. *Brno: Masarykova univerzita*. ISBN 9788021048522.

STEWART, A. F., BONSING, J., BEATTIE, C. W., SHAH, F., WILLIS, I. M., & MACKINLAY, A. G. (1987). Complete nucleotide sequences of bovine alpha S2-and beta-casein cDNAs: comparisons with related sequences in other species. *Molecular biology and evolution*, *4*(3), 231-241.

STRAPÁK, P. a kol. (2013) Chov hovädzieho dobytka. 1. vyd. Nitra: Patria I. spol. s.r.o. 607 s. ISBN 978-80-552-0994-4

SVAZ CHOVATELŮ ČESKÉHO STRAKATÉHO SKOTU. *Plemeno české strakaté – základní informace* [online]. ©2008 [cit. 2018-12-10]. Dostupné z: https://www.cestr.cz/plemeno.html

SWAISGOOD, H. E. (2003). Chemistry of the caseins. In *Advanced dairy chemistry—1 Proteins* (pp. 139-201). Springer US.

ŠÍPEK, A. Genetika-Biologie [online]. 2010 [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: http://www.genetika-biologie.cz/molekularni-genetika

ŠRUBAŘOVÁ, P., DVOŘÁK, J. (2010). Association between Lactoferrin gene polymorphism and bovine mammary gland inflammation.

URBAN, F. (1997). Chov dojeného skotu, reprodukce, odchov, management, technologie, výživa. Praha: Apros. ISBN 80-901-1007-X.

URBAN T. (2005): Virtuální svět genetiky 2 – molekula DNA a gen [online]. Brno, [cit.2019-03-19]. Dostupné z: http://user.mendelu.cz/urban/vsg2/dna2/geny.htm#

URBAN T. (2008): Virtuální svět genetiky 3 - principy genetiky populací a kvantitativních znaků [online]. Brno, [cit. 2018-11-27]. Dostupné z: http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/qtl/qtl5.html

URBAN T. (2012): Virtuální svět genetiky 1 - Translace [online]. Brno, [cit. 2018-11-27]. Dostupné z: http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/molekul/mol_transl.html

URBAN T., VYHNÁNEK T. (2012): Virtuální svět genetiky 1 – Regulace genové exprese [online]. Brno, [cit. 2018-11-27]. Dostupné z: http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/molekul/mol_regul.html

VANĚK, D. Genetická Genealogie [online]. 2015 [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: http://www.genetickagenealogie.cz/kontakt/archeogenetika-a-geneticka-genealogie/materska-linie/mitochondrialni-dna/

VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. (2009). Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, ISBN 978-80-86659-15-2.

ZHU, M., S. ZHAO (2007): Candidate Gene Identification Approach: Progress and Challenges. *International Journal of Biological Sciences*, 3(7), 420-427.

ZIMIN, A. V., DELCHER, A. L., FLOREA, L., KELLEY, D. R., SCHATZ, M. C., PUIU, D., HANRAHAN, F., PERTEA, G., TASSELL, C. P., SONSTEGARD, T. S., MARCAIS, G., ROBERTS, M., SUBRAMANIAN, P., YORKE, J. A. A SALZBERG, S. L. (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology*, 10(4): R42.