

ĐÁNH GIÁ HIỆN TRẠNG DI TRUYỀN A1/A2 CỦA ĐÀN BÒ SỮA THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH ĐỂ CHỌN ĐÀN BÒ HẠT NHÂN A2A2 CHẤT LƯỢNG CAO

Nguyễn Ngọc Trúc Ngân¹, Thượng Thị Thu Thủy¹, Phạm Bùi Hoàng Anh¹, Nguyễn Thị Lệ Thủy¹, Phạm Thị Kim Trâm¹, Diệp Tấn Toàn², Huỳnh Việt Hoài Trung³, Nguyễn Đăng Quân¹, Dương Hoa Xô¹

¹ Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

² Trung tâm Giống cây trồng, Vật nuôi và Thủy sản Thành phố Hồ Chí Minh

³ Chi cục Thú y Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Sữa bò là một trong những thực phẩm quan trọng cung cấp protein và các nguyên tố vi lượng cho con người. Trong số 13 biến thể beta-casein ở sữa, A1 và A2 beta-casein là những biến thể được nghiên cứu nhiều nhất bởi sự tiêu hóa chưa hoàn chỉnh beta-casein A1 sẽ giải phóng một peptide hoạt tính gọi là beta-casomorphin-7 (BCM-7). Những nghiên cứu gần đây đã đưa ra nhiều bằng chứng cho thấy sự liên quan giữa A1 beta-casein và nguy cơ mắc bệnh đái tháo đường loại 1, bệnh tim mạch, hội chứng trẻ sơ sinh chết đột ngột, bệnh tự kỷ và sức khỏe hệ tiêu hóa. Ngoài ra, các nghiên cứu cũng cho thấy biến thể A2 (beta-casein tự nhiên) có ảnh hưởng đáng kể đến tổng lượng sữa cũng như thành phần và chất lượng sữa. Với tầm quan trọng của beta-casein sữa như vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xác định bò sữa mang gen đồng hợp A2A2 trong đàn bò sữa Thành phố Hồ Chí Minh bằng phương pháp giải trình tự gen. Kết quả xác định với 500 bò sữa thu được 9 bò đồng hợp A1A1 (1,8%), 454 bò dị hợp A1A2 (90,8%) và 37 bò đồng hợp A2A2 (7,4%). Tần suất xuất hiện của allele A1 và A2 lần lượt là 47,2% và 52,8%. Bên cạnh phương pháp giải trình tự gen, protein beta-casein A1 hay A2 trong các mẫu sữa bò cũng được khẳng định bằng phương pháp Western blot. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ bò đồng hợp A2A2 được xác định là 7,4% đã cho thấy triển vọng xác định và nhân giống được đàn bò sữa đồng hợp A2A2 ở thành phố Hồ Chí Minh là rất khả quan.

Từ khóa: Beta-casein, bò sữa, giải trình tự gen, sữa A2.

MỞ ĐẦU

Sữa bò là một loại thực phẩm quan trọng cung cấp protein và các nguyên tố vi lượng cho trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ và người lớn. Sữa bò có hai nhóm protein chính là whey và casein. Trong đó, casein chiếm 80% và là một trong những nhóm quan trọng vì liên quan đến nhiều chức năng sinh lý (Sodhi *et al.*, 2018). Trong bốn loại casein, beta-casein chiếm 25 - 35% và là gen có độ đa hình lớn nhất trong các gen mã hóa protein sữa. Các nghiên cứu trên thế giới đã phát hiện ra 13 biến thể beta-casein trong sữa bò (Kaminski *et al.*, 2007). Trong đó beta-casein A1, A2 là những allele phổ biến và quan trọng nhất, được bắt nguồn từ đột biến tự nhiên do sự thay đổi codon thứ 67 của gen beta-casein mã hóa amino acid proline (CCT) trong A2 được thay đổi thành codon mã hóa histidine trong biến thể A1 (CAT). Sự khác biệt này trong chuỗi amino acid dẫn đến thay đổi trong cấu trúc bậc hai của protein được biểu hiện, từ đó gây ảnh hưởng lên những đặc tính sinh lý của protein tương ứng (Sodhi *et al.*, 2018). Sự đa hình một nucleotide dẫn đến thay đổi lớn trong đặc tính của giống là hiện tượng hiếm trong thực tế, do đó allele beta-casein A1/A2 rất hiệu quả để làm marker chọn giống bò sữa. Việc sử dụng các marker này cho phép chọn được giống bò cho sữa có hàm lượng protein cao và giảm nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe của người tiêu dùng (Miluchova *et al.*, 2014).

Trong những năm gần đây, ngành công nghiệp sữa thế giới chứng kiến sự thành công của sữa A2, chứa thành phần beta-casein A2 mà không có thành phần beta-casein A1 (được cho là có khả năng gây ảnh hưởng không tốt cho sức khỏe người sử dụng). Tại Việt Nam, Công ty sữa Vinamilk đã đầu tư kinh phí lớn để nhập khẩu 200 con bò sữa A2 thuần chủng từ New Zealand. Tập đoàn TH công bố đã tiến hành lựa chọn từ đàn bò của công ty và phân tách những con bò sữa có kiểu gen A2A2 để nhân giống tạo đàn. Như vậy có thể thấy, tạo đàn bò A2A2 thuần chủng và sản xuất sữa A2 là hướng đi đang rất được chú trọng của ngành công nghiệp sữa trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Hiện nay, Thành phố Hồ Chí Minh (TP. HCM) là địa phương dẫn đầu đóng góp tới 75,66% sản lượng sữa toàn miền Nam. Theo thống kê 01/4/2020 của Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn TP. HCM, tổng đàn bò sữa của Thành phố là 74.153 con. Đàn bò sữa được nuôi chủ yếu tại Củ Chi chiếm 78,13% và Hóc Môn chiếm 16,85% tổng đàn. Tuy nhiên, chưa có dữ liệu về tần suất xuất hiện của allele A1/A2 trong đàn bò sữa tại TP. HCM. Việc xác định hiện trạng di truyền của allele A1/A2 trong đàn bò thành phố giúp đánh giá khả năng lựa chọn được những con bò sữa thuần chủng A2A2. Xuất phát từ xu hướng nhu cầu về sữa A2 hiện nay cũng

như tình hình thực tế tại TP. HCM, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này để chọn đàn bò A2A2 chất lượng cao. Trên cơ sở những cá thể bò sữa A2A2 xác định được từ nghiên cứu, ngành nông nghiệp TP. HCM có thể xây dựng chương trình tuyển chọn và phối giống hợp lý nhằm nhân rộng đàn bò A2A2 sản xuất sữa A2 có giá trị kinh tế cao. Đây là một đề tài nghiên cứu rất thiết thực, có thể ứng dụng ngay vào thực tiễn sản xuất để nâng cao giá trị kinh tế của bò sữa và sản phẩm sữa của TP. HCM, giảm thiểu việc nhập khẩu sữa A2 cũng như bò A2A2 từ nước ngoài, mang đến cho người tiêu dùng sản phẩm sữa có lợi hơn cho sức khỏe.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Tiêu chuẩn chọn lựa bò và thu mẫu máu, sữa bò cho nghiên cứu

Mẫu máu và sữa của 500 con bò khác nhau được thu nhận bởi Trung tâm Giống cây trồng, Vật nuôi và Thủy sản TP. HCM, Chi cục Chăn nuôi và Thú y TP. HCM từ các hộ, trang trại nuôi bò sữa tại 2 khu vực là huyện Củ Chi và huyện Hóc Môn từ tháng 11 đến tháng 12 năm 2019. Tiêu chuẩn cụ thể đối với từng cá thể bò cái được chọn để đánh giá bao gồm: (1) Bò sữa từ 3 đến 6 năm tuổi, (2) Đỉnh sữa: 15 - 20 kg/ngày.

5 mL máu tươi (máu tĩnh mạch) của mỗi con bò thu nhận được chứa trong các ống thu mẫu chứa chất chống đông. Mẫu được giữ ở 4°C, vận chuyển về phòng thí nghiệm và được sử dụng để thực hiện giải trình tự gen. 30 mL sữa tươi của mỗi bò thu nhận được giữ ở 4°C, vận chuyển về phòng thí nghiệm và sử dụng để xác nhận sự hiện diện của protein beta-casein A1 và A2.

Lựa chọn cặp mồi khuếch đại vùng gen beta-casein

Trình tự mồi khuếch đại vùng gen beta-casein được tham khảo từ công bố trước đây (Ganguly *et al.*, 2013). Cặp mồi được tổng hợp bởi công ty IDT, Mỹ. Mồi xuôi: 5'-CCA GGA TAA AAT CCA CCC CT-3', mồi ngược: 5'-AGG GAA GGG CAT TTC TTT GT-3' được kiểm tra các thông số kỹ thuật (%GC, Tm, Hairpin, Self-Dimer, Hetero-Dimer) bằng Oligo Analyzer, kiểm tra độ đặc hiệu với trình tự mục tiêu bằng phần mềm BLAST. Kiểm tra khả năng khuếch đại trình tự mục tiêu trên lý thuyết bằng PCR *in silico*.

Khuếch đại trình tự gen beta-casein từ mẫu máu bò

Khuếch đại trình tự vùng gen beta-casein trực tiếp từ máu bò bằng Phusion Blood Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) sử dụng cặp mồi đã lựa chọn với nồng độ mồi 0,5 µM. Chu trình nhiệt độ được cài trong máy PCR là 94°C trong 3 phút, 40 chu kỳ (94°C trong 30 giây; 50°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây) và kết thúc ở điều kiện 72°C, 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% để phát hiện trình tự mục tiêu.

Giải trình tự gen beta-casein

Sau khi kiểm tra trình tự mục tiêu đã được khuếch đại bằng điện di gel agarose, chúng tôi tiến hành tinh sạch sản phẩm PCR bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Các sản phẩm PCR sau tinh sạch được sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng chu kỳ giải trình tự (cycle sequencing reaction) sử dụng bộ BigDye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Sau đó tủa sản phẩm giải trình tự bằng hỗn hợp CH₃COONa 3 M; ethanol 100%; Mg²⁺ 0,01 M, ủ ở -80°C trong 1 giờ. Ly tâm mẫu ở 13.500 vòng/phút, 4°C, 30 phút, đổ bỏ dịch nổi. Loại bỏ tạp chất và các chất đánh dấu thừa bằng cách rửa với ethanol 70%. Ly tâm 13.500 vòng/phút, 4°C, 15 phút, đổ bỏ dịch nổi. Làm khô mẫu ở nhiệt độ phòng và thêm 10 µl Hi-Di formamide, trộn đều sau đó ủ ở 98°C trong 5 phút. Để mẫu trên đá và nạp mẫu vào máy giải trình tự DNA 3.500 Genetic Analyser (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Quá trình giải trình tự gen beta-casein được thực hiện tại phòng thí nghiệm của phòng Công nghệ sinh học Y dược - Trung tâm Công nghệ sinh học TP. HCM.

Xác nhận sự hiện diện của protein beta-casein A1 và A2 trong mẫu sữa bò

Mẫu sữa thu nhận được hòa với NaOH 0,1 M theo tỉ lệ 1:10, tiếp đến được hoà trong 5 X Laemmli buffer và biến tính ở 95°C trong 5 phút. Sau đó, mẫu được điện di trên gel SDS - PAGE sử dụng nồng độ gel tách 15%. Protein phân tách trên gel SDS - PAGE được chuyển sang màng nitrocellulose bằng hệ thống chuyển màng Semidry (Biorad). Màng sau khi chuyển được nhuộm bằng dung dịch Ponceau S để kiểm tra sự hiện diện của các vạch protein được chuyển lên màng. Tiếp đến, màng được ngâm trong 1 giờ bằng dung dịch TBS chứa 5% BSA. Màng được ủ với kháng thể kháng beta-casein A1 (Biosensis - #C-1781-100) và kháng thể kháng beta-casein A2 (Biosensis - # C-1780-100) với độ pha loãng 1:10.000 trong dung dịch TBS-T chứa 3% BSA ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Màng sau khi ủ với kháng thể được rửa 3-4 lần bằng dung dịch TBS-T và ủ với kháng thể thứ cấp có gắn peroxidase (Thermo Fisher - #31401) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng sau đó được rửa 3-4 lần với dung dịch TBS-T. Màng được phát hiện bằng bộ kit ECL (Thermofisher - #32106).

Phân tích số liệu và xác định các cá thể bò đồng hợp A2A2 làm cơ sở xây dựng đàn bò sữa hạt nhân của Thành phố Hồ Chí Minh

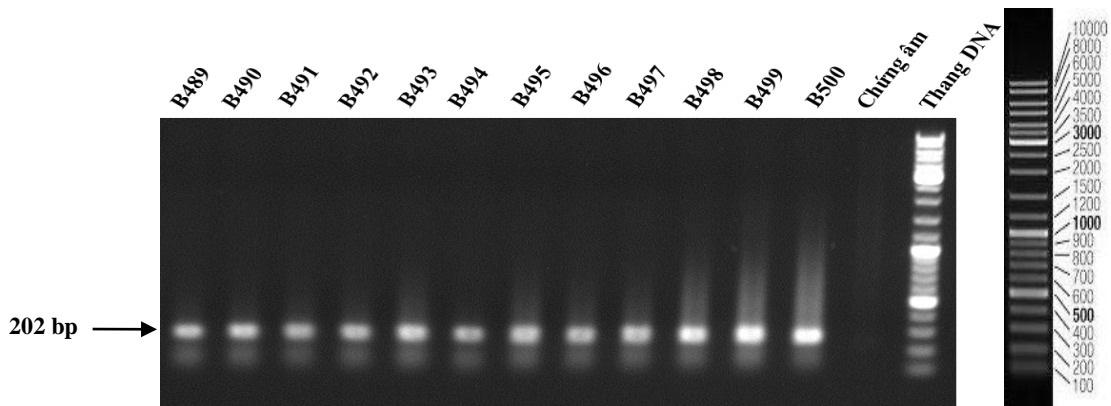
Các trình tự nucleotide đã giải trình tự được đọc tín hiệu bằng phần mềm SnapGene Viewer 3.3. Trình tự được xuất ra tập tin định dạng fasta và được so sánh với trình tự vùng gen mã hóa beta-casein (A1) hoàn chỉnh tham khảo từ cơ sở dữ liệu Genbank (accession no. XM_010806178.2) bằng công cụ BLAST. Đọc kết quả BLAST và

xác định điểm đột biến dựa trên nguyên tắc xác định sự thay đổi trình tự gen mã hoá cho beta-casein tại codon thứ 67 mã hoá amino acid proline (CCT) trong A2 được thay đổi thành codon mã hoá cho histidine (CAT) trong biến thể A1; từ đó sẽ xác định được gen mã hóa beta-casein tồn tại ở dạng đồng hợp A1, đồng hợp A2 hoặc dị hợp A1A2. Trên cơ sở dữ liệu gen kết hợp với kết quả xác nhận sự hiện diện của protein, đàn bò hạt nhân đồng hợp A2A2 được xác định.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khuếch đại trình tự gen beta-casein bằng PCR

Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại trình tự đoạn gen beta-casein từ mẫu máu bò trên gel agarose 1% được quan sát bằng máy chụp hình Gel imaging system GelDoc Analytick Jena - Đức. Kích thước của đoạn gen beta-casein khuếch đại là khoảng 202 bp theo dự đoán (Hình 1). Kết quả PCR cho thấy cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu này hoàn toàn có thể khuếch đại gen beta-casein với kích thước vùng gen mục tiêu là 202 bp.

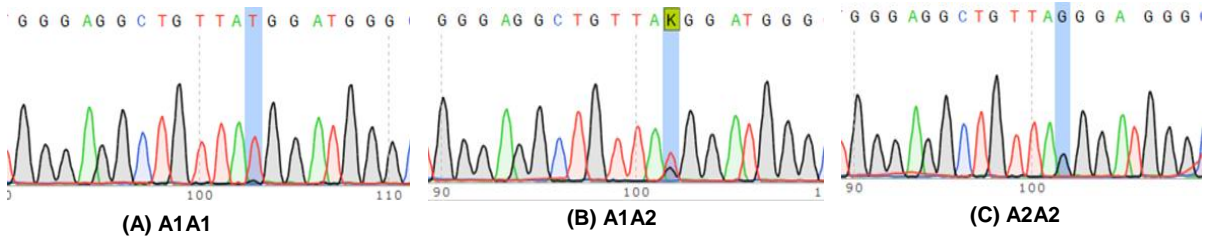


Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng gen beta-casein ở một số mẫu bò trên gel agarose 1%

Kết quả giải trình tự gen beta-casein

Nhóm nghiên cứu đã tiến hành giải trình tự vùng gen beta-casein của 500 mẫu máu bò thu nhận. Kết quả giải trình tự vùng gen beta-casein tại vị trí đột biến điểm của một số mẫu với mỗi ngược được trình bày ở Hình 2. Kết quả BLAST của mẫu bò nghiên cứu với trình tự vùng gen mã hóa beta-casein (A1) hoàn chỉnh tham khảo từ Genbank (accession no. XM_010806178.2) được trình bày ở Hình 3. Sau khi phân tích kết quả xác định được 37 (7,4%) cá thể bò mang kiểu gen A2A2 beta-casein, 9 (1,8%) cá thể bò mang kiểu gen A1A1 và 454 (90,8%) cá thể bò mang kiểu gen A1A2. Các mẫu bò mang kiểu gen đồng hợp A2A2 chủ yếu được lấy từ các trại bò thuộc huyện Hóc Môn. Tần số xuất hiện của allele A1 trong đàn bò thành phố là 47,2%, allele A2 là 52,8%. Mặc dù tần số xuất hiện của allele A2 trong đàn bò thành phố cao (52,8%) nhưng số lượng bò chỉ sản xuất sữa beta-casein A2 không nhiều. Cụ thể, trong tổng số 500 mẫu đã giải trình tự, bò đồng hợp A2A2 chiếm 7,4% (37 mẫu).

Kết quả từ nghiên cứu này có sự tương đồng với một số nghiên cứu trên thế giới về đánh giá tần số allele và kiểu gen của beta-casein. Ví dụ như một công bố năm 2020 của nhóm nghiên cứu Sebastiani và đồng tác giả về đánh giá sự lưu hành của các gen mã hóa beta-casein nhằm lựa chọn các bò sữa đồng hợp A2 để tạo ra sữa A2A2 chất lượng cao. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy tần số xuất hiện của allele A1 và A2 lần lượt là 61% và 30% (Sebastiani *et al.*, 2020). Tương tự, năm 2019 các nhà khoa học Ba Lan đã công bố một nghiên cứu về tính đa hình di truyền của gen mã hóa beta-casein nhằm đánh giá tần số xuất hiện của biến thể A1, A2 của gen mã hóa beta-casein ở bò tốt Ba Lan. Kết quả nghiên cứu cho thấy tần số xuất hiện allele A2 là 47% (Cieślińska *et al.*, 2019). Một cách tổng quát từ các nghiên cứu trên thế giới và nghiên cứu của chúng tôi có thể thấy cả hai biến thể A1, A2 của gen mã hóa beta-casein đều xuất hiện phổ biến trong đàn bò thế giới. Kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi phân tích trên 500 bò sữa trong đàn bò sữa thành phố cho thấy tỷ lệ bò sữa đồng hợp A2A2 chỉ có 7,4% bò cho sữa hoàn toàn là beta-casein A2. Con số này là khá thấp, do đó, để nâng cao lượng sữa bò A2A2, việc tiếp tục xác định bò đồng hợp A2A2 và tiến hành lai tạo ra đàn bò thuần chủng A2A2 cung cấp cho các trang trại bò tại thành phố là rất quan trọng.



Hình 2. Kết quả giải trình tự vùng gen beta-casein tại vị trí đột biến điểm của một số mẫu với mỗi ngược. (A) Mẫu đồng hợp A1A1 (mẫu B23), (B) mẫu dị hợp A1A2 (mẫu B52), (C) mẫu đồng hợp A2A2 (mẫu B106). Kí hiệu K = T hoặc G

Mẫu đồng hợp A1A1 (mẫu B23)

```

Query 1 TCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGC 60
Sbjct 407 TCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGC 466
Query 61 CCATCCATAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGC 120
Sbjct 467 CCATCCATAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGC 526
Query 121 CGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAA 157
Sbjct 527 CGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAA 563
    
```

Mẫu dị hợp A1A2 (mẫu B52)

```

Query 1 TCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGC 60
Sbjct 407 TCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGC 466
Query 61 CCATCCMTAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGC 120
Sbjct 467 CCATCCATAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGC 526
Query 121 CGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAG 159
Sbjct 527 CGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAG 565
    
```

Mẫu đồng hợp A2A2 (mẫu B106)

```

Query 1 TCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGC 60
Sbjct 407 TCCAGGATAAAATCCACCCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGC 466
Query 61 CCATCCCTAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGC 120
Sbjct 467 CCATCCATAACAGCCTCCACAAAACATCCCTCCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGC 526
Query 121 CGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAA 157
Sbjct 527 CGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAA 563
    
```

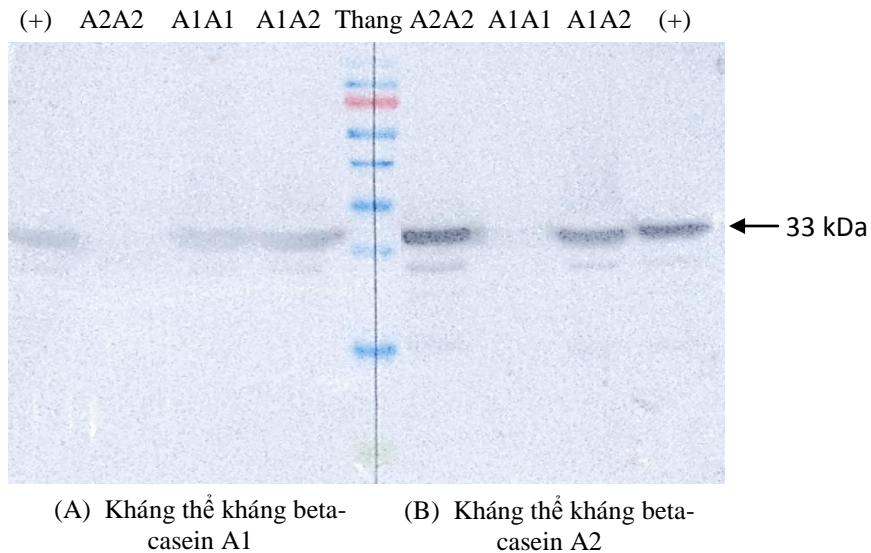
Hình 3. Kết quả BLAST trình tự của một số mẫu bò nghiên cứu với trình tự vùng gen mã hóa beta-casein (A1) hoàn chỉnh tham khảo từ Genbank. Query: Trình tự nucleotide (từ kết quả giải trình tự) của mẫu nghiên cứu; Sbjct: Trình tự nucleotide vùng gen mã hóa beta-casein (A1) hoàn chỉnh tham khảo từ Genbank (accession no. XM_010806178.2)

Kết quả BLAST của mẫu B23 với trình tự beta-casein A1 tham khảo (ở hình 3) ghi nhận vị trí đột biến là 473 theo vị trí trên trình tự tham khảo. Theo đó, tại vị trí đột biến trên trình tự tham khảo (beta-casein A1) được xác định là nucleotide A thì tương ứng trên trình tự nucleotide của mẫu nghiên cứu (B23) cũng là tín hiệu của nucleotide A nên mẫu B52 được xác định là đồng hợp A1A1. Trong khi đó, kết quả BLAST của mẫu B106 với trình tự beta-casein A1 tham khảo cho thấy vị trí đột biến 473 trên trình tự tham khảo (beta-casein A1) được xác định là nucleotide A thì tương ứng trên trình tự nucleotide của mẫu nghiên cứu (B106) có tín hiệu của nucleotide C nên mẫu B106 được xác định là đồng hợp A2A2. Kết quả BLAST của mẫu B52 với trình tự beta-casein tham khảo (Hình 3) ghi nhận tại vị trí đột biến 473 theo vị trí trên trình tự tham khảo chính là nucleotide A, tương ứng trên trình tự nucleotide của mẫu nghiên cứu (B52) thì có tín hiệu của cả hai nucleotide là A và C nên mẫu B52 được xác định là dị hợp A1A2.

Sự hiện diện của protein beta-casein A1 và A2 trong một số mẫu sữa bò

Để kiểm tra lại kết quả giải trình tự, tất cả mẫu có kết quả giải trình tự là đồng hợp A2A2 và một số mẫu A1A1, A1A2 được tiến hành xác nhận sự hiện diện của protein beta-casein A1 hay A2 trong thành phần sữa bò bằng phương pháp Western blot. Mẫu sữa được xác định chỉ mang beta casein A1 hoặc A2 nếu chỉ cho tín hiệu khi lai với kháng thể kháng beta casein A1 hoặc A2 nhưng không cho tín hiệu với kháng thể còn lại. Trong trường hợp mẫu sữa cho tín hiệu khi lai với kháng thể kháng beta casein A1 và kháng thể kháng beta casein A2 thì mẫu sữa được xác định mang đồng thời beta casein A1 và beta casein A2 (Hình 4). Sự hiện diện của beta casein A1 và A2 được thể hiện bằng vạch protein có kích thước khoảng 33 kDa (Hình 4), cao hơn khối lượng phân tử được công bố của beta casein A1 và A2. Hiện tượng này cũng được ghi nhận ở các nghiên cứu về casein bò của

Jovanovic, Hristov, và Shandilya (Jovanovic *et al.*, 2007; Hristov *et al.*, 2012; Shandilya *et al.* 2015). Sự khác biệt này được cho là do sự phosphoryl hóa trên beta casein (Hasson *et al.*, 1983, Shandilya *et al.* 2015). Kết quả cho thấy tất cả 37 mẫu sữa từ những con bò được xác định là đồng hợp A2A2 bằng phương pháp giải trình tự đều được xác nhận chỉ mang beta casein A2 bằng phương pháp Western blot.



Hình 4. Kết quả Western blot xác định A1, A2 beta-casein protein ở một số mẫu sữa bò

(A) Ủ màng với kháng thể kháng beta-casein A1; (B) Ủ màng với kháng thể kháng beta-casein A2. Mẫu sữa bò đồng hợp A2A2 (mẫu B106) cho tín hiệu lai khi ủ với kháng thể A2; mẫu sữa bò đồng hợp A1A1 (mẫu B23) cho tín hiệu lai khi ủ với kháng thể A1; mẫu sữa bò dị hợp A1A2 (mẫu B52) cho tín hiệu lai khi ủ với cả hai kháng thể A1 và A2, (+): mẫu sữa đã được xác định mang beta-casein A1 và A2 từ nghiên cứu trước.

KẾT LUẬN

Kết quả phân tích của chúng tôi trên 500 mẫu bò cho thấy tần suất xuất hiện của allele A1 trong đàn bò thành phố là 47,2%, allele A2 là 52,8%. Mặc dù tần suất xuất hiện của allele A2 trong đàn bò thành phố cao nhưng số lượng bò cho sữa đồng hợp A2A2 beta-casein không nhiều. Cụ thể là, trong tổng số 500 mẫu đã giải trình tự, số mẫu có kiểu gen đồng hợp A2A2 chiếm 7,4% (37 mẫu). Con số này là khá thấp, do đó, để nâng cao lượng sữa bò A2, việc tiếp tục xác định bò đồng hợp A2A2 và tiến hành lai tạo ra đàn bò thuần chủng A2A2 cung cấp cho các trang trại bò tại TP. HCM là rất quan trọng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cieślińska A, Fiedorowicz E, Zwierzchowski G, Kordulewska N, Jarmołowska B, Kostyra E (2019). Genetic Polymorphism of β -Casein Gene in Polish Red Cattle-Preliminary Study of A1 and A2 Frequency in Genetic Conservation Herd. *Animals: an open access journal from MDPI* 9(6): 377.
- Farrell Jr HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, ... Swaisgood HE (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *J Dairy Sci* 87(6), 1641-1674.
- Ganguly I, Kumar S, Gaur GK, Singh U, Kumar A, Kumar S, Mann S, Sharma A (2013). Beta-casein (CSN2) polymorphism in Ongole (Indian zebu) and Frieswal (HF x Sahiwal crossbred) cattle. *Ind J Biotechnol* 12: 195-198.
- Hansson L, Bergstrom S, Hernell O, Lonnerdal B, Nilsson AK, Stromqvist M (1993). Expression of human milk β -casein in *Escherichia coli*: Comparison of recombinant protein with native isoforms. *Protein Exp Puri* 4(5): 373-381.
- Hristov P, Teofanova D, Mehandzhyski I, Zagorchev L, Radoslavov G (2012). Application of milk proteins genetic polymorphism for selection and breeding of dairy cows in Bulgaria. *Milk Production-Advanced Genetic Traits, Cellular Mechanism, Animal Management and Health, InTech*, 31-52.
- Jovanovic S, Barac M, Macej O, Vucic T, Lacnjevac C (2007). SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. *Sensors* 7(3): 371-383.
- Kaminski S, Cieślińska A, Kostyra E, (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J Appl Gen* 43 (3):189-198.

- Miluchova M, Gabor M, Trakovicka A (2014). Analysis of genetic structure in Slovak pinzgau cattle using five candidate genes related to milk production traits. *Genetika* 46(3): 865-875.
- Sebastiani C, Arcangeli C, Ciullo M, Torricelli M, Cinti G, Fisichella S, Biagetti M (2020). Frequencies Evaluation of β -Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy. *Animals: an open access journal from MDPI* 10(2): 252.
- Shandilya UK, Kapila R, Kapila S, Kansal VK (2015). Different stimulating effects of caseins and whey proteins of processed cow and buffalo milk on lymphocyte proliferation in vitro. *Open Access Animal Physiol* 7, 121.
- Sodhi M, Kataria RS, Nirajan KS, et al. (2018). Sequence characterisation and Genotyping of allelic variants of beta-casein gene establishes native cattle of Ladakh to be natural resource for A2 milk. *Defence Life Sci J* 3(2): 177-181.

EVALUATION OF THE GENETIC A1/A2 STATUS IN HO CHI MINH CITY DAIRY COWS FOR THE SELECTION OF HIGH-QUALITY NUCLEUS BREEDING A2A2 HERDS

Nguyen Ngoc Truc Ngan¹, Thuong Thi Thu Thuy¹, Pham Bui Hoang Anh¹, Nguyen Thi Le Thuy¹, Pham Thi Kim Tram¹, Diep Tan Toan², Huynh Viet Hoai Trung³, Nguyen Dang Quan^{1*}, Duong Hoa Xo¹

¹ Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

² Ho Chi Minh City Center of Crop Seeding, Animal and Aquatic Breeds

³ Department of Animal Health Ho Chi Minh City

SUMMARY

Cow's milk is one of the most important sources of protein and trace elements for human being. Among 13 beta-casein variants, A1 and A2 beta-casein are the most studied ones because the incomplete digestion of A1-casein releases a harmful active peptide called beta-casomorphin-7 (BCM-7). Recent studies have provided evidence to show the association between A1 beta-casein consumption and the risk of type 1 diabetes, cardiovascular disease, sudden infant death syndrome, autism, and digestion. Moreover, it has been shown that the A2 variant (the natural form of beta-casein) has significant beneficial effects on the total amount of milk production as well as milk's composition and quality. Given the importance of such beta-casein variants, we have conducted a study to examine the prevalence of homozygous genotype A2A2 in Ho Chi Minh city herds by DNA sequencing method. The results have identified 9 cows with homozygous genotype A1A1 (1.8%), 454 heterozygous genotype A1A2 (90.8%), and 37 cows with homozygous genotype A2A2 (7.4%). Frequency of occurrence of A1 and A2 alleles were 47.2% and 52.8%, respectively in dairy cows in Ho Chi Minh city. In addition to DNA sequencing, the A1 or A2 beta-casein protein in cows' milk samples was also confirmed by Western blot. In summary, the percentage of homozygous genotype A2A2 cows (7.4%) examined in this study infers the prospect of identifying and propagating A2A2 dairy cows in Ho Chi Minh city.

Keywords: A2 milk, beta-casein, cow, DNA sequencing.

* Author for correspondence: Tel: +84.982749361; Email: thuongthithuthuy1512@gmail.com