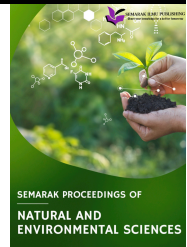




Semarak Proceedings of Natural and Environmental Sciences

Journal homepage: <https://semarakilmu.com.my/journals/index.php/spnes/index>
ISSN: 3083 - 8191



Kajian Polimorfisme Nukleotida Tunggal (SNP) dalam Gen Prolaktin (PRL) pada Lembu Tenusu di Pahang dan Melaka *Study of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in Prolactin (PRL) Gene in Dairy Cattle in Pahang and Melaka*

Nurathila Syafiqah Mohd Zulkifli¹, Nadiatur Akmar Zulkifli^{1,*}

¹ Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, 43600, Selangor

ABSTRACT

Susu merupakan makanan kompleks yang penting dalam pemakanan manusia iaitu membantu dalam tumbesaran. Pengeluaran susu lembu yang dihasilkan di Malaysia adalah kurang dari permintaan dan menyebabkan susu terpaksa diimport dari luar negara. Penghasilan susu dalam lembu tenusu dipengaruhi oleh banyak gen dan salah satunya ialah gen *Prolaktin (PRL)*. Kehadiran polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) dalam gen *PRL* didapati mempunyai kaitan dengan penghasilan dan kualiti susu. Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk menyaring SNP dalam gen *PRL* pada lembu tenusu di Melaka dan Pahang yang boleh digunakan sebagai penanda genetik untuk pembiakbakaan. Sebanyak 20 sampel darah lembu tenusu yang diperoleh dari baka Australian Friesian Sahiwal, Jersey dan baka campuran telah berjaya diekstrak. Kaedah tindakbalas berantai polimerase (PCR) telah berjaya mengamplifikasi ekson 4 menggunakan pencetus ke hadapan PRLex4F dan pencetus ke belakang PRLex4R untuk menghasilkan produk PCR bersaiz 294 pb. Produk PCR telah diujuk dan hasil jujukan disunting menggunakan perisian *Sequencher* dan *MEGA-11*. Jujukan DNA telah disaring dan didapati terdapat dua SNP iaitu SNP#120 dan SNP#141. Hasil saringan SNP #120 menunjukkan terdapat 13 sampel yang menunjukkan kehadiran bes C, dua sampel menunjukkan kehadiran bes G dan lima sampel menunjukkan kehadiran bes C/G. Bagi SNP #141, terdapat 13 sampel yang menunjukkan kehadiran bes G, dua sampel menunjukkan kehadiran bes A dan lima sampel menunjukkan kehadiran bes G/A. Frekuensi alel C pada SNP #120 bagi sampel dari negeri Pahang menunjukkan nilai yang lebih tinggi iaitu 0.7 berbanding alel G (0.2) dan frekuensi alel C pada SNP #120 bagi sampel dari negeri Melaka adalah lebih tinggi iaitu 0.75 berbanding alel G (0.25). Frekuensi alel G pada SNP #141 bagi sampel dari negeri Pahang menunjukkan nilai yang lebih tinggi iaitu 0.8 berbanding alel A (0.2) dan frekuensi alel G pada SNP #141 bagi sampel dari negeri Melaka adalah lebih tinggi iaitu 0.75 berbanding alel A (0.25). Hasil ini dapat diaplikasikan sebagai penanda genetik untuk pembiakbakaan dan dapat membantu penternak memilih lembu yang menghasilkan susu yang berkualiti dan lebih banyak.

Milk is an important complex food in human nutrition that aids in growth. The production of cow's milk produced in Malaysia is less than the demand and the milk must be imported from abroad. Milk production in dairy cows is influenced by many genes and one of them is the Prolactin (PRL) genes. The presence of single nucleotide polymorphisms (SNP) in the PRL gene has been found to be associated with milk production and quality. Therefore, this study aims to screen SNPs in PRL genes in dairy cows in Melaka and Pahang which can be used as genetic markers for breeding. A total of 20 dairy cow blood samples obtained from Australian Friesian Sahiwal, Jersey and mixed breeds were successfully extracted. The polymerase chain reaction (PCR) method has successfully amplified exon 4 using PRLex4F forward primer and PRLex4R reverse primer to produce a 294 bp PCR product. The PCR products were sequenced, and the sequences were edited using Sequencher and MEGA-11 software. The DNA sequences were screened, and it was found that there were two SNPs, namely SNP #120 and SNP #141. The results of SNP #120 screening showed that there were 13 samples showing the presence of base C, two samples showing presence of base G and five samples showing the presence of

* Corresponding author.

E-mail address: nadia.zulkifli@ukm.edu.my

<https://doi.org/10.37934/spnes.1.1.5762>

base C/G. For SNP #141, there were 13 samples showing the presence of base G, two samples showing the presence of base A and five samples showing the presence of base G/A. The frequency of the C allele in SNP #120 for the sample from Pahang showed a higher value of 0.7 compared to the G allele (0.2) and the frequency of the C allele in SNP #120 for the sample from Melaka was higher at 0.75 compared to the G allele (0.25). The frequency of the G allele in SNP #141 for the sample from Pahang showed a higher value of 0.8 compared to the A allele (0.2) and the frequency of the G allele in SNP #141 for the sample from Melaka was higher at 0.75 compared to the A allele (0.25). These results can be applied as genetic markers for breeding and can help breeders choose cows that produce better quality and more milk.

Kata kunci: Frekuensi alel; frekuensi genotip; polimorfisme

Keywords: Allelic frequency; genotypic frequency; polymorphism

1. Pengenalan

Susu dan produk susu merupakan makanan yang mempunyai banyak nutrien penting untuk tumbesaran dan menjadi sumber utama bagi mendapatkan protein, vitamin dan mineral [1]. Pengambilan susu yang disyorkan untuk dewasa dan kanak-kanak berusia sembilan tahun dan ke atas adalah sebanyak 273ml sehari [2]. Pada tahun 2022, secara purata pengeluaran susu di dunia meningkat sebanyak 0.7% bersamaan dengan 897 juta tan [3]. Namun begitu, menurut laporan daripada Jabatan Perkhidmatan Veterinar [4], kuantiti susu lembu yang dihasilkan di Malaysia adalah tidak mencukupi kerana jumlah pengambilan susu oleh rakyat Malaysia melonjak daripada 56.6 juta liter pada tahun 2016 kepada 62.8 juta liter pada tahun 2017. Hal ini menyebabkan kerajaan Malaysia perlu mengimport susu dari negara luar seperti Australia dan New Zealand.

Penghasilan susu lembu telah banyak dikaitkan dengan gen *Prolaktin (PRL)*. Gen *PRL* mempunyai 5 ekson dan terletak pada kromosom 23 [5]. Menurut Provost *et al.*, [6], gen *PRL* merupakan gen yang penting untuk mengekalkan laktasi dan juga bertanggungjawab untuk proses mensintesis komponen utama dalam susu seperti protein dan lipid. Menurut Bangar *et al.*, [7], beberapa kajian telah menunjukkan bahawa perbezaan polimorfisme dalam gen *PRL* mempunyai hubungan dengan ciri berbeza dalam lembu tenusu. Kajian lepas banyak menunjukkan ekson 4 merupakan kawasan yang paling polimorfik dan berpotensi dalam memberikan kesan kepada ciri-ciri dan hasil susu [8]. Berdasarkan beberapa kajian yang telah dijalankan oleh [9-11] terdapat perubahan polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) pada gen ini yang menyebabkan kadar penghasilan susu dalam setiap lembu tenusu berbeza. SNP dapat dikenal pasti apabila terdapat nukleotida yang berbeza dengan rujukan genom di kedudukan nukleotida yang sama [12]. SNP boleh menyebabkan perubahan pada asid amino apabila terdapat perubahan yang berlaku pada kawasan DNA yang berkod [13]. Penemuan SNP dalam gen ini boleh dijadikan sebagai penanda genetik bagi pembiakbakaan lembu tenusu.

Oleh yang demikian, memandangkan masih belum ada kajian berkaitan penyaringan SNP dalam gen *PRL* di Malaysia, kajian ini telah dijalankan untuk menyaring SNP dalam gen *PRL* pada lembu tenusu di Pahang dan Melaka yang boleh digunakan sebagai penanda genetik untuk pembiakbakaan. Dapatan kajian dapat memberikan gambaran awal berkenaan SNP dalam gen *PRL* dan dapat membantu penternak dalam membuat pemilihan lembu tenusu yang dapat meningkatkan penghasilan susu.

2. Metodologi

2.1 Pensampelan Sumber Genetik dan Pengekstrakan DNA

Pensampelan kajian ini melibatkan 20 sampel darah lembu tenusu yang diambil dari ladang lembu tenusu di Muadzam Shah, Pahang dan Lubuk Cina, Melaka. Sebanyak 10 sampel yang diambil di Pahang merupakan baka lembu tenusu Australian Friesian Sahiwal. Sampel darah yang diambil di Melaka pula terdiri dari lima sampel lembu baka Jersey dan lima sampel lembu baka campuran.

Kesemua 20 sampel darah lembu telah diekstrak menggunakan kit pengekstrakan *Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)* untuk mendapatkan DNA dengan mengikut langkah dan protokol yang telah disediakan.

2.4 Amplifikasi PCR, Penjujukan DNA, dan Analisis

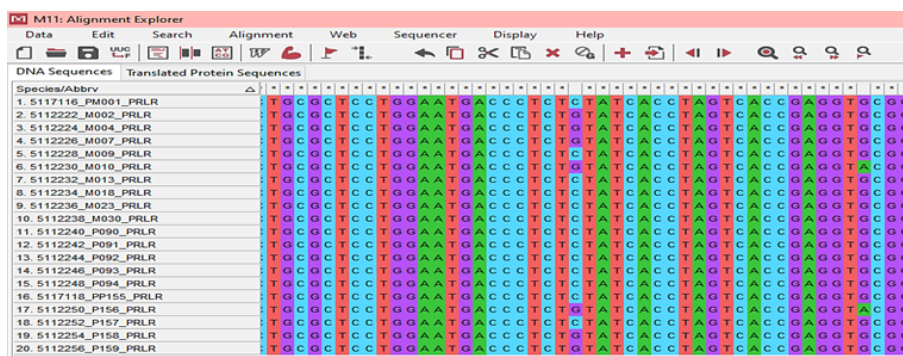
Amplifikasi tindak balas berantai polimerase (PCR) dijalankan di kawasan ekson 4 pada gen *PRL* menggunakan pasangan pencetus hadapan *PRLex4F* (5'-CCAAATCCACTGAATTATGCTT-3') dengan kepekatan 20uM sebanyak 1µl dan belakang *PRLex4R* (5'- ACAGAAATCACCTCTCTCATTCA-3') dengan kepekatan 20uM sebanyak 1µl. Pasangan pencetus ini telah dirujuk berdasarkan kajian daripada Samuel *et al.* [14]. Untuk mengamplifikasikan kawasan DNA, mesin mini16 thermal cycler (miniPCR®) telah digunakan dengan peringkat berikut: pra-pemanasan (95°C selama 180 saat); 33 kitaran untuk penyahhasilan (95°C selama 15 saat), penyepuhan (57°C selama 30 saat), pemanjangan (72°C selama 10 saat) dan pemanjangan lanjut (72°C selama 600 saat).

Hasil jujukan diperiksa, disunting dan dijajarkan sebelum dikenal pasti. Untuk memastikan hasil jujukan adalah spesies yang dikaji, perisian dan talian *BLAST (Basic Local Alignment Tool)* digunakan. Proses penyaringan SNP dalam jujukan DNA telah dilakukan menggunakan perisian *Sequencher* dan *MEGA-11*. Setelah selesai menyaring, frekuensi alel dan genotip dikira.

3. Hasil dan Perbincangan

3.1 Saringan Kehadiran SNP

Perisian *Sequencher* dan *MEGA-11* telah digunakan untuk menyaring kehadiran SNP bagi kesemua 20 sampel yang telah berjaya diamplifikasi. Kedua-dua SNP dikesan pada posisi 120 (SNP#120) dan posisi 141 (SNP#141). Rajah 1 menunjukkan kedudukan SNP #120 dan #141 pada perisian *MEGA-11*. Jadual 1 menunjukkan bilangan SNP yang berjaya disaring dari sampel mengikut negeri.



Rajah 1. Saringan kehadiran SNP #120 dan #141 menggunakan *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA-11)*

Jadual 1

Bilangan SNP yang berjaya disaring dari sampel mengikut negeri

Negeri	SNP #120			SNP #141		
	CC	GG	CG	GG	AA	GA
Pahang	7	1	2	7	1	2
Melaka	6	1	3	6	1	3

3.2 Analisis Frekuensi Alel dan Genotip

Berdasarkan kajian ini, terdapat trend yang sama pada frekuensi genotip dan alel bagi sampel mengikut negeri dan juga mengikut baka lembu yang dikaji pada SNP #120 dan SNP #141. Jadual 2 menunjukkan frekuensi bagi alel dan genotip pada SNP #120 dan SNP #141 bagi sampel mengikut negeri manakala jadual 3 menunjukkan frekuensi bagi alel dan genotip pada SNP #120 dan SNP #141 bagi sampel mengikut baka lembu.

Jadual 2

Frekuensi bagi alel dan genotip pada SNP #120 dan SNP #141 bagi sampel mengikut negeri

Negeri	SNP #120			SNP #141						
	Frekuensi genotip			Frekuensi alel		Frekuensi genotip			Frekuensi alel	
	CC	GG	CG	C	G	GG	AA	GA	G	A
Pahang	0.7	0.1	0.2	0.8	0.2	0.7	0.1	0.2	0.8	0.2
Melaka	0.6	0.1	0.3	0.75	0.25	0.6	0.1	0.3	0.75	0.25

Jadual 3

Frekuensi bagi alel dan genotip pada SNP #120 dan SNP #141 bagi sampel mengikut baka lembu

Baka	SNP #120					SNP #141					
	Frekuensi genotip			Frekuensi alel		Frekuensi genotip			Frekuensi alel		
	CC	GG	CG	C	G	GG	AA	GA	G	A	
Australian Friesian Sahiwal	0.7	0.1	0.2	0.8	0.2	0.7	0.1	0.2	0.8	0.2	
Jersey	0.6	0.2	0.2	0.7	0.3	0.6	0.2	0.2	0.7	0.3	
Campuran	0.6	0	0.4	0.8	0.2	0.6	0	0.4	0.8	0.2	

Brym *et al.*, [15] telah melakukan penyaringan SNP dalam gen *PRL* pada kawasan ekson 4 yang melibatkan sebanyak 186 sampel lembu baka Holstein Friesian dan 136 sampel lembu baka Jersey. Hasil saringan pada sampel lembu baka Holstein Friesian telah menunjukkan nilai frekuensi yang tinggi bagi alel G (0.887) berbanding alel A (0.113). Dapatan kajian Brym *et al.*, [14] ini adalah sama dengan kajian ini iaitu frekuensi alel G (0.8) adalah lebih tinggi berbanding alel A (0.2). Perbezaan ini mungkin boleh dikaitkan dengan penggunaan baka yang berbeza iaitu Holstein Friesian dan Australian Friesian Sahiwal (AFS). Walau bagaimanapun, perlu diambil kira bahawa kedua-dua kajian ini mempunyai baka asas iaitu Friesian yang sememangnya diketahui mempunyai penghasilan susu yang tinggi. Menurut Brym *et al.*, [15], lembu baka Holstein Friesian yang menunjukkan kehadiran genotip AG akan menghasilkan susu dengan kuantiti yang banyak manakala lembu dengan kehadiran genotip GG akan menghasilkan lemak susu yang tinggi. Di dalam kajian ini, frekuensi genotip GG bagi baka Australian Friesian Sahiwal adalah yang tertinggi iaitu 0.07 dan ini boleh memberi gambaran awal berkenaan penghasilan lemak susu yang tinggi dalam populasi lembu di Pahang. Penternak boleh melakukan pemilihan ke atas lembu yang mempunyai genotip GG sekiranya penternak berkeperluan untuk mendapatkan susu dengan kandungan lemak yang tinggi.

Baka lembu Jersey tidak dapat dibandingkan secara langsung kerana dapatan hasil kajian ini berbeza dengan kajian lepas. Hasil saringan bagi sampel baka Jersey menunjukkan nilai frekuensi yang tinggi bagi alel A (0.706) berbanding alel G (0.294). Dapatan kajian Brym *et al.*, [15] ini adalah tidak sama dengan kajian ini iaitu frekuensi alel A (0.3) adalah lebih rendah berbanding alel G (0.7). Bagi baka campuran pula tiada kajian yang dilakukan ke atas baka ini dan pihak penternak juga tidak begitu pasti dengan asal usul baka campuran ini. Namun, hasil perbandingan kajian lepas dan kajian ini dapat membantu dan memberikan gambaran kepada pihak penternak untuk memilih lembu

tenusu yang sesuai dikacuk dan melakukan pembiakbakaan lembu mengikut keinginan jenis susu yang ingin dihasilkan dan dijual.

4. Kesimpulan

Objektif kajian ini iaitu untuk menyaring SNP dalam gen *PRL* pada lembu tenusu di Melaka dan Pahang yang boleh digunakan sebagai penanda genetik untuk pembiakbakaan telah dicapai. Saringan SNP dalam gen ini berjaya menemukan dua SNP pada kedudukan yang berlainan iaitu pada #120 dan #141. Kedua-dua SNP tersebut juga mempunyai frekuensi alel yang berbeza. Alel C banyak dikesan pada SNP #120 bagi sampel dari kedua-dua negeri dengan nilai frekuensi sebanyak 0.8 (Pahang) dan 0.75 (Melaka) berbanding alel G iaitu 0.2 (Pahang) dan 0.25 (Melaka). Seterusnya, alel G banyak dijumpai pada SNP #141 dengan nilai frekuensi 0.8 (Pahang) dan 0.75 (Melaka) berbanding dengan alel A dengan nilai frekuensi 0.2 (Pahang) dan 0.25 (Melaka).

Penghargaan

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada semua yang terlibat dalam kajian ini.

Rujukan

- [1] Haug, Anna, Arne T. Høstmark, and Odd M. Harstad. "Bovine milk in human nutrition—a review." *Lipids in health and disease* 6 (2007): 1-16. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>
- [2] Willett, Walter C., and David S. Ludwig. "Milk and health." *New England Journal of Medicine* 382, no. 7 (2020): 644-654. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1903547>
- [3] OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032. OECD Agricultural Outlook /OECD-FAO Agricultural Outlook, 2023.
- [4] Jabatan Perkhidmatan Veterinar. Pelan Strategik Pembangunan Industri Tenusu Negara 2021-2025. Kementerian Pertanian dan Industri Makanan (2021).
- [5] Lalhruaitluangi, Lalhruaitluangi, Chukham Gohain, Keyolenu Yore, N. Shyamsana Singh, Prava Mayengbam, and T. C. Tolengkomba. "Prolactin gene polymorphism in indigenous and crossbred cattle of north east India." *The Indian Journal of Animal Sciences* 89, no. 2 (2019): 212-214. <https://doi.org/10.56093/ijans.v89i2.87344>
- [6] Le Provost, Fabienne, Christine Leroux, Patrice Martin, Pierre Gaye, and Jean Djiane. "Prolactin gene expression in ovine and caprine mammary gland." *Neuroendocrinology* 60, no. 3 (1994): 305-313. <https://doi.org/10.1159/000126763>
- [7] Bangar, Yogesh C., A. Magotra, C. S. Patil, and N. Jindal. "Meta-analysis of genetic structure and association of prolactin gene with performance traits in dairy cattle in India." *Biochemical genetics* 59 (2021): 668-677. <https://doi.org/10.1007/s10528-021-10031-4>
- [8] Das, N. D., Devrao Nagorao Hatkar, VG Sri Hari, B. V. Srinivas, R. Kaliaperumal, Obi A. Reddy, and L. Krishnamurthy. "Genetic polymorphisms of exons 3 and 4 of prolactin (PRL) gene in Deoni cattle breed and their association with milk production traits." *Int. J. Livest. Res* 2, no. 3 (2012): 120-126.
- [9] Alfonso, Edy, Reyna Rojas, José G. Herrera, María E. Ortega, Clemente Lemus, César Cortez, Jaime Ruiz, René Pinto, and Heriberto Gómez. "Polymorphism of the prolactin gene (PRL) and its relationship with milk production in American Swiss cattle." *African Journal of Biotechnology* 11, no. 29 (2012).
- [10] Lü, Aijun, Xiucai Hu, Hong Chen, Jihong Jiang, Chunlei Zhang, Haixia Xu, and Xueyuan Gao. "Single nucleotide polymorphisms in bovine PRL gene and their associations with milk production traits in Chinese Holsteins." *Molecular Biology Reports* 37 (2010): 547-551. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9762-5>
- [11] Ozmen, O., and S. Kul. "Identification of novel SNPs of ovine PRL gene and their association with milk production traits." *Russian Journal of Genetics* 52 (2016): 977-984. <https://doi.org/10.1134/S1022795416090118>
- [12] Dwiningsih, Yheni, Miranti Rahmaningsih, and Jawaher Alkahtani. "Development of single nucleotide polymorphism (SNP) markers in tropical crops." *Advance Sustainable Science, Engineering and Technology* 2, no. 2 (2020): 343558. <https://doi.org/10.26877/asset.v2i2.6279>
- [13] Brody, T. "Chapter 19—Biomarkers." *Clinical Trials (Second Edition)*; Brody, T., Ed.; Academic Press: Boston, MA, USA (2016): 377-419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804217-5.00019-9>
- [14] Samuel, Behailu, Hailu Dadi, Genet Dejene, Mingue Kang, Chankyu Park, and Hunduma Dinka. "Single nucleotide polymorphisms within exon four of the prolactin gene and their effect on milk traits in cattle populations of Ethiopia." *Animal Biotechnology* 34, no. 9 (2023): 4634-4644. <https://doi.org/10.1080/10495398.2023.2176867>

- [15] Brym, Pawel, Stanisław Kamiński, and Elzbieta Wójcik. "Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits." *Journal of Applied Genetics* 46, no. 2 (2005): 179-185.