

Analisis Keragaman Gen Laktoferin Pada Sapi Friesian-Holstein Dengan Metode Pcr-Rflp

(Polymorphism analysis of lactoferrin gene on holstein-friesian cow with PCR-RFLP method)

Elmy Mariana¹

¹Fakultas Pertanian, Jurusan Peternakan, Universitas Syiah Kuala

ABSTRACT The purposes of this study were to identify the polymorphism of the lactoferrin gene in Holstein-Friesian (HF) cows. The study was conducted on 281 heads of HF lactating cows coming from dairy farmers in Lembang district.

Investigation on variant genotypes of the lactoferrin gene used PCR-RFLP method. Genotyping of the lactoferrin gene with *EcoRI* restriction enzyme produced two genotypes, i.e. AA (65.5%) and AB (34.5%) genotypes.

Key words: polymorphism, lactoferrin gene, PCR-RFLP

2011 Agripet : Vol (11) No. 1: 15-21

PENDAHULUAN

Laktoferin merupakan komponen protein susu yang berfungsi mengurangi kejadian mastitis (Nibbering *et al.*, 2001), protein tersebut disintesis oleh sel granulosit dan sel epitel kelenjar susu sebagai respon terhadap infeksi misalnya mastitis (Kaminski *et al.*, 2006). Laktoferin merupakan polipeptida rantai tunggal, glikoprotein pengikat zat besi dengan berat 80 kDa dan merupakan anggota dari keluarga gen transferin. Selain terdapat dalam susu dan kolostrum, laktoferin juga dapat ditemukan pada neutrofil, ginjal, sel epitelial, dan pada cairan mukosa, seperti: saliva, air mata, sekresi usus kecil, sekresi vagina dan lain-lain. Beberapa laporan menyebutkan aktivitas antibakterial laktoferin baik pada penelitian *in vitro* maupun *in vivo* (Arnould *et al.*, 2009; Nibbering *et al.*, 2001; Pawlik *et al.*, 2009, Wakabayashi *et al.*, 2006). Sifat bakterisidal laktoferin diduga dihasilkan oleh daerah kation pada lobus N dari laktoferin yang menyebabkan kerusakan pada membran luar bakteri (Connely 2001; Li *et al.* 2004; Teng, 2002; Wakabayashi *et al.*, 2006). Laktoferin dapat berinteraksi dengan lipida A dari LPS yang terdapat pada membrane bakteri. Hal ini menyebabkan ketidakstabilan

pada membran bakteri gram negatif karena terjadi pemblokiran interaksi antara LPS dengan signal LPS (CD 14) (Baveye *et al.*, 1999; Rainard *et al.*, 2006). Lebih lanjut Connely (2001) menyatakan bahwa laktoferin merupakan protein multi fungsi seperti membantu penyerapan zat besi di usus, pertumbuhan sel usus, melindungi dari serangan mikroba penyebab infeksi dan sebagai sistem kekebalan tubuh. Protein multifungsi ini merupakan kunci pada kesehatan kelenjar susu sehingga potensial untuk digunakan sebagai kandidat gen pada seleksi resistensi sapi perah terhadap mastitis (Seyfert *et al.*, 1996, Wojdak-Maksymiec *et al.*, 2006).

Gen laktoferin terletak pada kromosom 22 (22q24). Struktur gen laktoferin terdiri atas 17 exon dan 16 intron. Total basa pada gen laktoferin sapi adalah 13647 pb. Panjang total exon, total intron dan daerah promotor gen laktoferin secara berurutan adalah 2339 pb, 8064 pb dan 1122 bp (Schanbacher *et al.*, 1993; Seyfert *et al.*, 1994). Dari exon 2 sampai 4 dan dari exon 9 sampai 12 mengkodekan domain globular pertama pada masing-masing lobe, sedangkan dari exon 12 sampai 15 mengkodekan globular yang lainnya. Sedangkan asam amino yang membentuk

Corresponding author: elmy_mariana@yahoo.com

daerah *Hinge* dikodekan pada awal exon 9 (Seyfert *et al.*, 1994).

Telah banyak polimorfisme yang ditemukan pada gen laktoferin baik pada daerah exon, intron maupun daerah UTR (Seyfert *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2004; Kamiński *et al.*, 2006). Lebih lanjut dilaporkan bahwa polimorfisme pada daerah pengaturan memiliki pengaruh pada ekspresi gen. Seyfert dan Kühn (1994) mendeteksi adanya 6 polimorfisme pada daerah UTR'5 dan 1 polimorfisme pada exon 1. Li *et al.* (2004) menemukan 6 SNP yang lainnya yaitu: 1 pada exon 4, 1 pada intron 4, 1 pada exon 8, 2 pada exon 9 dan 1 pada exon 15. Polimorfisme pada posisi +32 (G/C) memiliki peranan penting pada determinasi kandungan dan kualitas protein susu, tetapi tidak memiliki hubungan dengan jumlah sel somatik susu (Kamiński *et al.*, 2006). Lebih lanjut Kamiński *et al.* (2006) menyebutkan bahwa alel G berhubungan dengan ekspresi laktoferin yang rendah dan daerah promoter berhubungan erat dengan rendahnya jumlah sel somatik susu, sebaliknya alel C berkaitan dengan peningkatan kadar laktoferin dalam susu yang menyebabkan sistem pertahanan tubuh yang lebih baik. Laporan terbaru dari Kamiński *et al.* (2008) menyatakan bahwa kadar protein susu yang lebih tinggi memiliki kaitan yang erat dengan polimorfisme pada posisi +216. Boichard *et al.* (2003) melaporkan adanya hubungan antara polimorfisme pada gen laktoferin dengan kadar lemak susu, sedangkan Ashwell *et al.* (2004) melaporkan mengenai hubungan polimorfisme laktoferin dengan kadar lemak susu dan jumlah sel somatik susu. Harder *et al.* (2006) juga mendeteksi adanya persistensi kadar lemak dan kadar protein susu yang berhubungan dengan gen laktoferin pada sapi perah Holstein di negara Jerman. Sequen gen laktoferin dari *Gen Bank* menunjukkan fragmen dimana mutasi terjadi, dimana titik mutasi tersebut dikenali oleh enzim restriksi *EcoRI*. Pada fragmen gen laktoferin lokus *EcoRI* ditemukan dua alel yaitu alel A dan alel B yang mengkodekan tiga kemungkinan genotipe yaitu genotipe AA, AB dan BB (Klussmann and Seyfert, 1995; Seyfert and Kuhn, 1994; Wojdak-Maksymiec *et al.*, 2006). Alel A memiliki frekuensi 0.755 dan alel B 0.245 (Seyfert and Kuhn, 1994). Akan

tetapi tidak ada konsistensi hasil diantara penelitian-penelitian mengenai kontrol gen laktoferin lokus *EcoRI* terhadap angka somatik sel yang menjadi salah satu indikator mastitis.

Berdasarkan paparkan di atas, telah banyak penelitian mengenai polimorfisme gen laktoferin. Akan tetapi belum pernah ada publikasi mengenai polimorfisme gen laktoferin pada ternak di Indonesia, khususnya pada sapi perah. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi polimorfisme gen laktoferin pada sapi perah Friesian-Holstein (FH) pada beberapa lokasi sentra produksi susu di kabupaten Lembang, Jawa Barat.

MATERI DAN METODE

Sampel darah berasal dari 281 sapi FH laktasi padatiga lokasi peternakan di daerah Lembang. Sampel darah diambil dari bagian vena jugularis dengan menggunakan jarum *vaccutainer* no. 21 G dan disimpan dalam tabung *vaccutainer* 10 ml dengan alkohol 96% sebagai preservasi.

Ekstraksi DNA dan PCR

Isolasi DNA dilakukan dari darah dan dari sel somatik susu. Isolasi DNA dari sampel darah dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi *phenol-chloroform* (Sambrook *et al.*, 1989) yang telah dimodifikasi untuk sampel darah yang disimpan dalam alkohol. Isolasi DNA dari sampel susu dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi DNA dari sel somatik (Arnould *et al.*, 2009).

Proses amplifikasi gen menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). DNA hasil ekstraksi digunakan untuk amplifikasi ruas gen target laktoferin sepanjang 301 pb. Pereaksi yang akan digunakan untuk amplifikasi ruas gen target adalah 50 ng template DNA, 1×buffer (Tris-HCl 100 mmol/L, pH 8.3; KCl 500 mmol/L), 0.25 µmol/L primers, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.25 mmol/L dNTPs, dan 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Vivantis) dan bufernya dalam larutan total 25 µl. Amplifikasi *in vitro* dengan mesin *thermal cycler* dilakukan dengan kondisi denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 5 menit, 35 siklus yang terdiri dari denaturasi

pada suhu 94 °C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 60°C selama 1 menit. *Elongasi* pada suhu 72 °C selama 1 menit, dan *elongasi* akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit. Sequen primer yang digunakan untuk amplifikasi ruas gen laktoferin mengacu pada Wojdak-Maksymiec (2006). Fragmen gen hasil amplifikasi divisualisasikan pada gel agarose 1.5% dengan bufer 0,5x TBE (trisborat EDTA) yang dijalankan pada tegangan 100 v selama 40 menit dan diwarnai dengan etidiumbromida diatas UV trans iluminator.

PCR-RFLP

Identifikasi polimorfisme gen laktoferin menggunakan metode Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Enzim pemotong (*restrictionenzyme*) yang digunakan adalah *EcoRI* dengan situs pengenalan basa G↓AATTC. Digesti enzimatis dilakukan pada suhu 37°C selama 18 jam. Hasil digesti disepari pada gel pada gel agarose 2% dengan buffer 0,5x TBE (trisborat EDTA). Seluruh reaksi PCR dilakukan pada mesin *Esco Thermal Cycler*.

Analisis Statistik

Keragaman gen dapat ditentukan dengan analisis frekuensi alel, frekuensi genotipe dan nilai heterozigositas, sedangkan keseimbangan genotipe dapat dilihat melalui keseimbangan proporsi Hardy-Weinberg. Frekuensi alel dari masing-masing lokus dapat diperkirakan dengan menghitung jumlah gen pada populasi. Menurut Nei (1987) Jika n_{ii} adalah individu yang bergenotipe A_iA_i , n_{ij} adalah individu yang bergenotipe A_iA_j , dan jumlah total sampel adalah n , maka frekuensi alel A_i (χ_i) dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\chi_i = \frac{(n_{ii} + n_{ij})}{n}$$

Frekuensi genotipe dapat diperkirakan dengan menghitung perbandingan jumlah genotipe pada populasi. Dengan menggunakan asumsi sebelumnya, maka frekuensi genotipe A_iA_i (χ_{ii}) dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\chi_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Keterangan :

χ_i = frekuensi alel ke-i

n_{ij} = jumlah individu yang bergenotipe ij

n_{ii} = jumlah individu yang bergenotipe ij

n = jumlah sampel

Derajat heterozigositas ($\hat{h}$) dihitung berdasarkan frekuensi alel pada tiap lokus DNA dengan rumus Nei (1987) :

$$\hat{h} = 2n (1 - \sum \chi_i^2) / (2n - 1)$$

Keterangan :

χ_i = frekuensi alel

$\hat{h}$ = nilai heterozigositas lokus

Proporsi Hardy-Weinberg dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Keterangan :

χ^2 = nilai *chi-square* uji

O = jumlah pengamatan genotipe ke-i

E = jumlah harapan genotipe ke-i

Hasil penghitungan keragaman genetic diolah dengan Program statistic TFPGA - Tools for Population Genetic Analysis (Miller, 1997).

HASIL DAN PEMBAHASAN

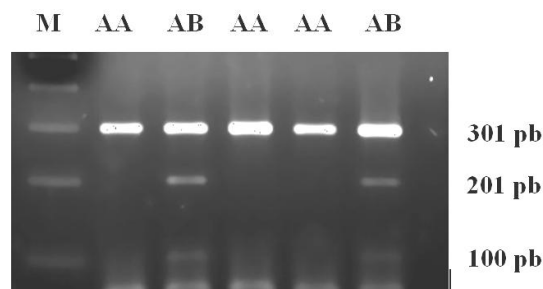
Amplifikasi dan Identifikasi Gen laktoferin

Amplifikasi ruas gen laktoferin dilakukan pada mesin *thermal cycler* (ESCO) dengan suhu *annealing* 60°C. Panjang gen laktoferin yang teramplifikasi dalam penelitian adalah 301 pb sebagaimana panjang ruas DNA yang diapit oleh primer pada sekuen gen laktoferin (nomor akses *gen bank* AH000852S03 dan BOVLACTER).

Identifikasi keragaman gen laktoferin intron 6 pada sapi perah FH dengan enzim restriksi *EcoRI* mengenali situs pemotongan G↓AATTC (Seyfert *et al.*, 1994). Pada kerbau keragaman gen laktoferin disebabkan oleh adanya mutasi yang terjadi pada posisi basa ke 3481. Terjadinya mutasi dari C menjadi T menyebabkan sitosin berubah menjadi timin sehingga situs pemotongan untuk enzim restriksi *EcoRI* berubah.

Pemotongan gen laktoferin dengan enzim *EcoRI* menghasilkan genotipe AA, AB dan BB. Gen laktoferin genotipe BB dan AB

ditunjukkan pola dimerik (dua dan tiga pita) dan genotipe AA ditunjukkan oleh pola monomerik (pita tunggal) (Gambar 1). Alel AA memiliki panjang fragmen 301 (tidak terpotong), alel BB panjang fragmen 100 dan 201. Sedangkan fragmen alel AB merupakan gabungan dari ketiganya (100, 201 dan 301) (Seyfert *et al.*, 1994; Wojdak-Maksymiec 2006). Pola pemotongan fragmen genotip laktoferin hasil penelitian ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Visualisasi hasil elektroforesis gen laktoferin produk *EcoRI* pada gel agarose 2%. M adalah Marker 100 bp. AA dan AB adalah varian genotipe gen laktoferin lokus *EcoRI*.

Frekuensi Genotipe dan Frekuensi Alel Gen Laktoferin

Polimorfisme atau keragaman genetik dapat diketahui berdasarkan analisis frekuensi alel dan frekuensi genotipe. Frekuensi genotipe dan frekuensi alel diperoleh dari hasil genotyping 281 sampel. Frekuensi genotipe dan frekuensi alel dari gen laktoferin lokus *EcoRI* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Frekuensi genotipe dan frekuensi alel gen laktoferin pada sapi perah FH.

Peternakan	Jumlah Sampel	Frekuensi Genotipe			Frekuensi Alel	
		AA	AB	BB	A	B
Cilumber	98	0.612	0.388	0	0.806	0.194
Pasar Kemis	95	0.737	0.263	0	0.868	0.132
BPPT-Cikole	88	0.614	0.386	0	0.807	0.193
Total	281	0.655	0.345	0	0.827	0.173

Digesti gen laktoferin dengan enzim restriksi *EcoRI* menghasilkan dua alel yaitu alel A dan alel B. Dari tabel dapat dilihat bahwa sapi perah FH yang diteliti memiliki dua genotipe, yaitu genotipe AA (65.5%) dan genotipe AB (34.5%). Pada sapi perah yang

diteliti, tidak ditemukan individu yang memiliki genotipe BB. Di antara ketiga lokasi pengambilan sampel, frekuensi genotipe AA lebih tinggi dari pada frekuensi genotipe AB. Melalui pengujian χ^2 diketahui perbedaan yang signifikan ($P < 0.01$) diantara frekuensi genotipe AA dan AB di kedua lokasi pengambilan sampel. Hasil yang berbeda dilaporkan oleh Sender *et al.* (2006), Wodjak-Maksymiec (2006) dan Zhao *et al.* (2008) yang memperoleh tiga genotipe (AA, AB dan BB) dari hasil pemotongan gen laktoferin lokus *EcoRI* pada sapi perah FH. Lebih lanjut Wodjak-Maksymiec (2006) melaporkan frekuensi genotipe AA, AB and BB secara berurutan adalah 37.90%, 59.68% dan 2.42%. Sender (2006) juga melaporkan bahwa frekuensi genotipe BB sangat rendah yaitu 4%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa distribusi diantara alel A dan alel B disemua lokasi pengambilan sampel bervariasi. Ini menunjukkan bahwa gen laktoferin lokus *EcoRI* pada sapi perah FH bersifat beragam/polimorfis.

Derajat Heterozigositas

Derajat heterozigositas merupakan rataan persentase lokus heterozigosit tiap individu atau rataan persentase individu heterozigot dalam populasi (Nei dan Kumar, 2000). Nilai heterozigositas dari gen laktoferin disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai heterozigositas ($\hat{h}$) dan proporsi Hardy-Weinberg berdasarkan tes *Chi-Square* gen laktoferin lokus *EcoRI* pada peternakan yang berbeda.

Peternakan	Jumlah Sampel	$\hat{h}$	Frekuensi Genotipe Laktoferin			df	χ^2 Chi-square	P
			AA (O/E)	AB (O/E)	BB (O/E)			
Cilumber	98	0.3126	60/63.6837	38/30.6327	0/3.6837	2	5.6686	0.0782
Pasar Kemis	95	0.2285	70/71.6447	25/21.7105	0/1.6447	2	2.1809	0.5440
BPPT-Cikole	88	0.3117	54/57.2841	34/27.4318	0/3.2841	2	5.0450	0.0843
Total	281	0.2856	184/192.3710	97/80.2580	0/8.3710	2	12.2277	0.0005

Keterangan :

O = Frekuensi observasi

E = Frekuensi harapan.

Nilai heterozigositas dari masing-masing populasi berkisar antara 0,2285 – 0,3126. Pada peternakan rakyat di desa Cilumber diperoleh nilai heterozigositas

tertinggi, sedangkan pada peternakan rakyat di desa Pasar Kemis diperoleh yang terendah. Nilai heterozigositas pada keseluruhan peternakan adalah 0.2856. Hasil menunjukkan bahwa nilai heterozigositas di keseluruhan populasi rendah, karena menurut Javanmard *et al.* (2005) nilai heterozigositas di bawah 0.50 mengindikasikan rendahnya variasi suatu gen dalam populasi.

Semakin tinggi derajat heterozigositas suatu populasi maka daya tahan hidup populasi tersebut akan semakin tinggi dan seiring dengan menurunnya derajat heterozigositas akibat dari silang dalam dan fragmentasi populasi maka sebagian besar alel resesif yang bersifat *lethal* semakin meningkat frekuensinya (Avisé, 1994). Pada seleksi ternak diharapkan nilai heterozigositas yang tinggi karena nilai heterozigositas mencerminkan variasi suatu gen dalam populasi. Semakin tinggi nilai heterozigositas dalam populasi maka semakin besar peluang untuk melakukan seleksi pada populasi tersebut.

Proporsi Hardy-Weinberg

Hukum keseimbangan Hardy-Weinberg menyatakan bahwa frekuensi alel dan frekuensi genotipe dalam suatu populasi yang cukup besar akan tetap konstan dari satu generasi ke generasi jika dalam populasi tersebut terjadi perkawinan secara acak (*random mating*), tidak ada seleksi, mutasi, migrasi dan *genetic drift* (Blott *et al.*, 1998, Noor, 2004). Proporsi Hardy-Weinberg dihitung berdasarkan perbedaan frekuensi genotipe pengamatan dengan frekuensi genotipe harapan. Hasil pengujian proporsi Hardy-Weinberg dari gen laktoferin disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil pengujian proporsi Hardy-Weinberg didapatkan bahwa frekuensi genotipe gen laktoferin lokus *EcoRI* pada gabungan dua kondisi pemeliharaan dalam keadaan tidak seimbang ($\chi^2 = 12.2277$, $df = 2$, $P = 0.0005$). Seleksi dan sistem perkawinan yang tidak dilakukan secara acak merupakan salah satu faktor yang dapat mengubah keseimbangan dalam populasi secara cepat, hal ini umumnya terjadi pada populasi sapi perah. Pada populasi sapi perah terjadi proses seleksi secara terus menerus yang bertujuan

untuk meningkatkan produksi dan kualitas susu. Proses perkawinan ternak perah mengaplikasikan kawin buatan (Inseminasi buatan) dengan menggunakan sperma dari pejantan unggul tertentu sehingga tidak terjadi perkawinan secara acak (*random mating*). Noor (2004) melaporkan bahwa suatu populasi dinyatakan dalam keadaan keseimbangan Hardy-Weinberg, jika frekuensi genotipe (p^2 , $2pq$, q^2) dan frekuensi alel (p dan q) konstan dari generasi ke generasi. Pada satu populasi, jika terjadi akumulasi genotipe, populasi yang terbagi, mutasi, seleksi, migrasi, perkawinan dalam kelompok/ populasi yang sama (endogami) dan perkawinan yang tidak acak maka dapat menimbulkan terjadinya ketidakseimbangan frekuensi genotipe atau frekuensi alel dalam populasi tersebut. Blott *et al.* (1998) menambahkan bahwa silang dalam dan silang luar juga mempengaruhi frekuensi genotipe.

Hasil pengujian proporsi Hardy-Weinberg pada masing-masing peternakan menunjukkan bahwa frekuensi genotipe gen laktoferin lokus *EcoRI* pada setiap peternakan dalam keadaan seimbang. Hal ini berbeda jika dibandingkan dengan kondisi yang tidak seimbang pada keseluruhan data. Perbedaan keseimbangan Hardy-Weinberg ini terjadi karena jumlah sampel yang terbatas pada setiap peternakan (jumlah sampel dari BPPT Cikole 88 ekor, dari peternakan rakyat desa Cilumber 98 ekor dan dari peternakan rakyat desa Pasir Kemis 95 ekor). Falconer dan Mackay (1996) menyatakan bahwa ukuran populasi sampel mempengaruhi keseimbangan frekuensi genotipe dari generasi ke generasi, sedangkan Miller (1997) menyatakan bahwa jumlah sampel yang terbatas akan menyebabkan rendahnya tingkat kepekaan pada pengujian proporsi Hardy-Weinberg dengan menggunakan metode *chi-square* sehingga hasil yang diperoleh bersifat bias.

KESIMPULAN

Genotiping gen laktoferin lokus *EcoRI* menghasilkan dua varian genotipe yaitu AA dan AB dengan frekuensi genotipe AA lebih tinggi (65.5%) dari pada AB (34.5%). Nilai heterozigositas atau persentase lokus

heterozigot dalam populasi adalah 0.2856. Ini menunjukkan bahwa gen laktoferin lokus *EcoRI* pada sapi perah FH di daerah kabupaten Lembang Jawa barat bersifat beragam/polimorfis.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashwell, M. S., Heyen, D.W., Sonstegard, T.S., Van Tassel, C.P., Da, Y., Van Raden, P.M., Ron, M., Weller, J.I., Lewin, H.A., 2004. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproduction traits in holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 87: 468–475.
- Arnould, V. M.R., Soyeurt, H., Gengler, N., Colinet, F.G., Georges, M.V., Bertozzi, C., Portetelle, D., Renaville, R., 2009. Genetic analysis of lactoferrin content in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 92: 2151–2158.
- Awise, J. C., 1994. *Molecular Markers. Natural History Evolution.* Chapman and Hall, Inc., Washington.
- Baveye, S., Ellass, E., Mazurier, J., Spik, G., Legrand, D., 1999. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37: 281–286.
- Blott, S. C., Williams, J.L., Haley, C.S., 1998. Genetic relationships among european cattle breeds. *Anim. Gen.* 29:273–282.
- Boichard, D., Grohs, C., Bourgeois, F., Cerqueira, F., Faugeras, R., Neau, A., Rupp, R., Amigues, Y., Boscher, M.Y., Levéziel, H., 2003. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 35: 77–101.
- Connely, O.M., 2001. Anti inflammatory activities of lactoferrin. *J. Am. Coll. Nutr.* 20(5): 389–395s.
- Falconer, D. S., Mackay, T.F.C., 1996. *Introduction to Quantitative Genetics.* 4th Ed. Longman. Inc., New York.
- Harder, B., Bennewitz, J., Reinsch, N., Thaller, G., Thomsen, H., Kühn, C., Schwerin, M., Erhardt, G., Förster, M., Reinhardt, F., Kalm, E., 2006. Mapping of quantitative trait loci for lactation persistency traits in german holstein dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 123:89–96.
- Javanmard, A., Asadzadeh, N., Banabazi, M.H., Tavakolian, J., 2005. The allele and genotype frequencies of bovine pituitary specific transcription factor and leptin genes in Iranian cattle and buffalo populations using PCR-RFLP. *Iran J. Biotech.* 39:2.
- Kamiński S., Malewski, T., Ahman, A., Wójcik, E., Ruś, A., Oleński, K., Jakubczak, A., Sazanov, A.A., 2008. Towards an integrated approach to study SNPs and expression of candidate genes associated with milk protein biosynthesis. *Russian J. Genet.* 44:459 - 465.
- Kamiński S., Oleński, K., Brym, P., Malewski, T., Sazanov, A.A., 2006. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the lactoferrin gene and its associations with milk performance traits in polish holstein-friesian cows. *Russian J. Genet.* 42:924–927.
- Klussmann, U., Seyfert, H.M., 1995. Genetische Varianten des Bovine Laktoferrins, einem Kandidatengen für Mastitisresistenz. *Vortragstagung der DGfZ/GfT, Hannover.*
- Li, G.H., Zhang, Y., Sun, D.X., Li, N., 2004. Study on the polymorphism of bovine lactoferrin gene and its relationship with mastitis. *Anim. Biotech.* 15: 67–76.
- Miller, M.P., 1997. *Tools for Population Genetics Analyses (TFPGA): a Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data.* <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press, New York.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford University Press, New York.

- Nibbering, P. H. E., Ravensbergen, M.M., Welling, L.A., Van Berkel, P., Van Berkel, H., Pauwels, K., Nuijens, J.H., 2001. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infect. Immun.* 69:1469–1476.
- Pawlik, A., Sender, G., Kossakowska, A.K., 2009. Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance – a review. *Anim. Sci. Papp. Reprod.* 27:263–271.
- Rainard, P., Riollot, C., 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37:369–400.
- Sambrook, J., Fritsch, F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schanbacher, F.L., Goodman, R.E., Tallhouk, R.S., 1993. Bovine mammary lactoferrin : implication from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *J. Dairy. Sci.* 76:3812–3831.
- Sender, G., Korwin-Kossakowska, A., Galal, K., Prusak, B.B., 2006. Ocenawpływupolimorfizmuwybranych genównawystępowanie mastitis u krów in polish. *Med. Wet.* 62: 563–565.
- Seyfert, H. M., Henke, M., Interthal, H., Klusmann, H., Koczan, D., Natour, S., Pusch, W., Senft, B., Steinhoff, U.M., Tuckoricz, A., Hobom, G., 1996. Defining candidate genes for mastitis resistance in cattle: the role of lactoferrin and lysozyme. *J. Anim. Breed. Genet.* 113:269–276.
- Seyfert, H. M., Kuhn, C., 1994. Characterization of a first bovine lactoferrin gene variant, based on an EcoRI polymorphism. *Anim. Gen.* 25: 54.
- Seyfert, H. M., Tuckoricz, A., Intertahl, H., Koczan, D., Hobom, G., 1994. Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter. *Anim. Genet.* 143: 265–269.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Takase, M., 2006. Lactoferrin research, technology and applications. *Int. Dairy. J.* 6:1241–1251.
- Wojdak-Maksymiec, K., Kmiec, M., Ziemak, J., 2006. Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. *Vet. Med.* 51:14–20.
- Zhao, C. H., He, G.M., Wang, Y.L., Zhang, Z.X., 2008. Polymorphism analysis of the promoter of cow lactoferrin gene with PCR-RFLP and its correlation with subclinical mastitis. *Acta Agricultur. Slovea.* 92:185–187.

