



УДК 636.2.034

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА β -КАЗЕИНА В СЕЛЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МОЛОЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ

КОВАЛЮК Н.В.¹, доктор биологических наук

САЦУК В.Ф.², МАЧУЛЬСКАЯ Е.В.¹, кандидаты биологических наук

ШАХНАЗАРОВА Ю.Ю.¹

¹ФГБНУ «Краснодарский центр по зоотехнии и ветеринарии»

²ООО НПО «Юг-Плем»

Ген β -казеина (*CSN2*) представлен у крупного рогатого скота несколькими полиморфными вариантами, из которых чаще всего встречаются A_1 и A_2 . Из-за различной структуры белка молока коров, носителей генотипов A_1A_1 , A_1A_2 β -казеина при расщеплении такого молока ферментами желудочно-кишечного тракта образуется опиоидный пептид β -казоформин 7 (*BCM7*) в значительно большем количестве, чем при соответствующем расщеплении молока, содержащего фракцию β -казеина A_2 , полученного от коров с генотипом A_2A_2 . Предварительные исследования показывают, что *BCM7* оказывает негативное влияние на здоровье людей. На основе методов ПЦР/ПДРФ разработана тест-система для генотипирования по локусу β -казеина. При разработке дизайна праймеров, для создания сайта рестрикции в области искомого SNP, потребовалось введение в состав одного из праймеров нуклеотидной замены (G→C). В результате фрагменты, которые амплифицировались с фрагмента гена β -казеина варианта A_2 , расщеплялись эндонуклеазой — *BstDEI* (№ E227, НПО «СибЭнзим») на 2 фрагмента: 64 и 22 пн. Фрагмент, амплифицированный с аллеля A_1 , сайта рестрикции не имел (размер его составлял 86 пн). С использованием разработанной тест-системы проведено генотипирование выборки быков-производителей голштинской и айрширской пород ($n=65$), оценено влияние полиморфизма β -казеина на хозяйственно полезные признаки скота. Установлено, что и отечественные и зарубежные племенные предприятия обладают возможностями по поставке семени от быков с генотипами A_2A_2 β -казеина, а по ряду показателей индексной оценки быки с генотипом A_2A_2 оказались достоверно лучше производителей с генотипом A_1A_1 . Мировой опыт подсказывает, что закупочные цены на молоко A_2 выгодно отличаются от закупочных цен на обычное молоко. Таким образом, создание стад, производящих молоко A_2 , может значительно повысить прибыльность его производства и переработки, а также востребованность и безопасность молока и молочных продуктов.

Ключевые слова: β -казеин, генотип, частота встречаемости, продуктивность.

Мировые переработчики молока один за другим объявляют о выпуске нового продукта — молока A_2 . Так, новозеландская компания «*Fonterra*», самый крупный в мире экспортер молочных продуктов, в феврале 2018 года объявила о запуске проекта по производству A_2 молока, в этом же месяце об аналогичном запуске сообщила компания *Nestle* [<https://milknews.ru>].

Что такое молоко A_2 ? Это молоко, получаемое от коров — носителей генотипа A_2A_2 β -казеина (*CSN2*). При расщеплении ферментами желудочно-кишечного тракта молока, содержащего фракцию β -казеина A_1 , (полученного от коров с генотипом A_1A_1), образуется опиоидный пептид β -казоформин 7 (*BCM7*) в значительно большем количестве, чем при расщеплении молока, содержащего фракцию β -казеина A_2 , полученного

от коров с генотипом A_2A_2 .

Считается, что более высокий уровень *BCM7* (по эпидемиологическим данным из Новой Зеландии) связан с более высокими показателями смертности от ишемической болезни сердца, а также является возможной причиной неожиданного синдрома младенческой смерти. Кроме того, неврологические расстройства, такие как аутизм и шизофрения, как представляется, связаны с потреблением молока с более высоким уровнем *BCM7* [1].

В некоторых исследованиях приведены доказательства того, что молочный белок A_1 β -казеина коров является основным причинным триггером диабета типа 1 у людей с генетическими факторами риска [2]. При изучении патологической симптоматики после потребления



молока A_2 и A_1 группой взрослых людей с непереносимостью молока ($n=600$) установлены значительные различия для симптомов вздутия живота, боли в животе, частоты стула и консистенции стула в пользу употребления молока A_2 [3].

Исследование с аналогичными результатами было проведено ранее [4].

Следовые количества *BCM7* образуются и при переваривании женского молока в пищеварительном тракте младенцев. Установлено, что использование молока A_2 в рецептуре смесей для питания детей раннего возраста, значительно снижает концентрацию *BCM7* в единице объема продукции [5].

В России молоко и молочные продукты с β -казеином A_2 начали производить в Московской и Белгородской областях. Цена молока A_2 отличается от цены обычного молока более чем в 2 раза.

Таким образом, есть все основания полагать, что производство A_2 молока может быть выгодно и производителям и переработчикам, а так же многим потребителям, вынужденным отказываться в настоящее время от этого ценного продукта.

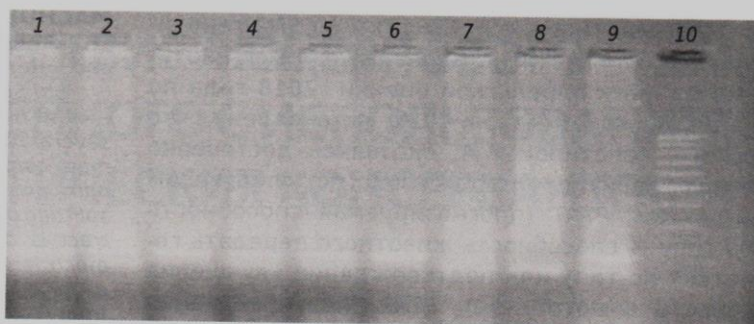
Производство A_2 молока включает ряд этапов, самым важным из которых является создание стад коров с генотипом A_2A_2 β -казеина.

Целью наших исследований была оценка перспектив использования полиморфизма локуса β -казеина в селекции крупного рогатого скота.

Для достижения поставленной цели потребовалось решение следующих задач: разработать тест-систему для генотипирования животных по локусу β -казеина, получить первичные данные о частотах встречаемости различных полиморфных вариантов локуса β -казеина у быков-производителей голштинской и айрширской пород, оценить возможное влияние *CSN2* генотипа на хозяйственно полезные признаки.

Материал и методы. Исследования проведены на базе лаборатории биотехнологии ФГБНУ «Краснодарский центр по зоотехнии и ветеринарии». Для выделения ДНК из спермы использовали наборы реагентов *Diatom™ DNA Prep 100* (ООО Лаборатория «Изоген», г. Москва). Выход ДНК составлял 3–5 мкг/100 мкл с OD 260/280 от 1,6 до 2,0.

Для постановки ПЦР реакции использовали наборы реагентов *Gene Pak PCR Core* (ООО Лаборатория «Изоген», г. Москва), праймеры были подобраны с использованием программы *Primer Premier*, условия амплификации — эмпирическим путем.



Электрофореграмма продуктов гидролиза амплификатов участка гена *CSN2* эндонуклеазой рестрикции *BstDEI*

1, 2, 4, 5, 9 — генотип A_1A_2

3, 6 — генотип A_1A_1

7, 8 — генотип A_2A_2

10 — маркер молекулярного веса

Для создания сайта рестрикции в области искомого *SNP* потребовалось введение в состав одного из праймеров нуклеотидной замены ($G \rightarrow C$). В результате фрагменты, которые амплифицировались с фрагмента гена β -казеина варианта A_2 , расщеплялись эндонуклеазой — *BstDEI* (№ E227, НПО «СибЭнзим») на 2 фрагмента: 64 и 22 пн. Фрагмент, амплифицированный с аллеля A_1 , сайта рестрикции не имел (размер его составлял 86 пн). Эффективность амплификации и результаты рестрикции оценивали в 2,5%-ном агарозном геле (см. рисунок).

Результаты и обсуждение. Апробация тест-системы была проведена с использованием ДНК 10 быков-производителей с указанными на сайте (<https://www.accelgen.com>) *CSN2* генотипами. Во всех случаях разработанная тест-система показала свою состоятельность.

С использованием разработанных тест-систем было проведено генотипирование быков-производителей ($n=65$), интенсивно используемых ранее или в настоящее время, или планируемых к использованию в системе искусственного осеменения Краснодарского края (анализировались производители отечественных племенных предприятий). Полученные результаты представлены в таблице.

Принципиальным также являлся ответ на вопрос: не влияет ли негативно определенный *CSN2* генотип на хозяйственно полезные признаки скота? С использованием информации с сайта <https://www.accelgen.com> для групп быков

Частота встречаемости генотипов β -казеина у быков-производителей голштинской и айрширской пород

Генотип <i>CSN2</i>	Частота встречаемости у быков-производителей	
	голштинской породы ($n=33$)	айрширской породы ($n=32$)
A_2A_1	0,27	0,31
A_2A_2	0,48	0,22
A_1A_2	0,25	0,47



с CSN2 генотипом A_2A_2 ($n=17$) и с CSN2 генотипом A_1A_1 ($n=14$) (использованы данные генотипирования и апрельской оценки 2018 года по качеству потомства в США) установлено, что быки с генотипом A_2A_2 оказались достоверно лучше быков-производителей по следующим индексам: *PTAT* (прогнозируемая способность по типу — способность животного передать генетику по типу или подтверждение улучшения качеств в потомстве); *PTAP* (прогнозируемая передающая способность для белка в фунтах, которые дочь быка будет производить выше или ниже, чем в среднем по популяции в течение жизни); *UDS* (индекс характеристик вымени — совокупность показателей состояния вымени: (глубина, прикрепление передних долей, высота задних долей, ширина задних долей, центральная связка, расположение передних и задних сосков); *FLC* (совокупность показателей оценки за ноги и копыта); *DCE* (легкость отела дочерей — склонность дочерей конкретного быка иметь осложнения при отеле, по сравнению с показателями средней коровы в индустрии), не оказывая при этом достоверного влияния на обильномолочность и другие хозяйственно полезные признаки.

Таким образом, как отечественные, так и зарубежные племенные предприятия обладают возможностями по поставке семени от быков с генотипами A_2A_2 β -казеина, а создание стад, производящих молоко A_2 , может значительно повысить прибыльность его производства и переработки, а также востребованность и безопасность молока и молочных продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kamiński S. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health / Kamiński S., Cieslińska A., Kostyra E. // J. Appl Genet 48:189-98, 2007. Pubmed reference: 17666771. DOI: 10.1007/BF03195213.
2. Chia J.S.J. A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes / J.S.J. Chia, J.L. McRae, S. Kukuljan, K. Woodford, R.B. Elliott, B. Swinburn, K.M. Dwyer // Nutr Diabetes 7:e274, 2017. Pubmed reference: 28504710. DOI: 10.1038/nutd.2017.16.
3. He M. Effects of cow's milk beta-casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: a multicentre, randomised controlled study / M. He, J. Sun, Z.Q. Jiang, Y.X. Yang // Nutr J 16:72, 2017. Pubmed reference: 29070042. DOI: 10.1186/s12937-017-0275-0.
4. Ho S. Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study / S Ho, K. Woodford, S. Kukuljan, S. Pal // Eur J Clin Nutr 68:994-1000, 2014. Pubmed reference: 24986816. DOI:10.1038/ejcn.2014.127.
5. Duarte-Vázquez M.A. Production of Cow's Milk Free from Beta-Casein A1 and Its Application in the Manufacturing of Specialized Foods for Early Infant Nutrition / M.A. Duarte-Vázquez, C. García-Ugalde, L.M. Villegas-Gutiérrez, B.E. García-Almendárez, J.L. Rosado // Foods 6: 2017. Pubmed reference: 28704923. DOI:10.3390/foods6070050.

E-mail: nvk1972@yandex.ru

PROSPECTS FOR THE USE OF β -CASEIN GENE POLYMORPHISM IN BREEDING CATTLE OF THE DAIRY DIRECTION OF EFFICIENCY
KOVALYUK N.V.¹, SATSUK V.F.²,

MACHULSKAYA, E.V.¹, SHAKHNAZAROVA YU.YU.¹

¹«Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine»

²Ltd Scientific-Production Association «Yug-Plem»

The β -casein gene (CSN2) is represented in cattle by several polymorphic variants, of which A_1 and A_2 are the most common. Due to the different protein structure of milk cows, carriers of genotypes A_1A_1 , A_2A_2 β -casein in the splitting of such milk by the enzymes of the gastrointestinal tract is derived opioid peptide β -kasatrin 7 (BCM7) in much larger quantities than the corresponding splitting of milk, the fraction containing β -casein A_2 is obtained from cows with genotype A_2A_2 . Preliminary research suggests that BCM7 has a negative impact on people's health. A test system for β -casein locus genotyping has been developed on the basis of PCR/RFLP methods. In the development of primer design, to create a restriction site in the field of the desired SNP, it was necessary to introduce one of the nucleotide replacement primers (G→C). As a result, the fragments that have amplificadores with a fragment of the gene β -casein A_2 variant, is split by the endonuclease — BstDEI (No. E227, «Sibenzim») 2 fragment: 64 and 22 bp. Fragment amplificatory with allele A_1 , site restriction did not have (the size it was 86 bp). Using the developed test system, genotyping of a sample of bulls of Holstein and Ayrshire breeds ($n=65$) was carried out, and the influence of β -casein polymorphism on economically useful traits of cattle was estimated. It is found that domestic and foreign breeding companies have opportunities to supply semen from the bulls with the genotypes A_2A_2 β -casein, and a number of indicators of the index assessment of bulls with genotype A_2A_2 was significantly better manufacturers with genotype A_1A_1 . World experience suggests that the purchase price of milk A_2 favorably with the purchase price of conventional milk. Thus, the creation of herds producing A_2 milk can significantly increase the profitability of its production and processing, as well as the demand and safety of milk and dairy products.

Key words: β -casein, genotype, frequency of occurrence, productivity.

