

Н. В. Ковалюк¹, В. Ф. Сацук², М. А. Ковалюк³, Е. В. Мачульская¹

Селекция крупного рогатого скота по полиморфному гену бета-казеина в Краснодарском Крае

Аннотация. Проблема производства безопасной для потребителя молочной продукции достаточно актуальна. Проведены исследования, посвященные изучению влияния полиморфизма гена бета-казеина (CSN2) на безопасность молока и молочных продуктов. Установлено, что существует связь между потреблением молочного β -казеина типа A1 и различными заболеваниями.

Цель проведенных нами исследований — разработать эффективную авторскую тест-систему, доступную по цене для потребителя, оптимальную для имеющего в лаборатории оборудования и установить с использованием разработанной тест-системы частоту встречаемости полиморфных вариантов в достаточном массиве скота для выделения группы животных — носителей генотипа A2A2 для производства A2 молока. При разработке тест-системы использован метод ПЦР/ПДРФ. Праймеры подобраны с использованием программы Primer Premier, условия амплификации — эмпирически. Для создания сайта рестрикции в области необходимого SNP (T → G) потребовалось введение в состав одного из праймеров нуклеотидной замены. Для проведения ПДРФ анализа использовали эндонуклеазу рестрикции BstDEI. Апробация тест-системы была проведена с использованием ДНК быков — производителей с указанными на сайте <https://www.accelgen.com> CSN2 генотипами.

Объектом исследований служили коровы айрширской (n=685) и голштинской пород (n=1081) АО «Агрообъединение «Кубань». Всего генотипировано 1766 голов. Установлено, что аллель A2 встречается с частотой 0,41 и 0,48, соответственно, у животных айрширской и голштинской породы. Частота встречаемости «желательного» генотипа A2A2 составила 0,19 в айрширской и 0,21- в голштинской породе скота.

Ключевые слова: голштинский скот, айрширский скот, ген CSN2, генотип, тест-система.

Авторы:

Ковалюк Наталья Викторовна — доктор биологических наук, заведующая лабораторией биотехнологии; e-mail: NVK1972@yandex.ru;

Сацук Владимир Фёдорович — кандидат биологических наук, генеральный директор ООО Научно-производственное объединение «Юг-Плем»; e-mail: yug-plem@yandex.ru;

Ковалюк Мария Алексеевна — магистрант; e-mail: masha.kowaliuk@yandex.ru;

Мачульская Елена Витальевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии; e-mail: mellen14@yandex.ru.

¹ ФГНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», Россия, 350055, г. Краснодар, п. Знаменский, ул. Первомайская 4;

² ООО Научно-производственное объединение «Юг-Плем», Россия, 350055, г. Краснодар, п. Знаменский, ул. Первомайская 2/11;

³ ФГБОУ «Кубанский государственный университет», Россия, 350040 г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149.

Введение. Казеин — основной компонент молочных белков представленный в трёх формах: альфа, бета и каппа. Бета-казеин имеет в составе 209 аминокислот как минимум в 12 вариантах, отличающихся разными структурами.

В результате точечной мутации (OMIA 002033-9913: A2 milk in Bos Taurus, g.87181619A>C) в VII экзоне гена коровьего бета-казеина (хромосома 6) замена цитозина на аденин привела к конверсии пролина (аллель A2, кодон CCT) на гистидин (аллель A1, кодон CAT) в позиции 67. На основании

этой изменчивости молоко делится на две группы — A1-подобный тип и A2-подобный тип — в зависимости от наличия пролина или гистидина в 67-й позиции белка бета-казеина [1].

Считается, что данная мутация возникла около 5000 лет назад и широко распространилась в различных породах крупного рогатого скота. Частота аллелей A1 в Гернзейской, Браун Швицкой, Джерсейской, Голштинской, Айрширской и красных датских породах крупного рогатого скота составляет около 4–2%, 34–30%, 50–37%, 56–47%, 60–51%

и 77%, соответственно. Исследования, проведенные в девятнадцати странах (Великобритания, Финляндия, Ирландия, Швеция, Дания, Франция, Германия, Исландия, Норвегия, Австрия, Швейцария, США, Япония, Израиль, Австралия, Новая Зеландия, Венгрия, Венесуэла и Канада) показали, что существует связь между потреблением β -казеина A1 и различными заболеваниями [2].

При расщеплении ферментами ЖКТ молока, содержащего фракцию β -казеина A1 (полученного от коров с иными от A2A2 генотипами), образуется пептид β – казоформин 7 (BCM7) в значительно большем количестве, чем при соответствующем расщеплении молока, содержащего фракцию β -казеина A2 (полученного от коров с генотипом A2A2).

Более высокий уровень опиоидного пептида BCM7 связан с более высокими показателями заболеваемости ишемической болезнью сердца, неврологическими расстройствами, такими как аутизм и шизофрения. BCM-7 – возможная причина неожиданного синдрома младенческой смерти. [3].

Вероятно, опиоидный пептид BCM-7 имеет более высокое сродство, по сравнению с иными метаболитами, к ряду рецепторов мозговой ткани, иммунных клеток и клеток кишечника и запускает реакции воспаления, особенно у детей и людей с нарушениями функции пищеварения [4].

В исследовании Chia, J.S.J. et al. (2017) приведены доказательства того, что молочный белок A1 β -казеина коров является одной из причин диабета типа 1 у людей с генетическими факторами риска [5]. При изучении патологической симптоматики после потребления молока A2 и A1 группой взрослых людей с непереносимостью молока (n=600) установлены значительные различия для симптомов вздутия живота, боли в животе, частоты стула и консистенции стула (все $P < 0,0001$) в пользу употребления молока A2 [6].

Похожие результаты получены в другом исследовании [7]. Показано, что A1-подобные типы бета-казеина вызывают воспалительную реакцию в кишечнике через активацию пути Th2, чего нельзя сказать о типах A2 [1]. Молоко A2 в рецептуре смесей для питания детей раннего возраста, значительно снижает концентрацию BCM7 в единице объема продукции [8].

Естественно, что изложенные выше факты не остались без внимания со стороны крупных производителей молока и молочных продуктов. Мировые переработчики начали объявлять о выпуске нового продукта – A2 молока. Так Новозеландская компания «Fonterra», самый крупный в мире экспортер молочных продуктов, в феврале 2018 го-

да объявила о запуске проекта по производству A2 молока, в этом же месяце об аналогичном запуске сообщила компания Nestle [https://milknews.ru].

Что касается тест-систем для генотипирования животных по локусу бета-казеина (CSN2), первое описание технологии отбора коров – носителей генотипа A2, приведено в United States Patent 7094949 (McLachlan CN (2006) Breeding and milking cows for milk free of β -casein A1).

Технология ПЦР/ПДРФ, описанная в патенте использована в исследовании, проведенном М. Miluchova, М. Gabor, А. Trakovicka (2013) и других [9].

Особенностью данной тест-системы является неудачная структура одного из праймеров, длиной 33 пары нуклеотидов, образующего шпильки с достаточно высокой вероятностью. Описаны также способы генотипирования животных с использованием аллель – специфической ПЦР и реал-тайм ПЦР [10, 11]. Каждый из этих методов защищен соответствующим патентом, имеет определенные достоинства и недостатки.

Цель проведенных исследований – разработать, эффективную авторскую тест-систему, доступную по цене для потребителя, оптимальную для имеющего в лаборатории оборудования и установить с использованием разработанной тест-системы частоту встречаемости полиморфных вариантов в достаточном массиве скота для выделения группы животных – носителей генотипа A2A2 для производства A2 молока. Объектом исследований служили коровы айрширской (n=685) и голштинской пород (n=1081) АО «Агрообъединение «Кубань». Всего генотипировано 1766 голов.

Исследования проведены на базе лаборатории биотехнологии ФГБНУ КНЦЗВ. Для выделения ДНК из крови использовали наборы реагентов Diatom™ DNA Prep 100 (ООО Лаборатория «Изоген», г. Москва). 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 путём.

Для создания сайта рестрикции в области необходимого SNP (T→G) потребовалось введение в состав одного из праймеров нуклеотидной замены. Использовали следующие праймеры:

5' AGG GAT GTT TTG TGG GAG GCT CTT 3'

5' ATA AAA TCC ACC CCT TTG CCC AGA 3'

В результате, фрагменты, которые амплифицировались с участка гена β -казеина варианта A2, расщеплялись эндонуклеазой – BstDEI (№ E227,

НПО «СибЭнзим») на 2 фрагмента: 64 и 22 пн. Фрагмент, амплифицированный с аллеля А1, сайта рестрикции не имел (размер его составлял — 86 пн). Результаты рестрикции оценивали в 2.5% агарозном геле (рисунок 1). Апробация тест-системы была проведена с использованием ДНК десяти быков — производителей с указанными на

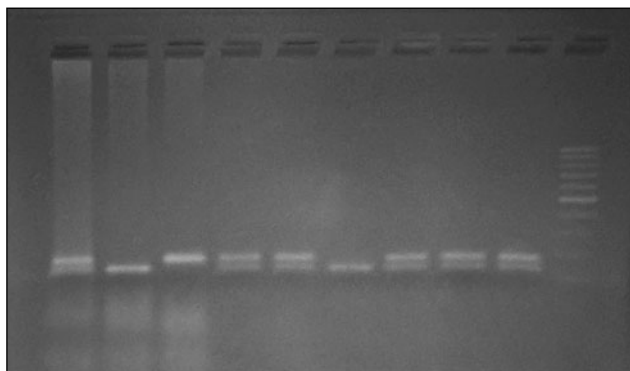


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов гидролиза амплификатов участка гена CSN2 эндонуклеазой рестрикции BstDEI

1, 4, 5, 7, 8, 9 — генотип А1А2; 3 — генотип А1А1;
2, 6 — генотип А2А2; 10 — маркер молекулярного веса

сайте <https://www.accelgen.com> CSN2 генотипами. Во всех случаях разработанная тест-система показала свою состоятельность. Стоимость реагентов и расходных материалов для проведения генотипирования одного животного не превышала 30% от сложившейся на рынке анализов цены генотипирования.

Частоты встречаемости генотипов и аллелей тестируемых по локусу бета казеина коров представлены в таблице 1.

Таким образом, с использованием разработанной тест-системы в АО «Агрообъединение «Кубань» удалось выделить в отдельную группу 130 голов коров айрширской породы (19%) и 227 голов коров голштинской породы (21%) (всего 357 животных, 20%) с генотипом А2А2. Расчеты показывают (данные по удою предоставлены АО «Агрообъединение «Кубань»), что от этих животных возможно получить более 4 тыс. тон молока А2 в год.

Кроме того, для осеменения маточного поголовья хозяйства подобраны быки-производители — носители генотипа А2А2 для дальнейшей селекции по локусу CSN2.

Таблица 1. Частота встречаемости генотипов и аллелей у животных айрширской и голштинской пород

| Генотип/аллель | Частота встречаемости CSN2 генотипов и аллелей в группе животных | |
|----------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| | айрширской породы (n=685) | голштинской породы (n=1081) |
| A1A1 | 0,36 | 0,26 |
| A1A2 | 0,45 | 0,53 |
| A2A2 | 0,19 | 0,21 |
| A1 | 0,59 | 0,52 |
| A2 | 0,41 | 0,48 |

Литература

1. Haq M. R. Comparative evaluation of cow β -casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut / M. R. Haq, R. Kapila, R. Sharma, V. Saliganti, S. Kapila // *Eur J Nutr.* — 2014. — № 53(4). — P. 1039–1049. doi: 10.1007/s00394-013-0606-7.
2. Parashar A. A1 milk and its controversy-a review / A. Parashar, R. K. Saini // *International Journal of Bioassays.* — 2015. — № 4.12. — P. 4611–4619.
3. Kamiński S. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health / S. Kamiński, A. Cieslińska, E. Kostyra // *J. Appl. Genet.* — 2007. — № 48. — P. 189–198. DOI: 10.1007/BF03195213.
4. Parashar A. A1 milk and its controversy-a review / A. Parashar, R. K. Saini // *International Journal of Bioassays.* — 2015. — № 4. — P. 4611–4619.
5. 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.* — 2017. — Pubmed reference: 28504710. DOI: 10.1038/nutd.2017.16
6. 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.* — 2017. — № 16. — pp. 72. DOI: 10.1186/s12937-017-0275-0.

7. Woodford Ho. S. Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study / Ho. S. Woodford, K. Kukuljan, S. Pal // Eur. J. Clin. Nutr. — 2014. — № 68. — P. 994-1000. Pubmed reference: 24986816. DOI: 10.1038/ejcn.2014.127.
8. Duarte-Vázquez M. Á. Production of Cow's Milk Free from Beta-Casein A1 and Its Application in the Manufacturing of Specialized Foods for Early Infant Nutrition / M. Á. 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.
9. Miluchova M. Analysis of Slovak Spotted breed for bovine beta casein A1 variant as risk factor for human health / M. Miluchova, M. Gabor, A. Trakovicka // ABP. — 2013. — V. 60. — № 4. — P. 799–801.
10. Keating A. F. A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to beta-casomorphin / A. F. Keating, T. J. Smith, R. P. Ross, M. T. Cairns // Irish Journal of Agricultural and Food Research. — 2008. — 47.1. — P. 99–104.
11. Mangal I. TaqMan allelic discrimination assay for A1 and A2 alleles of the bovine CSN2 gene / I Mangal, J. Dvořák // Czech J. Anim. Sci. — 2010. — 8: 55. — P. 307–312.

Kovalyuk N.¹, Satsuk V.², Kovalyuk M.³, Machulskaya E.¹

Selection of cattle for polymorphic beta-casein gene in the Krasnodar Territory

Abstract. *The problem of production of safe for the consumer dairy products is quite relevant. Studies have been conducted to study the effect of beta-casein gene polymorphism (CSN2) on the safety of milk and dairy products. It was found that there is a relationship between the consumption of milk β -casein type A1 and various diseases.*

The purpose of our research — to develop an effective author's test system, affordable for the consumer, optimal for having in the laboratory equipment and to establish using the developed test system the frequency of occurrence of polymorphic variants in a sufficient array of livestock to allocate a group of animals-carriers of the genotype A2A2 for the production of A2 milk. The PCR/RPF method was used in the development of the test system. Primers are selected using the program Primer Premier, amplification conditions-empirically. To create a restriction site in the area of the required SNP (T→G), an introduction to one of the nucleotide replacement primers was required. For conducting RFLP analysis used a restriction enzyme BstDEI. Testing of the test system was carried out using the DNA of bulls listed on the website <https://www.accelgen.com> CSN2 genotypes.

The object of research was cows Ayrshire (n=685) and Holstein (n=1081) of JSC «Agroalimenta "Kuban"». Total genotyped 1766 heads. It was found that allele A2 occurs at a frequency of 0.41 and 0.48, respectively, in animals of Ayrshire and Holstein breeds. Frequency of "desirable" A2A2 genotype was 0.19 and 0.21 in Ayrshire — Holstein breed of cattle.

Key words: Holstein cattle, Ayrshire cattle, CSN2 gene, genotype, test system

Authors:

Kovalyuk N. — Dr. Habil (Biol. Sci), Head of the Laboratory of Biotechnology; e-mail: NVK1972@yandex.ru;

Satsuk V. — PhD (Biol. Sci.), General Director, Research and Production Association "Yug-Plem" Ltd; e-mail: yug-plem@yandex.ru;

Kovalyuk M. — Master's degree student; e-mail: masha.kowaliuk@yandex.ru;

Machulskaya E. — PhD (Biol. Sci.), leading researcher; e-mail: mellen14@yandex.ru.

¹ «Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine», 4 Pervomaiskaya Str., Znamensky, 350055, Krasnodar, Russia;

² Research and Production Association «Yug-Plem» Ltd, 2/11 Pervomaiskaya Str., Znamensky, 350055, Krasnodar, Russia;

³ «Kuban state University», Russia, 350040 Krasnodar, 149, Stavropol str.

References

1. Haq M. R. Comparative evaluation of cow β -casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut / M. R. Haq, R. Kapila, R. Sharma, V. Saliganti, S. Kapila // *Eur J Nutr.* — 2014. — № 53(4). — P. 1039–1049. doi: 10.1007/s00394-013-0606-7.
2. Parashar A. A1 milk and its controversy-a review / A. Parashar, R. K. Saini // *International Journal of Bioassays.* — 2015. — № 4.12. — P. 4611–4619.
3. Kamiński S. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health / S. Kamiński, A. Cieslińska, E. Kostyra // *J. Appl. Genet.* — 2007. — № 48. — P. 189–198. DOI: 10.1007/BF03195213.
4. Parashar A. A1 milk and its controversy-a review / A. Parashar, R. K. Saini // *International Journal of Bioassays.* — 2015. — № 4. — P. 4611–4619.
5. 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.* — 2017. — Pubmed reference: 28504710. DOI: 10.1038/nutd.2017.16
6. 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.* — 2017. — № 16. — pp. 72. DOI: 10.1186/s12937-017-0275-0.
7. Woodford Ho. S. Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study / Ho. S. Woodford, K. Kukuljan, S. Pal // *Eur. J. Clin. Nutr.* — 2014. — № 68. — P. 994-1000. Pubmed reference: 24986816. DOI: 10.1038/ejcn.2014.127.
8. Duarte-Vázquez M. Á. Production of Cow's Milk Free from Beta-Casein A1 and Its Application in the Manufacturing of Specialized Foods for Early Infant Nutrition / M. Á. 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.
9. Miluchova M. Analysis of Slovak Spotted breed for bovine beta casein A1 variant as risk factor for human health / M. Miluchova, M. Gabor, A. Trakovicka // *ABP.* — 2013. — V. 60. — № 4. — P. 799–801.
10. Keating A. F. A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to beta-casomorphin / A. F. Keating, T. J. Smith, R. P. Ross, M. T. Cairns // *Irish Journal of Agricultural and Food Research.* — 2008. — 47.1. — P. 99–104.
11. Mangal I. TaqMan allelic discrimination assay for A1 and A2 alleles of the bovine CSN2 gene / I Mangal, J. Dvořák // *Czech J. Anim. Sci.* — 2010. — 8: 55. — P. 307–312.