

[DOI: 10.34617/4a9q-wn62](https://doi.org/10.34617/4a9q-wn62)

УДК 636.22/.28.082.2:575.1

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПЦР ДЛЯ
ВЫЯВЛЕНИЯ ЖИВОТНЫХ, НОСИТЕЛЕЙ АЛЛЕЛЯ А1
ЛОКУСА БЕТА-КАЗЕИНА
USE OF SITE-SPECIFIC PCR FOR
IDENTIFICATION OF ANIMALS, CARRIERS OF
ALLEL OF A1 LOCUS OF BETA-CASEINE**

Ковалюк Наталья Викторовна¹, д-р биол. наук,

Якушева Людмила Ивановна¹, канд. биол. наук,

Шахназарова Юлия Юрьевна¹,

Кесем Амани Айман², магистрант

¹ФГБНУ КНЦЗВ, Российская Федерация, г. Краснодар,

²ФГБОУ КубГУ, Российская Федерация, г. Краснодар,

Kovalyuk Natalia Viktorovna¹, Dr.Biol.Sc.,

Yakusheva Lyudmila Ivanovna¹, Cand. Biol. Sc.,

Shakhnazarova Yulia Yurievna¹, researcher,

Kesem Amani Ayman², undergraduate,

¹Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and

Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation,

²Kuban State University, Krasnodar, Russian Federation

Аннотация: разработана функциональная тест – система на основе АС-ПЦР для выявления полиморфизма локуса бета казеина (CSN2). Планируется использовать тест-систему для поиска носителей аллеля А1 случайно попавших в группу животных, производящих молоко типа А2.

Ключевые слова: ген CSN2; тест-система; аллель А1.

Abstract: a functional test-system has been developed - a system based on AC-PCR for detecting polymorphism of the beta casein locus (CSN2). It is planned to use a test system to search for carriers of the A1 allele that incidentally fall into the group of animals that produce milk of A2 type.

Key words: CSN2 gene; test system; A1 allele.

Проблема производства безопасной для потребителя молочной продукции достаточно актуальна. В последние годы проведены исследования, посвященные изучению влияния полиморфизма локуса бета-казеина (CSN2) на безопасность молока и молочных продуктов. Установлено, что существует связь между потреблением молочного β -казеина типа A1 и различными заболеваниями [1-7].

При расщеплении ферментами желудочно-кишечного тракта молока, содержащего фракцию β -казеина A1 (полученного от коров с генотипом A1A1 и A1A2), образуется опиоидный 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).

Считается, что более высокий уровень BCM7 связан с более высокими показателями смертности от ишемической болезни сердца. BCM-7 - возможная причина неожиданного синдрома младенческой смерти. Кроме того, неврологические расстройства, такие как аутизм и шизофрения, как представляется, связаны с потреблением молока и более высоким уровнем BCM-7 [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 основным причинным триггером 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, 7].

Установлено, что А1-подобные типы бета-казеина вызывают воспалительную реакцию в кишечнике через активацию пути Th2, чего нельзя сказать о типах А2 [1].

В настоящее время рядом хозяйств в России и в Краснодарском крае, в частности, начат отбор животных и формирование групп коров, производящих молоко типа А2. Естественно, что при этом существует риск субъективных ошибок и на заключительном этапе формирования таких групп требуется проведение скрининговых анализов, подтверждающих отсутствие животных – носителей аллелей А1.

Методика. Исследования проведены на базе лаборатории биотехнологии ФГБНУ КНЦЗВ. Объектом исследования являлись образцы крови от 327 коров голштинской и айрширской пород (КФХ «Сокольский» и КФХ «Езубов А.И.») и пробы молока от 23 коров. Для выделения ДНК из образцов использовали наборы реагентов Diatom™ DNA Prep 100 (ООО «Лаборатория Изоген», г. Москва). Для постановки реакций использовали наборы реагентов Gene Pak PCR Core (ООО Лаборатория «Изоген», г. Москва) и праймеры следующей последовательности:

1. 5'AGG GAT GTT TTG TGG GAG GCT CTT3'
2. 5'ATA AAA TCC ACC CCT TTG CCC AGA 3'
3. 5'GGA TGT TTT GTG GGA GGC TGT TAT3'
4. 5'ATA AAA TCC ACC CCT TTG CCC AGA 3'

Обработку ПЦР-продуктов эндонуклеазой BstDEI проводили без предварительной очистки.

Визуализацию ПЦР-продуктов и фрагментов рестрикции проводили в 2,5 % агарозном геле.

Результаты исследований и их обсуждение. Генотипированием животных по локусу CSN2 (n=327) установлено, что генотип А2А2 по локусу CSN2 несли 97 голов (30 %). 23 коровы были выделены в отдельную группу для производства молока типа А2.

Для исключения субъективных ошибок при формировании группы нами было проведено тестирование предоставленных проб молока (n=23) на предмет наличия ДНК типа А1. Выделе-

ние ДНК из проб молока производилось по методике производителя после предварительного центрифугирования 1 мл молока каждой пробы при 4000 об/мин. и удаления 900 мкл надосадочной жидкости.

В качестве контроля использованы пробы молока от коров с генотипом А1А1 и А1А2. В ходе тестирования положительный сигнал получен при АС - ПЦР ДНК, выделенной именно из контрольных проб молока (А1А1+А1А2).

Выводы. Таким образом, праймеры 3 и 4 можно использовать в скрининговых исследованиях для подтверждения достоверности отбора животных-продуцентов молока типа А2.

Список литературы

1. Parashar, A., Saini, R. K. A1 milk and its controversy-a review // *International Journal of Bioassays*. - 2015. - № 4.12. - P: 4611-4619.

2. Kamiński, S., Cieslińska, A., Kostyra, E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health // *J Appl Genet* 48:189-98, 2007. - DOI: 10.1007/BF03195213.

3. Parashar, A., Saini, R. K. A1 milk and its controversy-a review // *International Journal of Bioassays*. - 2015. - № 4. - P: 4611-4619.

4. Chia, J.S.J., McRae, J.L., Kukuljan, S., Woodford, K., Elliott, R.B., Swinburn, B., Dwyer, K.M. A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes // *Nutr Diabetes* - 2017. - Pubmed reference: 28504710. DOI: 10.1038/nutd.2017.16.

5. He M., Sun J., Jiang Z.Q., Yang Y.X. Effects of cow's milk beta-casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: a multicentre, randomised controlled study // *Nutr J* 16:72. - 2017. - DOI: 10.1186/s12937-017-0275-0.

6. Woodford, Ho. S., Kukuljan, K., Pal S. Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study // *Eur J Clin Nutr* 68:994-1000, 2014. Pubmed reference: 24986816. DOI: 10.1038/ejcn.2014.127.

7. Duarte-Vázquez, M.Á., García-Ugalde, C., Villegas-Gutiérrez, L.M., García-Almendárez, B.E., Rosado, J.L. Production

of Cow's Milk Free from Beta-Casein A1 and Its Application in the Manufacturing of Specialized Foods for Early Infant Nutrition // Foods 6:- 2017. Pubmed reference: 28704923. DOI: 10.3390/foods6070050.

[DOI: 10.34617/dgww-tw07](https://doi.org/10.34617/dgww-tw07)

УДК 636.22/.28.082.2:575.1

**МУТАЦИЯ В ЛОКУСЕ TFB1M И ЕЕ
РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ В СУБПОПУЛЯЦИИ СКОТА
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
MUTATION IN THE TFB1M LOCUS AND ITS
PREVALENCE IN THE SUBPOPULATION OF THE
CATTLE OF KRASNODAR TERRITORY**

Ковалюк Наталья Викторовна¹, д-р биол. наук,
Якушева Людмила Ивановна¹, канд. биол. наук,
Шахназарова Юлия Юрьевна¹,
Асякина Алевтина Сергеевна², бакалавр
Самойленко Мария Владимировна², бакалавр
¹ФГБНУ КНЦЗВ, Российская Федерация, г. Краснодар,
²ФГБОУ КубГУ, Российская Федерация, г. Краснодар
Kovalyuk Natalia Viktorovna¹, Dr. Biol. Sc.,
Yakusheva Lyudmila Ivanovna¹, Cand. Biol. Sc.,
Shakhnazarova Yulia Yurievna¹, researcher,
Asyakina Alevtina Sergeevna², bachelor,
Samoilenko Maria Vladimirovna², bachelor,
¹Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and
Veterinary Medicine, Krasnodar, Russian Federation,
²Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russian
Federation

Аннотация: на базе лаборатории биотехнологии ФГБНУ КНЦЗВ проведено генотипирование 80 голов коров и 100 голов быков-производителей по локусу TFB1M. Установлено, что в изученной выборке животных, частота встречаемости дефектного гаплотипа HH5 составила 2,2 %.