

DOI: 10.48612/sbornik-2022-1-2
УДК 575.113.2:636.2.034

**ПОЛУЧЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ ГЕНА CSN2 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, СОДЕРЖАЩИХ
НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РАЗЛИЧНЫЕ ИЗОФОРМЫ
БЕЛКА БЕТА-КАЗЕИНА**

Князева Валерия Владимировна¹, аспирант

Гарковенко Алексей Вячеславович^{1,2}

Радченко Виталий Владиславович², канд. биол. наук

Кощаев Андрей Георгиевич¹, д-р биол. наук, профессор

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина»,
г. Краснодар, Российская Федерация

²ООО «ДНК Экспертиза», г. Краснодар, Российская Федерация

Авторами разработан дизайн праймеров для получения фрагментов гена CSN2 бета-казеина КРС, содержащих нуклеотидные полиморфизмы, связанные с продукцией различных изоформ белка. Дополнительно разработаны праймеры для секвенирования получаемых последовательностей в прямом и обратном направлении.

Ключевые слова: мутация; А2 молоко; β-казеин; полимеразная цепная реакция в реальном времени; аллельная структура стада

**OBTAINING CATTLE CSN2 GENE FRAGMENTS CONTAINING NUCLEOTIDE POLYMORPHISM
DEFINING VARIOUS BETA-CASEIN PROTEIN ISOFORMS**

Knyazeva Valeriya Vladimirovna¹, PhD student

Garkovenko Alexey Vyacheslavovich^{1,2}

Radchenko Vitali Vladislavovich², PhD Biol. Sci.

Koshchaev Andrei Georgievich¹, Dr. Biol. Sci., Professor

¹Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, Krasnodar, Russian Federation

²DNA Expertise, Krasnodar, Russian Federation

The authors developed a design of primers for obtaining fragments of the CSN2 gene of bovine beta-casein containing nucleotide polymorphisms associated with the production of various protein isoforms. Additionally developed primers for sequencing the resulting sequences in the forward and reverse directions.

Key words: mutation; A2-milk; β-casein; real-time polymerase chain reaction; herd allelic frequencies

Улучшение среднего уровня жизни граждан и увеличение доступности продуктов питания ставит перед сельскохозяйственной наукой новые задачи. На первый план выходит не просто количество пищи, но и обеспечение её наилучшего из возможных качеств. Современные методы биологической науки позволяют подойти к задачам на стыке сельского хозяйства, пищевой промышленности и медицины, сделав продукты питания инструментом профилактики болезней и лечения. Ярким примером является так называемое А2 молоко, интерес к которому, как с точки зре-

ния профилактики аллергических и воспалительных явлений, так и с точки зрения коммерческой выгоды для производителей молока и молочных продуктов растёт в мире и России. Отмечено, что увеличение потребления молочных продуктов связано с увеличением риска или обострением симптомов некоторых расстройств, включая желудочно-кишечную дисфункцию [1] и расстройств, связанные с иммунитетом / воспалением [2]. Некоторые из этих эффектов молочных продуктов вызываются группой пептидов, присутствующих в молоке, получаемых в резуль-

тате протеолиза β -казеина, в частности β -казоморфина-7 (BCM-7). BCM-7 возникает только из A1 типа β -казеина, но не из A2 типа β -казеина; эти два основных типа β -казеина присутствуют в молоке. Один или оба из этих типов белка могут находиться в коровьем молоке в зависимости от генетики отдельных коров. Авторами разработан дизайн праймеров для получения фрагментов гена CSN2 бета-казеина КРС, содержащих нуклеотидные полиморфизмы, связанные с продукцией различных изоформ белка. Дополнительно разработаны праймеры для секвенирования получаемых последовательностей в прямом и обратном направлении.

Методика исследований. В качестве объектов исследований использовали животных учебно-опытного хозяйства «Краснодарское» Кубанского ГАУ. Забор крови осуществляли специалисты хозяйства в соответствии с правилами ветеринарного надзора. Использовали коммерчески доступные вакуумные пробирки для гематологических исследований с ЭДТА-К2 (этилендиаминтетраацетат), используемые для исследования цельной крови в гематологии (Improvacuter, КНР). Образец крови наносили на поверхность стерильной марли и подвергали сушке в асептических условиях при комнатной температуре. После этого часть волокон, в необходимом количестве (фрагмент примерно 10x10 мм) изолировали и проводили выделения геномной ДНК с использованием набора «К-СОРБ» (Кат. № EX-514, Синтол, Москва) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя, используя время первичного лизиса

60 мин. Определение концентрации ДНК проводили с помощью набора Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Кат. № P7589, Thermo Fisher Scientific, США), с использованием красителя PicoGreen. Полученные образцы ДНК в эквивалентном количестве использовали в качестве матрицы для получения ПЦР-фрагментов гена бета-казеина. Для это использовали индивидуальные праймеры, дизайн которых был разработан авторами. Очищенные фрагменты подвергали секвенированию по методу Сэнгера, дважды прочитывая последовательность в прямом и обратном направлении с использованием праймеров 3 и 4 соответственно (таблица 2). Визуализацию результатов секвенирования и анализ последовательностей на наличие определённых нуклеотидных полиморфизмов производили с использованием программных пакетов Finch TV Version 1.4.0. (Geospiza, США) и Gene Runner Version 6.5.52. Beta (Gene Runner, США).

Результаты исследований и их обсуждение. Задачей настоящей работы являлось получение стабилизированных в векторной плазмиде фрагментов гена белка бета-казеина (β -CN) КРС, имеющих различные нуклеотидные полиморфизмы, отвечающие за выработку определённых изоформ белка. Данная ДНК может быть использована в качестве матрицы для проверки работоспособности разрабатываемой генетической тестовой системы и оптимизация условий проведения анализа для A1/A2-молока с применением ПЦР в реальном времени.

Таблица 1 – Используемые в работе праймеры (дизайн всех праймеров разработан авторами исследования)

№	Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'...-3')	Кол-во нуклеотидов (шт.)	Темп. отжига (°C)
1	CSN2_for	GTT ATA TGA AAC CAG TTT GGA C	22	56
2	CSN2_rev	GAC AAT AAT AGG GAA GGG TC	20	56
3	seqCSN2_for	TAT GTT TTA AAA AGA GGA GG	20	50
4	seqCSN2_rev	TGG ATA TTT AGG GAA GGG	18	51

Данная ДНК может быть использована в качестве матрицы для проверки работоспособности разрабатываемой генетической тестовой системы и оптимизация условий про-

ведения анализа для A1/A2-молока с применением ПЦР в реальном времени. Первоначально было необходимо выделить интактную геномную ДНК коров. Для эксперимента

были выбраны животные учебно-опытного хозяйства «Краснодарское» Кубанского ГАУ. Нами была получена коллекция образцов геномной ДНК коров. Исследовав аллельную структуру группы животных и определив их генотипы, мы завершили данный этап тем, что клонировали фрагменты гена бета-казеина (β -CN), несущие различные нуклеотидные полиморфизмы в Т-вектор. В случае, когда ПЦР-продукт перед клонированием был получен с использованием геномной ДНК гетерозиготного животного, фактически фрагмент длиной примерно в 800 п.н.о. представлял собой почти эквимолярную смесь молекул, гетерогенных в точке соответствующего нуклеотидного полиморфизма. При лигировании с Т-вектором, трансформации лигазной смесью бактериальных клеток и дальнейшей клональной селекции, ввиду того, что клон-трансформант является потомком единичной клетки, получившей в подавляющем большинстве случаев только одну копию лигированной с ДНК-вставкой плазмиды, все полученные трансформанты несут лишь один из возможных вариантов триплета в составе фрагмента гена бета-казеина. Данное положение было доказано путем прямого секвенирования плазмид. Таким образом, мы получили набор Т-векторов, образцы каждого из которых содержат гомогенные, относительно нуклеотидных полиморфизмов, контролирующих фенотип А1/А2-молока, фрагменты гена бета-казеина (β -CN).

Выводы. В результате исследований авторами получена коллекция Т-векторов,

которые содержат гомогенные, относительно нуклеотидных полиморфизмов, контролирующих фенотип А1/А2-молока, фрагменты гена бета-казеина (β -CN). Данные вектора и их смеси могут быть использованы в качестве матрицы для проверки работоспособности разрабатываемой генетической тестовой системы на основе ПЦР в реальном времени и оптимизации условий проведения анализа на А2-молоко.

Список литературы

1. Barnett MP, et al. Dietary A1 β -casein affects gastrointestinal transit time, dipeptidyl peptidase-4 activity, and inflammatory status relative to A2 β -casein in Wistar rats // *Int J Food Sci Nutr.* – 2014 – Sep;65(6):720–7; doi:10.3109/09637486.2014.898260.
2. Haq MR, et al. Comparative evaluation of cow b-casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut // *Eur J Nutr.* – 2014 – 53 – P. 1039–49 doi:10.1007/s00394-013-0606-7.
3. Jinsmaa Y, et al. Enzymatic release of neocasomorphin and beta-casomorphin from bovine beta-casein // *Peptides.* – 1999 – 20 – P. 957–962.
4. Becker A, et al. Effects of beta-casomorphin derivatives on gastrointestinal transit in mice // *Biomed Biochim Acta.* – 1990 – 49 – P. 1203–1207.
5. Mihatsch WA, et al. Hydrolysis of casein accelerates gastrointestinal transit via reduction of opioid receptor agonists released from casein in rats // *Biol Neonate.* – 2005 – 87 – P.160–163.

DOI: 10.48612/sbornik-2022-1-3

УДК 636.52/.58.082:57.085.2

МЕЖПОРОДНЫЕ ХИМЕРЫ КУР И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИХ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Козикова Лариса Васильевна, д-р биол. наук

Полтева Екатерина Андреевна

Позовникова Марина Владимировна, канд. биол. наук

Дементьева Наталья Викторовна, канд. биол. наук

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста (ВНИИГРЖ), С.-Петербург, Пушкин Российская Федерация

Получены межпородные химеры птиц: суссекс-полтавская глинистая и брама палевая-