



УДК 636.2:575.113. 2(477)
<https://doi.org/10.53904/1682-2374/2023-25/12>

Н.Б. Мохначова

Институт розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН
 вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321 Україна
 e-mail: nataliia.mokhnachova82@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-5982-6542>

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ СІРОЇ УКРАЇНСЬКОЇ ХУДОБИ ЗА ГЕНОМ БЕТА-КАЗЕЇНУ

Сіра українська порода, ПЛР-ПДРФ, поліморфізм, ген, А2-молоко, алель, генотип

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ СІРОЇ УКРАЇНСЬКОЇ ХУДОБИ ЗА ГЕНОМ БЕТА-КАЗЕЇНУ. Н.Б. Мохначова. – У статті описані результати дослідження гену бета-казеїну в популяціях сірої української породи корів, який асоціюється з молочною продуктивністю. Найбільш поширеними варіантами β -казеїну у молочних порід великої рогатої худоби є *A1* та *A2*. Варіант *CSN2^{A1}* викликає серйозні відхилення в організмі людини, а саме: ряд патологічних порушень в роботі кишечника, ішемічну хворобу серця, діабет, аутизм у дітей. Аналіз наукових публікацій свідчить про те, що ген бета-казеїну (*CSN2*) не вивчений у аборигенних порід великої рогатої худоби України, які є носіями специфічних генних комплексів та більшості рідкісних алелей. Нами були проведені молекулярно-генетичні дослідження поліморфізму за локусом гену бета-казеїну в популяціях аборигенної сірої української породи з основних репродукторів даної породи в Україні. Геномну ДНК, виділену із цільної крові 173 тварин, ампліфікували з використанням праймерів, які створені на основі послідовностей гену *CSN2* великої рогатої худоби. Ампліфікований фрагмент *CSN2* довжиною 121 п.н. обробляли рестриктазою *DdeI*. В досліджених популяціях були виявлені всі три генотипи: гомозиготні *CSN2^{A1A1}*, *CSN2^{A2A2}* та гетерозиготний *CSN2^{A1A2}*. Аналіз результатів показав, що у корів ДП ДГ "Маркеєво" переважають носії гетерозиготного генотипу *CSN2^{A1A2}* (94,2%), генотип *CSN2^{A2A2}* відсутній. Результати генотипування ДП "Поливанівка" виявили, що 20% тварин є носіями генотипу *CSN2^{A2A2}*, які дають А2 бета-казеїнове молоко. Переважав генотип *CSN2^{A1A2}*, що визначався у 53% корів. Загалом, досліджена порода демонструє досить високий рівень "бажаного" алелю А2 – 0,468, при розчепленні якого не виробляється β -казоформін 7.

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF UKRAINIAN GRAY CATTLE BY THE BETA-CASEIN GENE. N.B. Mokhnachova. – The article describes the results of the study of the beta-casein gene in populations of the Gray Ukrainian breed of cows, which is associated with milk productivity. The most common variants of β -casein in dairy cattle are A1 and A2. The *CSN2^{A1}* variant causes serious abnormalities in the human body, namely a number of pathological disorders in the work of the intestines, coronary heart disease, diabetes, and autism in children. The analysis of scientific publications shows that the beta-casein gene (*CSN2*) has not been studied in aboriginal breeds of cattle of Ukraine, which are carriers of specific gene complexes and most rare alleles. We conducted molecular genetic studies of polymorphism at the beta-casein gene locus in populations of the aboriginal gray Ukrainian breed from the main breeders of this breed in Ukraine. Genomic DNA isolated from the whole blood of 173 animals was amplified using primers that were created on the basis of the sequences of the *CSN2* gene of cattle. The amplified fragment of *CSN2* with a length of 121 bp. treated with *DdeI* restriction enzyme. All three genotypes were detected in the studied populations: homozygous *CSN2^{A1A1}*, *CSN2^{A2A2}* and heterozygous *CSN2^{A1A2}*. The analysis of the results showed that carriers of the *CSN2^{A1A2}* heterozygous genotype predominate in the cows of the Markeevo State Farm (94.2%), the *CSN2^{A2A2}* genotype was absent. The results of genotyping of "Polyvanivka" SE revealed that 20% of animals are carriers of the *CSN2^{A2A2}* genotype, which produce A2 beta-casein milk. The *CSN2^{A1A2}* genotype prevailed, which was determined in 53% of cows. In general, the studied breed shows a fairly high level of the "desired" allele A2 – 0.468, when uncoupling, β -casoformin 7 is not produced.

Сіра українська – це унікальна вітчизняна порода великої рогатої худоби (ВРХ) зі специфічними ознаками і властивостями. Витривалість, резистентність до несприятливих природних умов, хвороб, невибагливість щодо годівлі та умов утримання, висока жирно-молочність – лише невелика частина затребуваних прекрасних якостей, зокрема при виведенні нових порід. Дана порода є природним вітчизняним генофондовим об'єктом, який перебуває на межі зникнення; йому надано статус першої категорії охорони. Основне поголів'я сірої української худоби України до 2022 року знаходилося в господарствах ДП ДГ "Маркеєво" (Херсонська обл.) і ДП ДГ "Поливанівка" (Дніпропетровська обл.), загалом 926 голів (станом на 2020 рік). У Біосферному заповіднику "Асканія-Нова" також утримується невелика група тварин сірої української породи ВРХ, близько 13–18 особин.

На сьогодні застосовуються різні методи збереження комплексу цінних ознак, властивих для сірої української породи, набутих в результаті тривалого еволюційного процесу. Новітні досягнення молекулярної генетики дають можливість ідентифікувати гени та їх комплекси, які асоційовані із якісними та кількісними ознаками ВРХ.

Молоко є одним із основних джерел білка для організму людини. Бета-казеїн складає 30% від молочних протеїнів та існує в двох генетично неоднорідних формах (A1 та A2). Структура A2-казеїну нагадує грудне молоко, тоді як A1-казеїн пов'язується з різними функціональними порушеннями в організмі людини. Досягнення сучасної молекулярної генетики дозволяють виявляти гени, які контролюють господарсько-корисні ознаки, зокрема молочну продуктивність. Одними із потенційних маркерів молочної продуктивності виступають гени молочних білків: гени бета-казеїну (*CSN2*), капа-казеїну (*CSN3*) та ген бета-лактоглобуліну (*βLG*). У ВРХ молочні білки казеїни є переважаючими компонентами молока. Їх частка в загальній кількості молочних білків становить понад 75%. У свіжому молоці казеїн пов'язаний з кальцієм і представлений міцелярною формою, яка руйнується при обробці молока. Існує чотири типи казеїну: $\alpha S1$, $\alpha S2$, β і κ . Кодують їх гени, розташовані на 6 хромосомі і об'єднані в кластер *CN*.

Ген *CSN2* відповідає за синтез β -казеїну в молоці, побудований із 209 амінокислот та становить 25–35% від загального молочного білка (Eigel et al., 1984; Brody, Kern, 2004; Clemens, 2011; De, Paradkar, Vaidya, 2015). *CSN2* має 13 генетичних варіантів: *A1*, *A2*, *A3*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *H1*, *H2*, *I*, *G*, *A4*, – які відрізняються різними структурами. Найбільш поширеними варіантами β -казеїну у молочних порід великої рогатої худоби є *A1* та *A2*. Вважається, що спочатку всі одомашнені корови виробляли молоко, яке містить лише A2 β -казеїн. Однак, ймовірно внаслідок точкової мутації, 5000–10000 років тому у європейських стадах *Bos taurus* кодон *CAT*, що кодує гістин, утворився шляхом зміни нуклеотидної основи в кодоні *CCT*, що кодує пролін, у 67-му положенні β -казеїну (Eigel et al., 1984; Elliott et al., 1988; Farrell et al., 2004). Так у європейських корів з'явився один із варіантів β -казеїну – варіант *A1* (Haq et al., 2014).

Висока частота варіанта *A1* зазвичай зустрічається у чистопородних особин або схрещених порід саме європейського походження (Ho et al., 2014). Частота алеля *CSN2^{A1}* у чорно-рябих корів вища, ніж у бурих. У молоці азійської та африканської ВРХ взагалі нема *A1* бета-казеїну (Jaiswal, De & Sarsavan, 2014). Тварини голштинської, голштино-фрїзької, джерсейської порід зазвичай виробляють *A1*-молоко. Однією з причин високої розповсюдженості мутантного *A1*-алеля серед порід ВРХ є високий надій, тому усі комерційні породи великої рогатої худоби уражені мутацією *CSN2^{A1}*. В основному, джерелом мутантного алеля *A1* є бугаї-носії, хоча корови також є постачальниками *A1*-алеля, проте меншою мірою (Kaminski, Cieslinska, Kostyr, 2007).

A2-молоко – це молоко отримане від корів носіїв генотипу *CSN2^{A2A2}* β -казеїну (бета-казеїну, *CSN2*). Ген *CSN2* має два розповсюджених алеля: *A1* та *A2*, – тобто у будь-якої корови може бути генотип за бета-казеїном: *CSN2^{A1A1}*, *CSN2^{A1A2}* та *CSN2^{A2A2}*. Саме білок *A1* все частіше називають основною причиною непереносимості молочних продуктів. При розщепленні ферментами шлунково-кишкового тракту молока, що містить *A1* β -казеїн (отримане від корів з генотипами *CSN2^{A1A1}* та *CSN2^{A1A2}*), утворюється опіоїдний пептид β -казоформін 7 (BCM7) в значно більшій кількості, ніж при розщепленні молока з *A2* β -казеїном (від корів *CSN2^{A2A2}*). Саме із дією BCM7 на організм людини пов'язують різні хронічні запальні реакції: алергії, шкірні прояви, виділення муцину. *A1* β -казеїн

також може бути причиною цукрового діабету 1-го типу, коронарної хвороби серця та аутизму, тоді як варіант A2 знижує рівень холестерину та зменшує ризик запальних реакцій в кишечнику (Lien, Kantanen, Olsaker, 1999).

Аналіз наукових публікацій свідчить про те, що ген бета-казеїну (*CSN2*) не вивчений у аборигенної сірої худоби України, яка є носієм специфічних генних комплексів та більшості рідкісних алелей.

Матеріали і методи досліджень

Було досліджено зразки крові (n=173) від корів сірої української породи (рис. 1) з господарств ДП ДГ "Маркєсво" Інституту тваринництва степових районів імені М.Ф. Іванова "Асканія-Нова" – Національного наукового селекційно-генетичного центру з вівчарства (133 гол.) і ДП "Поливанівка" ДУ Інституту Зернових Культур НААН (40 гол.).



Рисунок 1. Тварини сірої української породи з ДП ДГ "Маркєсво" ІТСП імені М.Ф. Іванова "Асканія-Нова" – ННСГЦВ

Молекулярно-генетичні дослідження проводили на базі лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН. Кров для виділення ДНК відбирали з яремної вени в об'ємі 5 мл у вакуумні пробірки з сухим ЕДТА. Виділення ДНК із цільної крові проводили з використанням стандартного комерційного набору "ДНК-сорб-В". Поліморфізм гену *CSN2* досліджували методом ПЛР-ПДРФ (McLachlan, 2006; Mishra et al., 2009).

Для ампліфікації застосовували праймери 5'-ССТТСТТТССАГГАТГААСТССАГ-3' та 5'- GAGTACGAGGAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTCT-3'. Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила 2 мкл буфера для ДНК полімерази, 1 мкл суміші трифосфатів, 1 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази ("Fermentas" Литва). Геномну ДНК додавали у кількості 2 мкл. Загальний об'єм ДНК-суміші доводили H₂O до 10 мкл. Ампліфікацію сумарної ДНК з праймерами проводили на програмованому чотириканальному термоциклі "Терцик" за програмою 95 °С, 5 хвилин – 30 циклів: 95 °С, 10 секунд / 58 °С, 30 секунд / 72 °С, 30 секунд / останній крок – 72 °С, 5 хвилин.

Продукт ПЛР 121 п.н. оброблений рестриктазою DdeI за схемою: H₂O – 3,5 мкл, буфер для ферменту – 1,0 мкл, рестриктаза – 0,5 мкл та 10 мкл ампліфікату на 15 мкл робочої суміші. Візуалізацію результатів проводили шляхом електрофоретичного розподілу фрагментів ДНК у 3% агарозному гелі у 1xTBE-буфері (Ng-Kwai-Hang & Grosclaude, 1992), з наступною детекцією за допомогою транслюмінатора ТУВ-1 в ультрафіолетовому світлі 312 нм. Розміри продуктів, отриманих в ПЛР або в результаті рестрикції, вияв-

ляли за допомогою маркерів молекулярних мас: O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder, Ready-to-Use, "Thermo Scientific". Детекцію результатів проводили фотографуванням гелів цифровою камерою.

Статистичний аналіз виконано з використанням програмного пакету Statistica 6.0 та Excel (Microsoft Office 2007).

Результати досліджень та їх обговорення

Після розщеплення отриманого ампліфікату відповідною ендонуклеазою рестрикції, за наявності або відсутності сайтів рестрикції, було виявлено два алелі: A1 і A2, – і три генотипи: $CSN2^{A1A1}$ – 121 п.н., $CSN2^{A1A2}$ – 121, 86 та 35 п.н. і $CSN2^{A2A2}$ – 86 та 35 п.н. На рисунку 2 представлено приклад електрофореграми, отриманої при визначенні генотипів тварин за досліджуваним локусом.

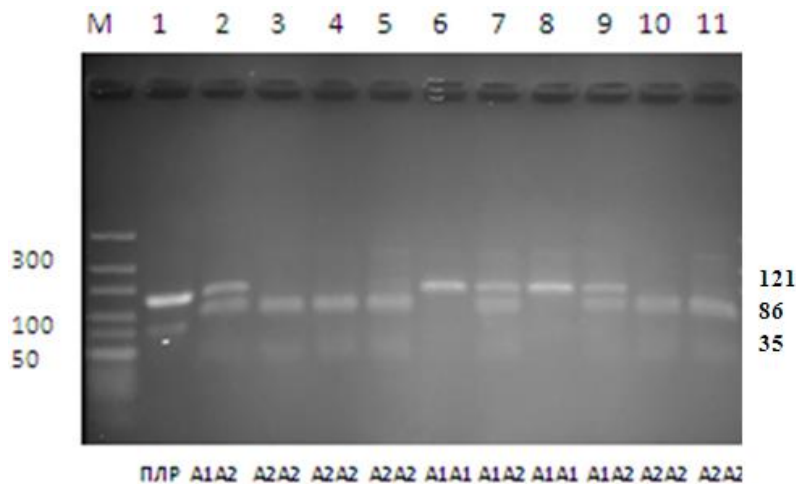


Рисунок 2. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції при визначенні генотипів за $CSN2$: М – маркер молекулярних мас, генотипи зразків вказані на фото

Аналіз отриманих результатів досліджень частот алелів і генотипів гена бета-казеїну показав (табл.), що серед корів ДП ДГ "Маркєєво" ІТСП імені М.Ф. Іванова "Асканія-Нова" – ННСГЦВ переважають носії гетерозиготного генотипу $CSN2^{A1A2}$ (94,2%) і лише 8 тварин були гомозиготними за алелем A1 (5,8%). Частота алеля A1 склала 0,529, алеля A2 – 0,471. Тварини з генотипом $CSN2^{A2A2}$ були відсутні. В результаті фактична гетерозиготність ($H_0=0,942$) значно переважала очікувану ($H_e=0,498$), що вказує на зміщення генетичної рівноваги за досліджуваним геном.

Частоти алелів і генотипів за локусом гена бета-казеїну у сірої української породи ВРХ

n	Генотип	Частота генотипів	Частота алелів		H_0	H_e	χ^2	F_{is}
			A1	A2				
ДП ДГ "Маркєєво" ІТСП імені М.Ф.Іванова "Асканія-Нова" – ННСГЦВ								
133	A1A1	0,058	0,529	0,471	0,942	0,498	0,4	-0,89
	A1A2	0,942						
	A2A2	–						
ДП "Поливанівка" ДУ ІЗК НААН								
440	A1A1	0,270	0,535	0,465	0,530	0,498	0,002	-0,065
	A1A2	0,530						
	A2A2	0,20						
Загалом у породі								
173	A1A1	0,11	0,532	0,468	0,844	0,498	83,55	-0,695
	A1A2	0,844						
	A2A2	0,046						

Примітки: H_0 – фактична гетерозиготність, H_e – очікувана гетерозиготність, χ^2 – критерій відповідності, F_{is} – індекс фіксації Райта.

Результати генотипування тварин ДП "Поливанівка" ДУ ІЗК НААН (див. табл.) виявили, що серед корів в локусі бета-казеїну переважали наступні генотипи: $CSN2^{A1A2}$ – 53%, $CSN2^{A1A1}$ – 27%. Найменше тварин були носіями генотипу $CSN2^{A2A2}$ (20%), які дають А2 бета-казеїнове молоко. Відповідно, частоти алелів визначалися на рівні А1 – 0,535 та А2 – 0,465. Невелика різниця між фактичною ($H_0=0,530$) і очікуваною ($H_e=0,498$) гетерозиготністю вказує на незначне ($F_{IS}=-0,065$) переважання гетерозигот.

В загальному обсязі серед досліджених тварин сірої української породи гомозиготний генотип А1А1 виявлено у 19 тварин, гетерозиготний генотип А1А2 – у 146 тварин та "бажаний" генотип А2А2 – лише у 8 тварин. В цілому у сірої української породи найчастіше зустрічався гетерозиготний генотип А1А2 (0,844), тому відповідно переважав А1-алель (0,532) (рис. 3).

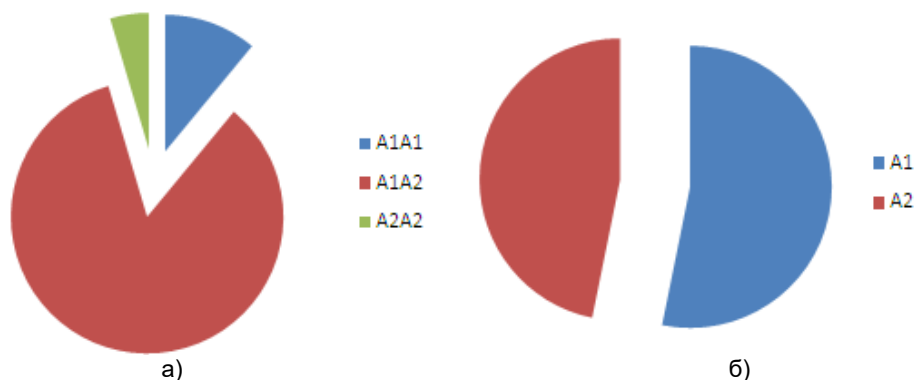


Рисунок 3. Частоти генотипів (а) та алелів (б) за локусом бета-казеїну у сірої української породи ВРХ

Отже, отримані результати дослідження за геном бета-казеїну ($CSN2$) показують високий рівень генетичної різноманітності у досліджених тварин сірої української породи ВРХ. Виявлене переважання алелю $CSN2^{A1}$ узгоджується з отриманими результатами дослідження поліморфізму бета-казеїну у тварин аборигенної бестужівської породи ВРХ – частота А1 алеля 0,76. Подібні дані були встановлені при вивченні генетичної структури симентальських корів – алель А1 (0,660) (Panicke, Freyer, Erhardt, 1997). За результатами генотипування голштинської худоби частота алелів А1 та А2 за геном бета-казеїну ($CSN2$) була 0,819 і 0,181 відповідно (Roginski, Fuquay, Patrick, 2003). Серед інших досліджених порід частота бажаного $CSN2^{A2A2}$ генотипу β -казеїну теж виявилась низькою у популяціях чорно-рябої худоби, в 6 з 8 популяцій цей генотип не зустрічається (Şahin, Voztepe, Aytekin, 2018). У таких м'ясних порід, як герефордська, лимузинська, симентальська частота бажаного генотипу $CSN2^{A2A2}$ теж невисока (2,6–3,3%). Найбільша частота бажаного $CSN2^{A2}$ -алеля виявилась у джерсейської (0,219) та гернзейської порід ВРХ. Ці рідкісні для України породи, острівного походження, за вмістом $CSN2^{A2A2}$ мають найвищі показники (Szwajkowska et al., 2011; Suprovych, Mokhnachova, 2017).

Висновки

Таким чином, вперше з використанням ПЛІР-ПДРФ методики вивчено поліморфізм трьох генотипів, утворених "нормальним" $CSN2^{A2}$ та "мутантним" $CSN2^{A1}$ алелями гену бета-казеїну. Визначена частота генотипів і алелів в локусі бета-казеїну у досліджених корів аборигенної сірої української породи з основних репродукторів в Україні. Встановлена генетична розбіжність за геном бета-казеїну ($CSN2$) в досліджених популяціях сірої української породи ВРХ, що вказує на різну систему селекційних заходів ДП ДГ "Маркеєво" ІТСР імені М.Ф. Іванова "Асканія-Нова" – ННСГЦВ та ДП "Поливанівка" ДУ ІЗК НААН. Загалом, досліджена порода демонструє досить високий рівень "бажаного" алелю А2 – 0,468, при розщепленні якого не виробляється β -казоформін 7. Цінні властивості молока українських аборигенних порід ВРХ мають допомогти у збереженні популяції цих унікальних тварин.

- Brody R. J., Kern S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechnique*. 2004. № 36. P. 214–216. <https://doi.org/10.2144/04362BM02>
- Clemens R. A. Milk A1 and A2 peptides and diabetes. *Milk and Milk Products in Human Nutrition*. Karger Publishers. 2011. P. 187–195. <https://doi.org/10.1159/000325584>
- De S., Paradkar P. & Vaidya A. Indian Breed Cow Milk-Powerhouse of Health. *J. Pharm. Res.* 2015. № 1. P. 573–591.
- Eigel W., Butler J., Ernstrom C., Farrell H. Jr., Harwalkar V., Jenness R., Whitney R. M. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *Journal of Dairy Science*. 1984. № 67(8). P. 1599–1631. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81485-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81485-X)
- Elliott R. B., Reddy S. N., Bibby N. J. and Kida K. Dietary prevention of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*. 1988. № 31. P. 62–64. <https://doi.org/10.1007/BF00279136>
- Farrell Jr. H., Jimenez-Flores R., Bleck G., Brown E., Butler J., Creamer L., Hicks C., Hollar C., Ng-Kwai-Hang K. H. Nomenclature of the proteins of cows' milk-Sixth revision. *Swaisgood. Journal of Dairy Science*. 2004. № 87(6). P. 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
- Haq M. R., Kapila R., Shandilya U. K. and Kapila S. Impact of milk derived β -casomorphins on physiological functions and trends in research: A Review. *Internat. J. Food Prop.* 2014. № 17(8). P. 1726–1741. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.712077>
- Ho S., Woodford K., Kukuljan S. & Pal S. Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2014. № 68(9). P. 994–1000. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.127>
- Jaiswal K. P., De S. & Sarsavan A. Review on bovine beta-casein (A1, A2) gene polymorphism and their potentially hazardous on human health. *International Journal of Environment & Animal Conservation*. 2014. № 3(1). P. 1–12.
- Kaminski S., Cieslinska A., Kostyr E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J. Appl. Genet.* 2007. № 48(3). P. 189–198. <https://doi.org/10.1007/BF03195213>
- Lien S., Kantanen J., Olsaker I. Comparison of milk protein allele frequencies in Nordic cattle breeds. *Anim. Genet.* 1999. № 30. P. 85–91. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.1999.00434.x>
- McLachlan, C. N. Breeding and milking cows for milk free of β -casein A1. United States Patent 7094949. 2006.
- Mishra B., Mukesh M., Prakash B., Sodhi M., Kapila R., Kishore A., Kataria R., Joshi B., Bhasin V. & Rasool T. Status of milk protein, β -casein variants among Indian milch animals. *Indian J. Anim. Sci.* 2009. № 79. P. 722–725.
- Ng-Kwai-Hang K. & Grosclaude F. Genetic polymorphism of milk proteins. *Advanced Dairy Chemistry*. 1992. № 1. P. 405–455.
- Panicke L., Freyer G., Erhardt G. Effects of milk protein genotypes on milk production traits: 48th Annual Meeting of the European Association for Animal Production am 25–8.08.1997 in Vienna. Austria : Wageningen Academic Publishers, 1997. 3rd ed. P. 514.
- Roginski H., Fuquay J. W., Patrick F. F. Encyclopedia of dairy sciences. London : Academic Press, 2003. 2500 p.
- Şahin Ö., Boztepe S., Aytakin İ. A1 and A2 Bovine Milk, the Risk of Beta-casomorphin-7 and Its Possible Effects on Human Health: (II) Possible Effects of Beta-casomorphin-7 on Human Health. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*. 2018. № 32(3). P. 632–639.
- Suprovych T. M., Mokhnachova N. B. Gene polymorphism of economically-useful traits in Ukrainian gray cattle breed. *Animal Biology*. 2017. № 19(1). P. 111–119.
- Szwajkowska M., Wolanciuk A., Barłowska J., Krol J., Litwinczuk Z. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2011. № 29. P. 269–280.

Рукопис отримано 12.10.2023