

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА БЕТА-КАЗЕИНА (CSN2) У АБОРИГЕННЫХ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА УКРАИНЫ И БУЙВОЛОВ (BUBALUS BUBALIS)

Мохначева Н. Б.

*Институт разведения и генетики животных имени М.В. Зубца
(с. Чубинское, Украина)
nataliia.mokhnachova82@gmail.com*

Abstract: *Milk is one of the most valuable human foods. The main protein in milk is casein. The beta-casein gene (CSN2) is responsible for the synthesis of β -casein in cattle. The most common variants of β -casein in dairy cattle are A1 and A2. Option A1 β -casein may also cause type 1 diabetes, coronary heart disease and autism, while option A2 lowers cholesterol and reduces the risk of inflammatory bowel reactions.*

Analysis of scientific publications indicates that the beta-casein gene (CSN2) has not been studied in the indigenous breeds of cattle of Ukraine, which are carriers of specific gene complexes and most of the rare alleles. The frequencies of different variants of beta-casein in three indigenous breeds of cattle of Ukraine - the Ukrainian gray breed, the Ukrainian whiteheaded breed, the Ukrainian Carpathian brown breed and Ukrainian water buffaloes - were investigated. Genomic DNA isolated from animal whole blood was amplified using primers based on the bovine CSN2 gene sequences. Amplified CSN2 fragment 121 bp in length. was treated with restriction enzyme DdeI. The allele and genotype frequencies of the CSN2 gene differ significantly in the studied cattle breeds. The frequencies of the A2 allele of CSN2 vary from 0 to 1.0, and the frequencies of the CSN2^{A1A2} genotypes from 0 to 0.844 and CSN2^{A1A1} from 0 to 0.480. The maximum (100%) content of the A2 allele was noted in water buffaloes (Bubalus bubalis), and the minimum in the Carpathian brown breed (the A2 allele is absent), 46.8% in the Ukrainian gray breed, 26% in the Ukrainian whiteheaded breed. The frequency of the A2A2 genotype in all studied breeds, except for the water buffalo (1.0), was low (0.046) in the Ukrainian gray breed, or this genotype did not occur at all. These results can be used to correct breeding programs for breeding the studied native breeds of cattle and water buffaloes in Ukraine.

Keywords: *polymorphism, allele, gene, beta-casein gene, indigenous breeds of cattle, Ukrainian gray breed, Ukrainian whiteheaded breed, Ukrainian Carpathian brown breed, Ukrainian water buffaloes.*

ВВЕДЕНИЕ

Молоко - один из самых ценных продуктов питания человека. Оно содержит все необходимые для питания человека вещества - белки, жиры, углеводы, которые находятся в сбалансированных соотношениях и легко усваиваются организмом. Кроме того, в нем содержатся различные ферменты, витамины, минеральные вещества и другие важные элементы питания, которые необходимы для обеспечения нормального обмена веществ [6].

В состав белков молока входит казеин и альбумины. Аминокислоты, которые образуются в результате расщепления белков, идут на построение клеток организма, ферментов, защитных тел, гормонов и т.д. По содержанию незаменимых аминокислот белки молока относятся к белкам высокой биологической ценности.

Главный белок молока это - казеин. Он присутствует в молоке не в свободном виде, а в сочетании с кальцием, т.е. как казеинат кальция. В свежем молоке казеин

находится в форме небольших частиц, взвешенных в жидкости; эта форма казеина иногда обозначается как казеиноген. При скисании молоко сворачивается - казеин выпадает в осадок в виде творожного сгустка. В долю приходится до 80% от общего содержания белков молока. Казеин относится к группе белков - фосфопротеинов.

Бета-казеин молочного белка состоит из 209 аминокислот занимает до 35% от общего количества белка в молоке [4,18]. Казеиновые пептиды усиливают естественную защиту организма, регулируют кровяное давление и помогают бороться со стрессом. За синтез β -казеина у крупного рогатого скота отвечает ген бета-казеина (CSN2). Ген бета-казеина расположен на 6 хромосоме крупного рогатого скота [7]. CSN2 имеет 13 генетических вариантов: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G, A4, которые отличаются различными структурами. Наиболее распространенными вариантами β -казеина в молочных породах крупного рогатого скота является A1 и A2 [1].

Считается, что сначала все одомашненные коровы производили молоко, которое содержит только A2 β -казеин. Однако вероятно, вследствие точечной мутации, 5000-10000 лет назад в европейских стадах *Bos Taurus* появился вариант A1 β -казеина [19].

Разница между вариантами β -казеина A1 и A2 состоит в замене одной аминокислоты в 67 положении. Вариант A1 в 67 положении содержит аминокислоту гистидин, а A2 аминокислоты пролин (Рис.1). В результате возникает единичный нуклеотидный полиморфизм [20]. При расщеплении ферментами желудочно-кишечного тракта молока, содержащего A1 β -казеин, образуется биоактивный пептид β -казоформин 7 (BCM7), который имеет значительную опиоидную активность [10].

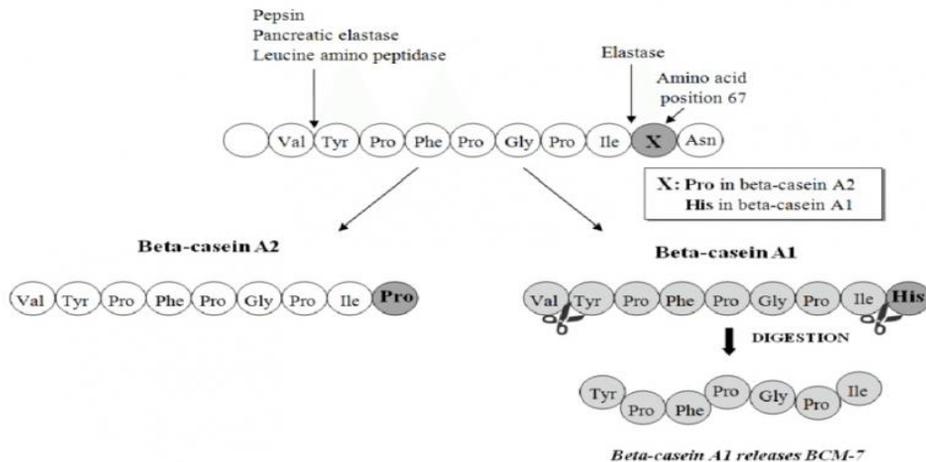


Рисунок 1. Образование β -казоморфина-7 [14]

BCM-7 - это небольшая молекула, которая может легко проникать в кровоток и вызвать различные проблемы со здоровьем. Именно с действием BCM7 на организм человека, связывают различные хронические воспалительные реакции: аллергии, кожные проявления, выделение мочи [16]. Вариант A1 β -казеин также может быть причиной сахарного диабета 1-го типа, коронарной болезни сердца и аутизма [3], тогда как вариант A2 снижает уровень холестерина и уменьшает риск воспалительных реакций в кишечнике [15].

Бета-казеин А1 - наиболее распространенный в коровьем молоке, произведенном в Европе (исключая Францию), а также в США, Австралии и Новой Зеландии. У некоторых пород скота установлены значительные различия по соотношению аллельных вариантов бета-казеина А1 и А2 в молоке. Преобладание бета-казеина А2 характерно для таких пород, как Гернзейская и Джерсейская, причем для Гернзейской породы соотношение А2 до А1 составляет 9,6: 0,4 [13].

Коровье молоко А2 (молоко без варианта А1) представлено в продаже в многих странах: Австралия, Великобритания, США, Новая Зеландия, Нидерланды и широко рекомендуется людям, которые не переносят молока.

Целью работы была оценка частоты различных вариантов бета-казеина в аборигенных породах крупного рогатого скота Украины и водяных буйволов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проанализированы образцы крови ($n = 300$) от коров серой украинской породы (173 гол.), белоголовой украинской породы (31 гол.), бурой карпатской породы (30 гол.) и водных буйволов (*Bubalus bubalis*) (66 гол.). Молекулярно-генетические исследования проводились на базе лаборатории генетики Института селекции и генетики животных имени М.В. Зубца НААН. Кровь для выделения ДНК брали из яремной вены в объеме 5 мл в вакуумные пробирки с сухим ЭДТА. Выделение ДНК из цельной крови проводили с помощью стандартного коммерческого набора "ДНК-сорб-В" (производства AmpliSens, РФ).

Полиморфизм гена CSN2 исследовали методом PCR-RFLP, используя методику McLachlan (2006) [11]. Для амплификации использовались такие праймеры:

5'- CCTTCTTTCCAGGATGAACTCCAG-3`;

5'- GAGTACGAGGAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTCT-3`.

Смесь ПЦР состояла из 2 мкл буфера ДНК-полимеразы, 1 мкл смеси трех фосфатов, 1 мкл соответствующего праймера, 0,2 мкл ДНК-полимеразы ("Fermentas" Литва). Геномную ДНК добавляли в количестве 2 мкл. Общий объем смеси ДНК регулировали с помощью H_2O до 10 мкл. Амплификации общей ДНК праймерами проводили на программированом четырехканальном термоциклере "Терцик" по такой программе: 95 ° С, 5 минут - 30 циклов: 95 ° С в течение 10 секунд, 58 ° С в течение 30 секунд, 72 ° С в течение 30 секунд. Последний шаг - 72 ° С в течение 5 минут. Для проверки успешности амплификации, продукты реакции ПЦР электрофорезировали в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием,

Продукт ПЦР на 121 п.н. обрабатывали рестрикционных ферментом DdeI по схеме: H_2O - 3,5 мкл, ферментный буфер - 1,0 мкл, фермент рестрикции - 0,5 мкл и 10 мкл амплификации 15 мкл рабочей смеси. Реакционную смесь инкубировали при 37°С в термостате. Визуализацию результатов рестрикции проводили электрофоретическим распределением фрагментов ДНК в 3% агарозном геле с бромистым этидием в буфере 1xTBE при 180 В течение 15 минут с последующей детекцией с помощью трансиллюминатора ТУВ-1 в ультрафиолетовом свете 312 нм. Размеры продуктов, полученных с помощью ПЦР или в результате рестрикции, выявляли с помощью маркеров молекулярной массы: ДНК маркера O'GeneRuler Ultra Low Range, "Thermo Scientific".

Анализ результатов проводили, фотографируя гели цифровой камерой. Статистичный анализ проводили с помощью программного пакета Statistica 6.0 и Exel (Microsoft Office 2007).

Частоту генотипов рассчитывали по формуле:

$$p = n / N,$$

где p - частота генотипа;

n - количество особей, определенного генотипа, N - общее количество особей

Частоту аллелей рассчитывали по формуле:

$$p = \frac{2n_{AA} + n_{AB}}{2N}; q = \frac{2n_{BB} + n_{AB}}{2N}$$

где p – частота аллеля А, q – частота аллеля В, n_{AA} , n_{AB} , n_{BB} – число особей с определенным генотипом, N - общее количество особей.

Фактическую гетерозеготность вычисляли по формуле:

$$H_0 = \frac{N_2}{n}$$

где N_2 – число гетерозигот для исследуемого аллеля;

n – объем выборки.

Фактическую гетерозеготность вычисляли по формуле:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

где p_1, p_2, \dots, p_n – частоты аллелей.

Для оценки генетической дифференциации исследованных популяций использовали индивидуальный индекс фиксации Райта (F_{IS}), который количественно отражает отклонения от панмиксии:

$$F_{IS} = (H_e - H_o) / H_e$$

где H_o – фактическая гетерозеготность в популяции;

H_e – ожидаемая гетерозеготность в популяции при панмиксии ($H_o \neq H_e$)

Соответствие фактического и ожидаемого распределения генотипов проверяли по значению критерия Пирсона (χ^2) по формуле:

$$\chi^2 = \frac{\sum (\Phi - T)^2}{T}$$

где Φ – фактическое количество генотипов;

T – теоретическое количество генотипов;

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая распределение полиморфных сайтов рестрикции, которые позволяют тестировать аллельные варианты CSN2, нами был выбран для амплификации *in vitro* участок гена длиной 121 п.н. Этот участок гена содержит полиморфные сайты рестрикции для ректриктазы DdeI.

После проведения амплификации при изучении электрофореграм оказывалась полоска, размеры которой соответствовали размеру заданного для амплификации фрагмента - 121 п.н.

Полученный нами амплификат изучали с помощью рестрикционного анализа. После расщепления амплификата соответствующей эндонуклеазой рестрикции, по наличию или отсутствию сайтов рестрикции, было выявлено наличие двух аллелей А1 и А2 и трех генотипов: CSN2^{A1A1} - 121 п.н., CSN2^{A1A2} - 121, 86 и 35 п.н. и генотип CSN2^{A2A2} - 86 и 35 п.н. На рис.1 представлен пример электрофореграммы, полученной при определении генотипов животных по исследуемому локусу.

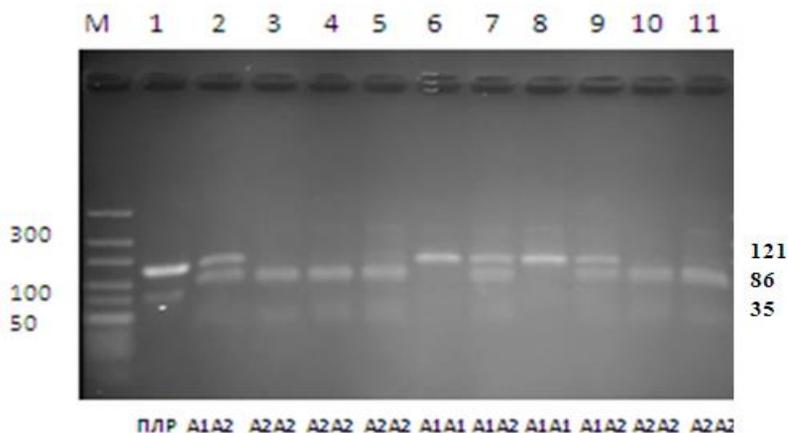


Рис.1. Электрофоретический анализ продуктов рестрикции при определении генотипов по CSN2: М - маркер молекулярных масс; генотипы образцов указаны на фото

Частоты аллелей и генотипов гена CSN2 значительно отличаются во всех исследованных породах крупного рогатого скота (табл.1). Частоты A2-аллеля CSN2 варьируют от 0 до 1,0, а генотипов CSN2^{A1A2} от 0 до 0,844 и CSN2^{A1A1} от 0 до 0,480. Максимальный (100%) содержание A2-аллеля отмечено в водных буйволов (*Bubalus bubalis*), а минимальное - в бурой карпатской породе (A2-аллель отсутствует). Частота A2A2- генотипа во всех исследованных породах, кроме водяного буйвола, была низкой (0,046) или этот генотип совсем не встречался.

Среди исследованных животных серой украинской породы гомозиготный генотип A1A1 обнаружено в 19 животных, гетерозиготы генотип A1A2 - в 146 животных и «желанный» генотип A2A2 - только в 8 животных. В общем у серой украинской породы чаще всего встречался гетерозиготен генотип A1A2 (0,844), поэтому в соответствии преобладал A1-аллель (0,532).

Таблица 1. Частота аллелей и генотипов по локусу гена бета-казеина у животных исследованных пород КРС

По рода	n	генотип	Частота-та генотип ов	Частота аллелей		H ₀	H _e	χ ²	F _{is}
				A1	A2				
Серая украинская	173	A1A1	0,11	0,532	0,468	0,844	0,498	83,55	-
		A1A2	0,844						
		A2A2	0,046						
Белоголовая украинская	31	A1A1	0,480	0,740	0,260	0,52	0,385	3,83	-
		A1A2	0,520						
		A2A2	-						
Бурая карпатская	30	A1A1	1	1	-	-	-	-	-
		A1A2	-						
		A2A2	-						
Буйволы	66	A1A1	-	-	1	-	-	-	-
		A1A2	-						
		A2A2	1						

Примечание: H₀ – фактическая гетерозеготность; H_e – ожидаемая гетерозеготность; χ² – критерий соответствия; F_{is} – индекс фиксации Райта.

В белоголовой украинской породы определялся гомозиготный генотип А1А1 в 15 животных, гетерозиготный генотип А1А2 - в 16 животных, а гомозиготный генотип А2А2 - не обнаружено ни у одной животного. Частоты выявленных аллелей указывают на значительное преобладание аллеля А1 (0,740).

По результатам изучения частоты аллелей и генотипов гена бета-казеина (CSN2) в бурой карпатской породы КРС обнаружено отсутствие полиморфизма. Все протестированные животные были носителями CSN2^{А1А1}-генотипа.

Высокая частота А2-аллеля (1,0) и А2А2-генотипа (1,0) по гену CSN2 в водных буйволов выделяет их из всех исследованных пород и делает особенно ценными для использования в молочном скотоводстве.

Полученные результаты исследования по гену CSN2 обнаружили низкий уровень генетического разнообразия в исследованных пород КРС. Аллель А2 встречался в изученных пород с частотой 46,8% в серой украинской породы, 26% - в белоголовой украинской породы, 100% - в водных буйволов. Только у животных бурой карпатской породы CSN2^{А2}-аллель не встречался совсем (график 1).

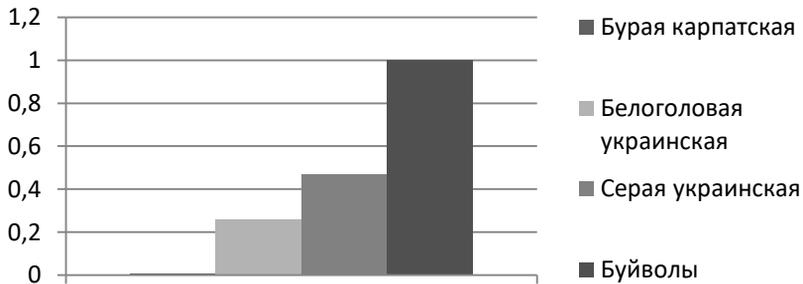


График 1. Частота CSN2^{A2}-аллеля в исследованных породах

Другими исследователями изучения гена бета-казеина (CSN2) в аборигенных породах КРС и буйволов выявило такую частоту CSN2^{A2}-аллеля - 0,47 в популяции местного Красного Польского скота [2], 0,94 в породах крупного рогатого скота Гир, 0,63 у скота Фрисваль [9], 0,44 в породы Пинцгау [12], 0,97 у скота Лулу из Непала [5], 0,81 в костромской породы КРС, 0,31 в ярославской породы [21] и 1,0 в буйволов из Индии [17].

Каминская и др., 2007 отмечает, что частота А2-аллеля в различных пород крупного рогатого скота была между 0,99-0,94 (Гернси), 0,91-0,78 (Джерси), 0,69-0,34 (Голштинская), 0,57-0,28 (Айширская) и 0,29 (Датская Красная) [8].

ВЫВОДЫ

Анализ частот желаемого CSN2^{A2}-аллеля у животных трех украинских аборигенных пород КРС (серая украинская, белоголовая украинская, бурая карпатская) и буйволов показал, что лидируют буйволы и серая украинская порода с частотой 1,0 и 0,468 соответственно. Ценные свойства молока украинских аборигенных пород КРС и буйволов должны помочь остановить уменьшение популяции этих уникальных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Caroli, A. M., Chessa, S., Erhardt, G. J. (2009). Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J. Dairy Sci.*, 92, 5335 - 5352.

2. Cieslinska, A., Fiedorowicz, E., Zwierzchowski, G., Kordulewska, N., Jarmołowska, B., Kostyra, E. (2019). Genetic Polymorphism of β -Casein Gene in Polish Red Cattle-Preliminary Study of A1 and A2 Frequency in Genetic Conservation Herd. *Animals*, 9(3), 377 - 342.
3. Elliott, R. B., Harris, D. P., Hill, J. P., Hill, J.P. (1999). Type I insulin dependent diabetes mellitus and cow milk: Casein variant consumption. *Diabetologia*, 42 (3), 292-296.
4. Farrell Jr., H. M., Flores, Jimenez R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F., Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 87, 1641 -1674.
5. Gorkhali, N. A., Sherpa, C., Budhathoki, N., GC, S., Lama, S., Pokharel, P., Pokhrel, B. R. and Sapkota, S. (2020). PCR Based Genotyping of Lulu Cattle of Nepal for A1, A2 Type Beta-caseins. *Journal of Nepal Agricultural Research Council*, 6, 56 - 61.
6. Górska-Warszewicz, H., Rejman, K., Laskowski, W., Czeczotko, M. (2019). Milk and dairy products and their nutritional contribution to the average polish diet. *Nutrients*, 11, 1771.
7. Jaiswal, K., De, S., Sarsavan, A. (2014). Detection of single nucleotide polymorphism by T-ARMS PCR of cross bred cattle Karan Fries for A1, A2 beta casein types. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*, 1, 18 - 22.
8. Kaminski, S., Cieslinska, A. and Kostyra, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J. Appl. Genet*, 48, 189 - 198.
9. Kumar, S., Chauhan, A., Kumar, S. S., Ran, S. V. (2018). Molecular Characterization of A1/A2 Beta-Casein Alleles in Tharparkar and Gir Cattle. *J. Exp. Zool. India*, 21, 403 - 405.
10. Massella, E., Piva, S., Giacometti, F., Liuzzo, G., Zambrini, A., Serraino, A. (2017). Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in northern Italy. *Italian Journal of Food Safety*, 6, 131 - 133.
11. McLachlan, C. N. Breeding and milking cows for milk free of β -casein A1, United States Patent 7094949, 2006.
12. Miluchova, M., Gabor, M. and Trakovicka, A. (2014). Analysis of genetic structure in Slovak Pinzgau cattle using five candidate genes related to milk production traits. *Genetika*, 46(3), 865 - 875.
13. Mishra, B., Mukesh, M., Prakash, B., Sodhi, M., Kapila, R., Kishore, A., Kataria, R., Joshi, B., Bhasin, V. & Rasool, T. (2009). Status of milk protein, b-casein variants among Indian milch animals. *Indian J Anim Sci.*, 79, 722 - 725.
14. Pal, S., Woodford, K., Kukuljan, S. & Ho, S. (2015). Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients*, 7(9), 7285 - 7297.
15. Panicke, L., Freyer, G., Erhardt, G. (1997). Effects of milk protein genotypes on milk production traits, 48th Annual Meeting of the European Association for Animal Produktion am 25.-28.08.1997 in Vienna/Austria.
16. Raies ul Haq, M., Kapila, R., Shandilya, U. K. & Kapila, S. (2014). Impact of Milk Derived β -Casomorphins on Physiological Functions and Trends in Research: A Review. *International Journal of Food Properties*, 17:8, 1726 - 1741.
17. Ramesha, K. P., Akhila, R., Basavaraju, M., Rani, A., Kataktalware, M. A., Jeyakumar, S. and Varalakshmi, S. (2016). Genetic variants of Beta –Casein in Cattle and Buffalobreeding bulls in Karnataka state of india. *Indian Journal of Biotechnology*, 15, 178 - 181.
18. Roginski, H. (2003). Encyclopedia of dairy sciences. Academic Press, London.
19. Şahin, Ö., Boztepe, S., Aytikin, I. (2018). A1 and A2 Bovine Milk, the Risk of Beta-casomorphin-7 and Its Possible Effects on Human Health:(I) A1 and A2 Milk and the Risk of Beta-casomorphin-7. *Selcuk J Agr Food Sci.*, 32 (3), 632 - 639.
19. Şahin, Ö., Boztepe, S., Aytikin, I. (2018). A1 and A2 Bovine Milk, the Risk of Beta-casomorphin-7 and Its Possible Effects on Human Health:(I) A1 and A2 Milk and the Risk of Beta-casomorphin-7. *Selcuk J Agr Food Sci.*, 32 (3), 632 - 639.
20. Sharma, V., Sharma, N., Jawed, B., Nautiyal, S. C. (2013). High resolution melt curve analysis for the detection of A1, A2 β -casein variants in Indian cows. *J. Microbiol. and Biotechnology Research*, 3, 144 - 148.
21. Подречнева, И. Ю., Щеголев, П. О., Белокуров, С. Г. (2020). Аллельный полиморфизм генов CSN3 и CSN2 у быков-производителей молочных пород. *Международный научно-исследовательский журнал*, 5 (95), 109 - 113.