

CSN3- *HinfI* ТА *BLG*- *HaeIII* ПОЛІМОРФІЗМ В ЗНИКАЮЧІЙ БУРІЙ КАРПАТСЬКІЙ ПОРОДІ ВРХ

Наталія МОХНАЧОВА, кандидат сільськогосподарських наук
Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН
вул. Погребняка 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321, Україна
e-mail: nataliia.mokhnachova82@gmail.com

У статті представлені результати дослідження структурних генів в тварин бурої карпатської породи корів, які асоціюються з молочною продуктивністю: *CSN3* (капа-казеїн), *BLG* (бета-лактоглобулін). Ці гени контролюють процеси молокоутворення у багатьох ссавців, в тому числі і у корів. Всього було досліджено поліморфізм 2 генів (*CSN3* та *BLG*). Для дослідження використали 30 зразків ДНК, виділеної із венозної крові корів бурої карпатської породи породи за допомогою набору «ДНК Сорб-Б» (AmpliSens). Генотипування проводили використовуючи аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР-ПДРФ). В результаті проведеного дослідження виявлено, що поліморфізм генів *CSN3* та *BLG* представлений алелями *CSN3^A*, *CSN3^B* та *BLG^A*, *BLG^B* і відповідно генотипами *CSN3^{AA}*, *CSN3^{AB}*, *CSN3^{BB}* та *BLG^{AA}*, *BLG^{AB}*, *BLG^{BB}*. Для гена *CSN3* ампліфікований фрагмент розміром 273 п.н. обробляли рестриктазою *HinfI*. Встановлено висока частота алелю *CSN3^A* – 0,635 і дещо нижча частота алелю *CSN3^B* – 0,365. При дослідженні гена *BLG* продукт ампліфікації (247 п.н.) обробляли ферментом рестрикції *HaeIII*. Виявлено, що частіше зустрічався алель *B* (0,59) та гетерозиготний генотип *BLG^{AB}* (0,44). Результати дослідження є цінними у зв'язку з різким скороченням чисельності малочисельних та аборигенних популяцій і виникнення загрози зникнення власних генетичних ресурсів сільськогосподарських видів.

Ключові слова: корови, гени, капа-казеїн, бета-глобулін, алель.

Вступ

Бура карпатська порода великої рогатої худоби – це локальна порода, яка за розрахунками ФАО знаходиться в критичному стані ризику зникнення. З 2014 року за даними Держплемреєстру в Україні не залишилось жодного племінного господарства з розведення поголів'я даної породи та відсутня програма селекції плідників. Наразі маточне поголів'я бурої карпатської породи розводять лише у особистих селянських господарствах (Гузеєв та ін., 2017).

Молекулярно-генетичні дослідження у тваринництві важливі для розуміння генетичних особливостей тварин, вдосконалення селекційних програм, покращення продуктивності та здоров'я стад. Ці дослідження дозволяють ідентифікувати гени, відповідальні за якісні показники продукції (Ozdemir et al., 2018). Перевага ДНК-технологій полягає в тому, що можна визначити генотип тварин незалежно від статі, віку, фізіологічного стану особин у ранньому віці, практично відразу після народження. Це значно прискорює селекційний процес, робить його більш прогнозованим. На сьогодні виявлена велика кількість генів, які асоційовані з параметрами молочної продуктивності, визначена їх локалізація в хромосомах і послідовність пар нуклеотидів в їх молекулярній структурі, встановлена причина виникнення поліморфізму генів в результаті точкових мутацій у відповідних локусах молекул ДНК.

Серед багатьох генів можна виділити гени капа-казеїну та бета-лактоглобуліну, які пов'язані з ознаками білково-молочності і технологічними

властивостями молока (Gurses et al., 2018). Ген *BLG* у молочних корів розташований на 11 хромосомі ВТА (Bos Taurus Autosome), складається з 7 екзонів і шести інтронів довжиною 7877 п.н. Білок *BLG* має молекулярну масу 36 000 Дальтон, поліпептид з одинарним зв'язком 18 кДа, що складається з 162 амінокислотних залишків (Wahyu Windarti et al., 2023). Ген *CSN3* корів розташований на хромосомі 6 (6q31) і має загальну довжину 13 кб. Він містить 5 екзонів і 4 інтрони, і більшість послідовностей, що кодують зрілий білок, знаходяться в екзоні 4 (Khaizaran and Al-Razem, 2014). В різних популяціях великої рогатої худоби виявлені 13 алелів гену капа-казеїну та 11 алелів гену бета-лактоглобуліну. Алелі А і В обох генів є домінантними. Різниця між А і В варіантами в двох амінокислотних замінах в поліпептидному ланцюзі (Albarella S. et al., 2020). Алелі обраних генів молочного білку можна використовувати як потенційні маркери молочної продуктивності.

Поліморфізм *CSN3* впливає на перебіг технологічних процесів у сироварінні. Численними авторами (Albarella S. et al., 2020, Čitek J. et al., 2021) зазначається менший час згортання під впливом сичужного ферменту і більшу твердість одержуваного згустку молока від корів з генотипом *CSN3^{BB}*. Так само результати численних досліджень показали, що молоко корів з генотипами *CSN3^{BB}* і *CSN3^{AB}* порівняно з молоком корів з генотипом *CSN3^{AA}* характеризується на 10–30 % коротшим часом згортання, на 5–8 % вищим виходом сиру пармезан і чеддер (Holt C. et al., 2016, Di Gregorio P. et al., 2017).

Біологічною функцією бета-лактоглобуліну є участь у регуляції обміну фосфору в молочній залозі та транспорті ретинолу, жирних кислот у кишечнику. Деякими дослідниками доведено, що генетичний поліморфізм гену *BLG* впливає на жирномолочність, білковомолочність, відповідає за показники біологічної цінності молока та має відношення до фізіології вигодовування (Ozmen O. et al., 2016).

Метою роботи було провести комплексний аналіз генетичної структури групи корів зникаючої бурої карпатської породи за генами: капа-казеїну (*CSN3*) та бета-лактоглобуліну (*BLG*).

Матеріали і методи

Було досліджено зразки крові від дійних корів бурої карпатської породи з приватних

домогосподарств с. Нижні ворота Воловецького району Закарпатської області, Україна. Молекулярно-генетичні дослідження проводились на базі відділу генетики та біотехнології Інституту розведення і генетики тварин ім. М. В. Зубця НААН. Зразки крові відбирали з яремної вени в об'ємі 5 мл в вакуумні пробірки з сухим ЕДТА. Геномну ДНК виділяли згідно з стандартною методикою, використовуючи комерційний набір «ДНК Сорб-Б» (AmpliSens). Концентрацію ДНК доводили до 50 нг/мкл. Поліморфізм генів *CSN3* та *BLG* досліджували методом ПЛР-ПДРФ. Нуклеотидні послідовності праймерів для ампліфікації та назви рестриктаз для рестрикції продуктів ампліфікації показано в табл. 1.

Таблиця 1. Нуклеотидні послідовності праймерів та рестриктази

Послідовність праймера	Ампліфікат, (п.н.)	Рестриктаза	Посилання
<i>CSN3</i>			
F:5'-GAAATCCCTACCATCAATACC-3' R:5'-CCATCTACCTAGTTTATGATG -3'	273	<i>HinfI</i>	Pinder et al., 1991
<i>βLG</i>			
F:5'-TGTGCTGGACACCGACTACAAAAAG-3' R:5'-GCTCCCGGTATATGACCACCTCT-3'	247	<i>Hae III</i>	Medrano et al., 1990

Умови ПЛР та схеми рестрикційного аналізу продуктів ампліфікації поліморфних ділянок досліджуваних генів в табл. 2. Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 2 мкл буфера для ДНК полімерази, 1,0 мкл суміші дНТФ («Амплісенс» РФ), 1,0 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази («*Fermentas*» Литва). Геномна ДНК додавалась у кількості 2,0 мкл, решта ddH₂O. Загальний об'єм ДНК-суміші становив 10

мкл. Ампліфікацію ДНК проводили на програмованому чотирьохканальному термоциклері ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ДНК-технологія). Прилад виконаний у вигляді єдиного модуля, що об'єднує 4 незалежно керованих термоблока. В кожному термоблоці встановлена матриця на 10 пробірок об'ємом 0,5 мл.

Таблиця 2. Характеристика умов ПЛР та схеми ПДРФ-аналізу продуктів ампліфікації

Поліморфізм	Умови ампліфікації	Генотипи та відповідні довжини рестрикційних фрагментів
<i>CSN3-HinfI</i>	95°C-4 хв; (95°C- 15с; 58°C- 15с; 72°C- 60с)х35; 72° -10 хв	<i>CSN3-HinfI^{BB}</i> :224+49; <i>CSN3-HinfI^{AA}</i> :133+91+49; <i>CSN3-HinfI^{AB}</i> :224+133+91+49;
<i>BLG-Hae III</i>	94°C-4 хв; (95°C- 15с; 61°C- 15с; 72°C- 60с)х35; 72° -10 хв	<i>BLG-Hae III^{AA}</i> :148+99; <i>BLG-Hae III^{BB}</i> :99+74; <i>BLG-Hae III^{AB}</i> :148+99+74;

Продукти ПЛР обробляли специфічними рестрикційними ферментами: до 10 мкл ПЛР-продукту додавали 5 од./мкл рестриктази та 1,5 мкл

рестрикційного буферу, інкубували при 37 °C 12 год. Візуалізацію результатів проводили в 2-3% агарозному гелі з бромистим етидієм. у 1хTBE-

буфері при постійній напрузі 100 В протягом 90 хв, з наступною детекцією за допомогою транслюмінатора ТУВ-1 в ультрафіолетовому світлі 312 нм. В якості маркерів молекулярних мас використовували *GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder* та *Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*. Аналіз результатів проводили, фотографуючи гелі цифровою камерою.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного пакету Statistica 6.0 та Excel (Microsoft Office 2007).

Результати та обговорення

В популяції бурої карпатської породи ВРХ було досліджено 2 локуси (*CSN3* та *BLG*), які є генами-кандидатами молочної продуктивності. Вибрані гени дозволяють проаналізувати молочну характеристику, як одну з найголовніших господарсько-корисних ознак.

У дослідженій групі тварин бурої карпатської породи виявили поліморфізм за геном капа-казеїну (рис. 1).

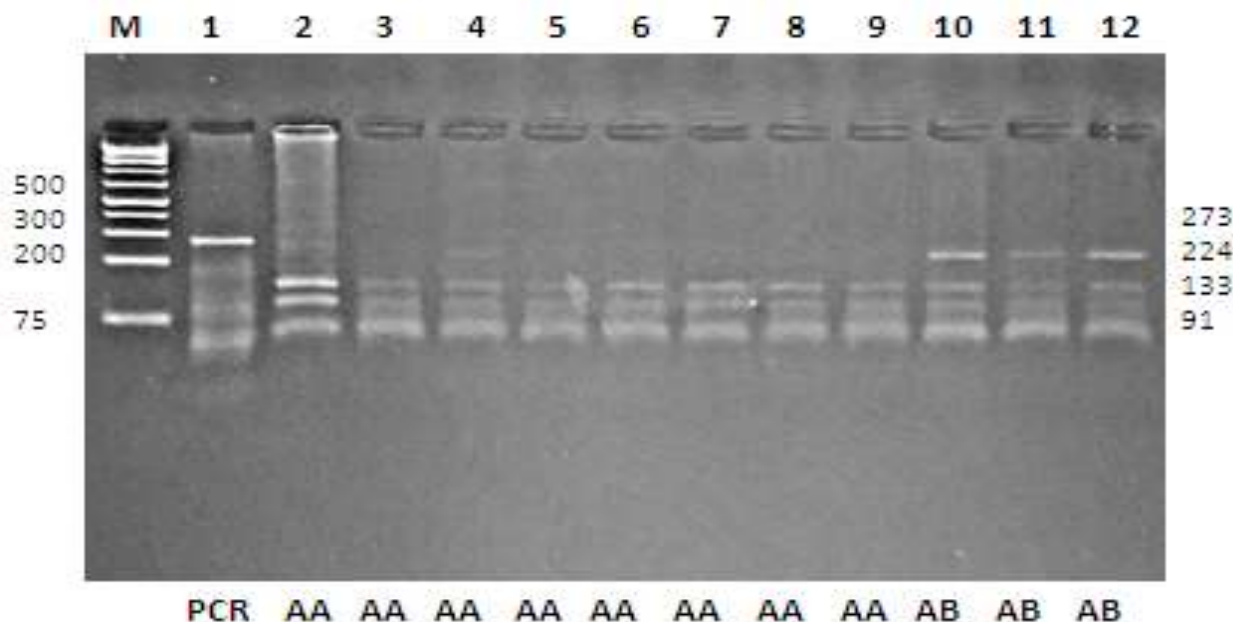


Рис 1. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції при визначенні генотипів за геном *CSN3*: М – маркер молекулярних мас; генотипи тварин вказані під фото

Так, в результаті ДНК-діагностики виявлено тварин трьох генотипів *CSN3^{AA}*, *CSN3^{BB}* та *CSN3^{AB}*. Із 30-ти тварин – 13 голів – носії гомозиготного генотипу *CSN3^{AA}* капа-казеїну (44%). Їх молоко містило тільки А-білок. Серед решти корів - 12 голів гетерозиготні - *CSN3^{AB}*, а 5 – гомозиготні за В-алелем (табл. 3).

Частота алелю А склала 0,635, що у 1,74 рази перевищує частоту алелю В, який пов'язують з більшим вмістом білку в молоці і виходом сиру. Алель *CSN3^B* в досліджених тварин зустрічається з частотою 0,365 (табл. 3).

Таблиця 3. Популяційні особливості генетичної структури бурої карпатської породи ВРХ за геном капа-казеїну

Порода	Розмір вибірки	Частота генотипів		Частота алеля		Гетерозиготність		χ^2	F_{IS}
				А	В	H_0	H_E		
Бура карпатська	30	AA	0,44	0,635±0,027	0,365±0,027	0,390	0,464	0,45	0,159
		AB	0,39						
		BB	0,17						

Примітка. H_0 – фактична гетерозиготність; H_E – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності, F_{IS} – індекс фіксації Райта.



На основі розподілу алельних частот *CSN3* обчислено основні показники генетичної мінливості досліджених корів. Порівняння значень фактичної і теоретичної гетерозиготності за геном капа-казеїну у вивчених тварин бурої карпатської худоби відмічено, що очікувана гетерозиготність на 0,074

перевищувала фактичну, проте, різниця є статистично незначущою ($\chi^2=0,45$).

Аналізом результатів генотипування досліджуваного поголів'я бурої карпатської породи за геном бета-лактоглобуліну встановлено, що поліморфізм гену представлений двома алелями: *BLG^A* та *BLG^B* (рис. 2).

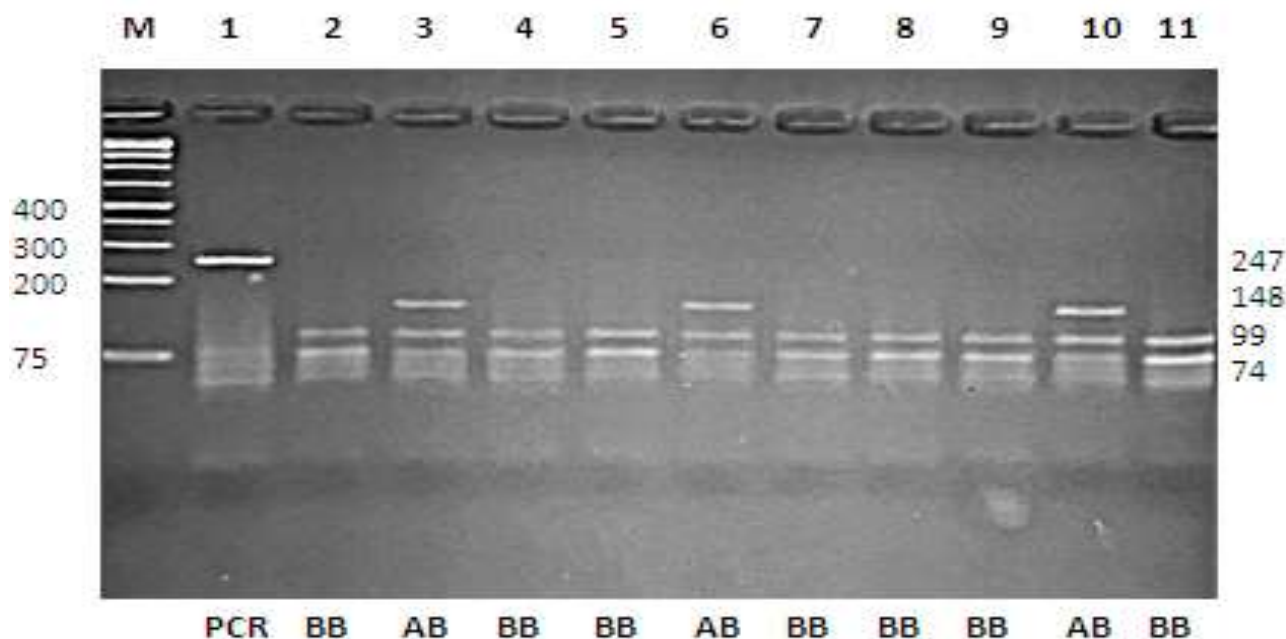


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції при визначенні генотипів за геном *BLG*: М – маркер молекулярних мас; генотипи тварин вказані під фото

Частота алеля *BLG^A* серед досліджених тварин склала 0,41, тоді як алеля *BLG^B* – 0,59 відповідно. Отримані результати знайшли своє відображення в

частоті як гомозиготних *BLG^{AA}*, *BLG^{BB}*, так і гетерозиготного *BLG^{AB}* генотипів, яка склала: *BLG^{AA}*- 19%, *BLG^{BB}*- 37%, *BLG^{AB}*- 44% (табл. 4).

Таблиця 4. Популяційні особливості генетичної структури бурої карпатської породи ВРХ за геном бета-лактоглобуліну

Порода	Розмір вибірки	Частота генотипів		Частота алеля		Гетерозиготність		χ^2	F_{IS}
				A	B	H_0	H_E		
Бура карпатська	30	AA	0,19	0,41±0,031	0,59±0,031	0,440	0,484	0,13	0,091
		AB	0,44						
		BB	0,37						

Примітка. H_0 – фактична гетерозиготність; H_E – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності, F_{IS} – індекс фіксації Райта

Методами генетико-статистичного аналізу дали оцінку генетичній структурі геном *BLG* дослідженим тваринам бурої карпатської породи ВРХ. Рівень очікуваної гетерозиготності незначно перевищував (на 0,044) рівень фактичної.

Обчислення індексу фіксації Райта, який відображає інбридинг особини відносно популяції,

не виявило надлишку гетерозигот за обома дослідженими локусами.

Вивченням поліморфізму генів капа-казеїну та бета-лактоглобуліну в бурої карпатської породи займалися вітчизняні вчені (Копилова К.В., 2012; Гузєєв та ін., 2017). Частота алеля А гену *CSN3* бурої карпатської породи варіювала від 0,550 до 0,619. Отримані результати відповідають

опублікованим іншими дослідниками і знаходяться на верхній границі діапазону досліджуваного показнику, тобто частота алеля $CSN3^A$ серед тварин бурої карпатської породи склала 0,635.



Список використаної літератури

- Albarella S., Selvaggi M., D'Anza E., Cosenza G., Caira S., Scaloni A., Fontana A., Peretti V., Ciotola F. Influence of the Casein Composite Genotype on Milk Quality and Coagulation Properties in the Endangered Agerolese Cattle Breed. *Animals*. 2020. Vol.10. Issue 5. P. 892. DOI: 10.3390/ani10050892.
- Čítek J., Brzákova M., Hanusová L., Hanuš O., Večerek L., Samková E., Křížová Z., Hoštičková I., Kávodá T., Straková K., et al. Gene Polymorphisms Influencing Yield, Composition and Technological Properties of Milk from Czech Simmental and Holstein Cows. *Anim. Biosci.* 2021. Vol. 34. P. 2–11. DOI: 10.5713/ajas.19.0520
- Di Gregorio P., Di Grigoli A., Di Trana A., Alabiso M., Maniaci G., Rando A., Valluzzi C., Finizio D., Bonanno A. Effects of Different Genotypes at the $CSN3$ and LGB Loci on Milk and Cheese-Making Characteristics of the Bovine Cinisara Breed. *Int. Dairy J.* 2017. Vol. 71. P. 1–5. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.11.001.
- Guzev Yu.V., Sydorenko O.V., Vishnevskiy L.V.. Characterization of the genetic structure of brown Carpathian breeders by the kappa-casein ($CSN3$) gene. 2017. *Animal breeding and genetics*. Vol. 54. P. 216–221.
- Gurses, M., Yuce, H., Etem, E. O Polymorphisms of kappa-casein gene and their effects on milk production traits in Holstein, Jersey and Brown Swiss cattle. 2018. *Anim. Prod. Sci.*, Vol. 58. Issue 5. P. 778–784.
- Holt C. Casein and Casein Micelle Structures, Functions and Diversity in 20 Species. *Int. Dairy J.* 2016. Vol. 60. P.2–13. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.01.004.
- Khaizaran ZA, Al-Razem F. Analysis of selected milk traits in Palestinian Holstein- Friesian cattle in relation to genetic polymorphism. *Journal of Cell and Animal Biology*. 2014. Vol. 8. P. 74–85. DOI: 10.5897/jcab2014.0409.
- Kopylova K. V. Genetic structure of bulls of different breeds of cattle according to loci of quantitative traits. *Visnyk ahraryoi nauky*. 2012. Vol. 2. P. 47–49.
- Medrano, J.F., Aquilar-Cordova, E. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Animal Biotechnology*. 1990. №1(1). P. 73–77.
- Ozdemir, M., Kopuzlu, S., Topal, M. Relationships between milk protein polymorphisms and production traits in cattle: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Anim. Breed.*, 2018. Vol. 61. Issue 2. P. 197–206.
- Ozmen O., Kul S. Investigating the genetic polymorphism in the exon 2 region of ovine beta-lactoglobulin gene and its association with some milk traits. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 2016. Vol. 63. P. 323–328.
- Pinder, S.J., Perry, B.N., Skidmore, C.J., Sava, D. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of polymerase chain reaction. *Animal Genetics*. 1991. Vol. 22. Issue 1. P. 11–20.
- Wahyu Windarti, Galih Pambuko, Purwadi, Revi Gama Hatta Novika and Sigit Prastowo. 2023. Molecular Screening of β -Lactoglobulin Gene Variation for Allergy-free Milk Production in Indonesian Friesian Holstein *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 1200 012026. DOI 10.1088/1755-1315/1200/1/012026
- Arion O. V., Kupach T. H., Dem'yanenko S. O. Basics of soil science: teaching method. Manual. Kyiv: VPTS "from erosion. Kyiv: Fitosotsiotsentr, 2002. 64 p. (In Ukrainian)
- Tarariko O. H., Syrotenko O. V., Il'yenko T. V., Kuchma T. L. Agroecological satellite monitoring. Kyiv: Aharna nauka, 2022. 204 p. (In Ukrainian).
- Truskavets'kyi R. S. Basics of soil fertility management. Kharkiv, 2016. 388 p. (In Ukrainian)

CSN3- *HinfI* AND BLG- *HaeIII* POLYMORPHISM IN THE DISAPPEARING BROWN CARPATHIAN CATTLE BREED

Nataliia MOKHNACHOVA

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M. V. Zubets of NAAS of Ukraine

The article presents the results of the study of structural genes in animals of the Brown Carpathian breed of cows, which are associated with milk productivity: *CSN3* (kappa-casein), *BLG* (beta-lactoglobulin). These genes control the processes of milk production in many mammals, including cows. A total of 2 gene polymorphisms (*CSN3* and *BLG*) were investigated. The study used 30 samples of DNA isolated from the venous blood of Brown Carpathian cows using the «DNA Sorb-B» kit (AmpliSens). Genotyping was performed using polymerase chain reaction (PCR-RFLP) polymorphism analysis of restriction fragment lengths. As a result of the research, it was found that polymorphism of *CSN3* and *BLG* genes is represented by alleles *CSN3^A*, *CSN3^B* and *BLG^A*, *BLG^B* and, respectively, genotypes *CSN3^{AA}*, *CSN3^{AB}*, *CSN3^{BB}* and *BLG^{AA}*, *BLG^{AB}*, *BLG^{BB}*. For the *CSN3* gene, an amplified fragment with a size of 273 bp. treated with *HinfI* restriction enzyme. A high frequency of the *CSN3^A* allele was established at 0.635 and a slightly lower frequency of the *CSN3^B* allele at 0.365. When studying the *BLG* gene, the amplification product (247 bp) was treated with the restriction enzyme *HaeIII*. It was found that allele B (0.59) and heterozygous genotype *BLG^{AB}* (0.44) were more common. The results of the study are valuable in connection with the sharp reduction in the number of small and aboriginal populations and the threat of extinction of the own genetic resources of agricultural species.

Keywords: cows, genes, kappa-casein, beta-globulin, allele

Отримано: 16.11.2023

Погоджено до друку: 29.11.2023

Новини Інституту

Впродовж 14-17 листопада 2023 р. представники Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН Галина Панахид, Тетяна Партика та Олег Клим прийняли участь у тренінгу «Проекти та управління ними», який відбувся за сприяння ФАО в рамках реалізації Компоненту 5 Проекту ФАО GCP/UKR/012/ЕС "Сприяння збереженню та відновленню системи генетичних ресурсів рослин в Україні". Учасникам тренінгу представниками ФАО (Тетяна Бривко та Тетяна Заугольнікова) було презентовано проект ФАО "Сприяння збереженню та відновленню системи генетичних ресурсів рослин в Україні".

Під час заходу, завдяки тренеру Руслану Крапличу, учасники навчилися описувати актуальну проблему, яку можна вирішити шляхом грантової підтримки донорами; дізнались як влучно сформулювати мету та завдання проекту; взнали яким чином спланувати дії за проектом, щоб досягнути мети та як визначити методи виконання проекту; зрозуміли як описати результати заради яких фінансуються проекти та як визначити оптимальні методи їх оцінювання; навчилися складати бюджет проекту та визначати компоненти які варто додати до проекту, щоб переконати донора його підтримати.

Учасники тренінгу дізнались як донори здійснюють розгляд проєктів з огляду на реалістичність виконання й ефективність звітів та навчилися організувати систему підготовки, виконання та звітування за проєктами та навчилися презентувати свою організацію та проєкти перед донорами. Інформативний, динамічний та практичний захід сприяв професійному розвитку наших колег та відкрив нові можливості для подальшої ефективної роботи Інституту.

