

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

УДК 577.21

Н.А. ГЛИНСКАЯ, канд. с-х. наук, доцент,
доцент кафедры биохимии и биоинформатики¹

Е.С. СИЛЬЧЕНКО

лаборант кафедры биохимии и биоинформатики¹

В.В. НИКОЛАЕВА

магистрант¹

Е.И. ПРИЛОВСКАЯ

ассистент кафедры биохимии и биоинформатики¹

¹Полесский государственный университет,

г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 1 апреля 2021 г.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА БЕТА-КАЗЕИНА (CSN2) И АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА БЕЛОРУССКОЙ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ

В данной статье приведены результаты генотипирования крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы по гену CSN2. Выявлена взаимосвязь гена CSN2 с молочной продуктивностью в исследуемой группе животных. Проанализированы биохимические показатели крови крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы различных по генотипам гена бета-казеина (CSN2). Показана целесообразность и эффективность проведения молекулярно-генетического тестирования исследуемых животных по изучаемому гену для объективной оценки их генетического потенциала и накопления в стадах «желательных генотипов».

Ключевые слова: полиморфизм, ген CSN2, частота встречаемости, молочная продуктивность, биохимические показатели.

GLINSKAYA N., PhD in Agric. Sc., Associate Professor

Associate Professor of the Department of Biochemistry and Bioinformatics¹

SILCHENKO E.

Laboratory Assistant at the Department of Biochemistry and Bioinformatics¹

NIKOLAEVA V.

Undergraduate¹

PRILOVSKAYA E.

Assistant at the Department of Biochemistry and Bioinformatics¹

¹Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus

POLYMORPHISM OF BETA-CASEIN GENE (CSN2) AND ANALYSIS OF BIOCHEMICAL STATE OF BOVINE CATTLE OF BELARUSIAN BLACK-AND-POTTED BREEDS

This article presents the results of genotyping by CSN2 gene of cattle of the Belarusian black-and-white breed. The relationship of the CSN2 gene with milk productivity in the studied group of animals was revealed. The biochemical parameters of the blood of cattle of the Belarusian black-and-white breed of dif-

ferent genotypes of the beta-casein gene (CSN2) were analyzed. The expediency and effectiveness of molecular genetic testing of the studied animals for the studied gene to evaluate objectively the genetic situation and the accumulation of "desirable genotypes" in herds is shown.

Keywords: *polymorphism, CSN2 gene, frequency of occurrence, milk production, biochemical parameters.*

Введение. Молочное скотоводство является одной из важнейших отраслей сельского хозяйства Беларуси, которое стремится к достижению положительных результатов в вопросах как увеличения производства молока, так и к улучшению его качества [1].

Современная молекулярная генетика позволяет на уровне ДНК определять гены, контролируемые хозяйственно-полезные признаки животных [2, 3].

В качестве потенциальных маркеров молочной продуктивности могут рассматриваться аллели генов молочных белков и гормонов. В последнее время все чаще ученые обращают внимание на исследование полиморфизма гена бета-казеина (CSN2) у крупного рогатого скота (КРС) и выявление связей между его генотипами и признаками продуктивности животных [2].

В связи с вышеизложенным, задачами проведенных исследований явились оценка частоты встречаемости аллелей и генотипов гена бета-казеина, определение эффективности его влияния на молочную продуктивность крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы, а также изучение биохимических показателей крови исследуемой группы животных.

Материалы и методы исследования. Исследования были проведены в отраслевой лаборатории ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве на базе УО «Полесский государственный университет».

В качестве биологического материала использовали ткань (выщип уха) 100 животных белорусской черно-пестрой породы, разводимых в филиале ОАО «Лунинецкий молочный завод» Брестской области. В процессе отработки режимов использовался свежий материал.

Лабораторно адаптирована амплификация в объеме 14,5 мкл реакционной смеси в составе: 100 нг выделенной ДНК; 3 мМ – Mg^{2+} ; 1,4 мМ – дНТФ (mix); 1X - буфер (с KCl); 20

пМ – прямой праймер; 20 пМ – обратный праймер; 2,5 е.а. – Taq-полимеразы; H_2O – до 14,5 мкл.

При подборе оптимальных условий было обращено особое внимание на экстрагирование ДНК, которое проводилось перхлоратным методом с двойной очисткой.

Для успешного проведения ПЦР были подобраны праймеры так, чтобы фрагмент между ними включал в себя сайты узнавания для A1 и A2 аллельных вариантов гена бета-казеина. Были использованы следующие последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров:

(F): CSN2: 5' –
GAGTCGACTGCAGATTTTCAACATCAGT
GAGAGTCAGGCCCTG- 3';

(R): CSN2: 5' –
CCTGCAGAATTCTAGTCTATCCSTTCCST
GGGCCCATCG – 3'.

Проведение реакции амплификации по гену бета-казеина (CSN2) проводили на автоматическом термоциклере (амплификаторе) типа Biometra используя следующую программу режима ПЦР: горячий старт – 94°C – 5 мин; денатурация – 94°C – 1 мин; отжиг – 65°C – 1 мин; синтез – 72°C – 1 мин (35 циклов); элонгация – 72°C – 10 мин.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали в 1,5%-ном агарозном геле при напряжении $V=110$ в течение 35 мин. Длина амплификационного фрагмента гена CSN2 – 251 п.н.

Для рестрикции амплификационного участка гена CSN2 использовали эндонуклеазу *TaqI*. Рестрикцию проводили в термостате при температуре 37°C в течение 1,5 часа. Детекцию результатов рестрикции проводили в 3%-ном агарозном геле, $V=130$, 60 мин. При расщеплении продуктов амплификации по гену CSN2 идентифицировались следующие генотипы: CSN2^{A2A2} – фрагмент 251 п.н.; CSN2^{A1A2} – фрагменты 251, 213 п.н.; CSN2^{A1A1} – фрагменты 213, 38 п.н. (рисунок).

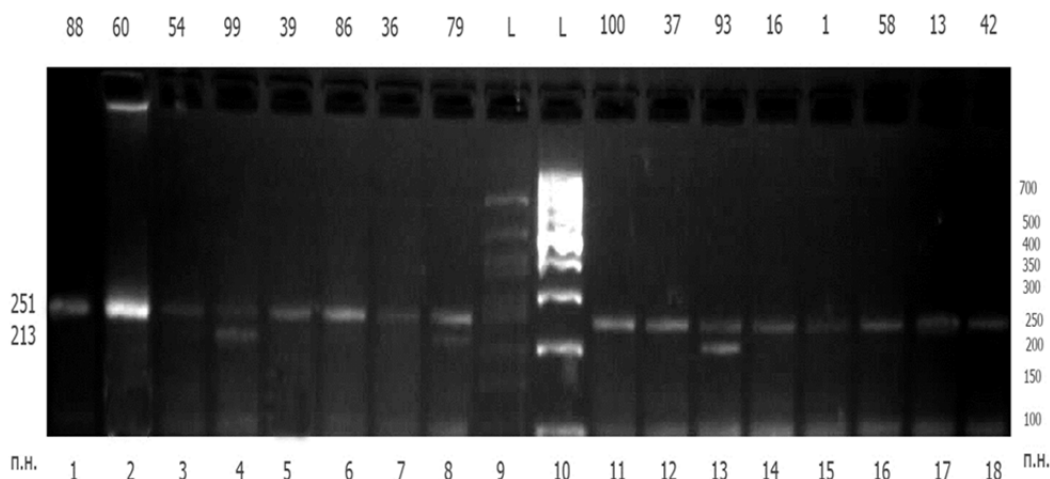


Рисунок – Электрофореграмма фрагментов рестрикции участка гена CSN2

Примечание – 1, 2, 3, 5, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18 – генотипы A2A2 (251 п.н.); 4, 8, 13 – генотипы A1A2 (251 и 213 п.н.); 9 – размерный маркер 50 + bp DNA Ladder; 10 – размерный маркер 100 bp DNA Ladder.

Визуализацию и анализ результатов осуществляли с помощью системы геледокументирования Quantum.

Результаты и их обсуждение. В результате молекулярно-генетического тестирования животных белорусской черно-пестрой породы был выявлен полиморфизм гена бета-казеина CSN2 и исследовано его влияние на молочную продуктивность.

Анализ полиморфизма 100 исследуемых животных по гену бета-казеина CSN2 показал, что в стаде большинство животных (76%) являются носителями генотипа CSN2^{A2A2}, 17% – CSN2^{A1A2} и только 7% – CSN2^{A1A1}. Частота встречаемости аллелей CSN2^{A2} и CSN2^{A1} составила 0,845 и 0,155 соответственно.

Результаты по молочной продуктивности коров за 305 дней лактации показали, что наибольшая величина удоя молока отмеча-

лась у коров с CSN2^{A1/A2} (5488,8±506,57 кг) и CSN2^{A2/A2} (5084,3±131,86 кг) генотипами. При этом гомозиготные коровы по аллели CSN2^{A1} отставали по удою от гетерозиготных особей (CSN2^{A1/A2}), разница составила более 1450 кг молока (P<0,01). По качественному составу молока (белок и жир) коровы разных генотипов различались незначительно (таблица 1).

Одним из важных качественных показателей физиологического состояния животных и их здоровья является состав крови. По данным биохимических показателей крови можно судить об интенсивности обменных процессов, следовательно, об уровне молочной продуктивности животных. Нами получены результаты биохимических показателей крови у исследуемых групп животных различных по генотипам гена бета-казеина (CSN2), позволяющие дать общую оценку состояния их организма (таблица 2).

Таблица 1. – Показатели качества молока животных белорусской черно-пестрой породы, дифференцированных по генотипам гена CSN2

генотип	голов, n	жир, %	белок, %	мочевина, %	удой за 305 дней, кг
CSN2 ^{A1/A1}	7	4,03±0,329**	3,97±0,133*	23,43±1,9**	4030±605,05**
CSN2 ^{A1/A2}	17	4,15±0,185**	3,92±0,098*	25,41±1,57**	5488,80±506,57**
CSN2 ^{A2/A2}	76	4,43±0,074**	3,86±0,042*	22,30±0,069**	5084,30±130,86**

Примечание – *P<0,05; **P<0,01

Таблица 2. – Результаты биохимических исследований крови

Показатель	Ед. изм.	Норма	I группа A1A1	II группа A1A2	III группа A2A2
Общий белок	г/л	72-86	82,66±3,35	85,62±2,65	79,44±6,39
Креатинин	мкмоль/л	62,0-97,0	75,94±8,85	77,1±3,23	82,96±9,94
Мочевина	ммоль/л	3,0-5,6	4,14±0,36	3,86±0,37	4,26±0,25
Общий билирубин	мкмоль/л	1,7-5,1	4,86±0,11	4,04±0,36	4,04±0,45
АлТ	Ед/л	7-35	25,68±10,82	25,86±3,23	35,58±5,82
АсТ	Ед/л	45-80	83,28±22,98	73,52±10,38	67,80±7,29
Щелочная фосфатаза	Ед/л	55-80	66,66±7,90	81,96±6,78	82,08±12,98
Кальций	ммоль/л	2,5-3,1	2,99±0,07	2,74±0,17	2,90±0,08
Магний	ммоль/л	0,9-1,5	1,22±0,07	1,30±0,06	1,07±0,09
Фосфор	ммоль/л	1,4-1,9	1,74±0,10	1,56±0,12	1,72±0,07
Общий холестерин	ммоль/л	4,5-6,0	4,56±0,55	4,64±0,07	4,38±0,07
Глюкоза	ммоль/л	2,0-2,7	2,78±0,18	2,86±0,15	2,88±0,08

Уровень общего белка в сыворотке крови исследуемых животных варьировал от 79,44 до 85,62 г/л. Из полученных данных видно, что наибольший показатель содержания уровня белка отмечался у животных с гетерозиготным генотипом (CSN2^{A1/A2} 85,62±2,65 г/л (99,55%)), что на 3,4 п.п. больше, чем у сверстников с гомозиготным генотипом по аллелю A1, и на 7,1 п.п. больше, чем у животных с гомозиготным генотипом по аллелю A2.

Креатинин в крови у исследуемой группы животных белорусской черно-пестрой породы находился в верхних пределах физиологической нормы. Наибольшее содержание креатина в крови отмечалось у КРС третьей группы (CSN2^{A2/A2} 82,96±9,94 мкмоль/л (85,52%)), что на 3,4 п.п. больше, чем у сверстников второй группы. Показатели креатинина у животных первой группы имели наименьший показатель, однако находились в пределах нормы.

По содержанию мочевины в крови показатели варьировали от 3,86 до 4,26 ммоль/л. Наибольшее содержание мочевины в крови наблюдается у животных с гомозиготным генотипом по аллелю A2 (CSN2^{A2/A2} (4,26±0,25 ммоль/л).

Уровень общего билирубина в крови у исследуемых групп животных белорусской черно-пестрой породы варьировал от 4,04 до 4,86 мкмоль/л в пределах нормы. Наименьший показатель содержания билирубина в крови отмечался у животных с гетерозиготным генотипом (CSN2^{A1/A2} (4,04±0,36 мкмоль/л (79,21%)) и гомозиготным генотипом по аллелю A2 (CSN2^{A2/A2} (4,04±0,45 мкмоль/л (79,21%)), что

на 16,08 п.п. меньше, чем у сверстников первой группы.

Содержание аланинаминотрансферазы (АлТ) в крови исследуемых животных находилось в пределах нормы, однако показатели АлТ животных с гомозиготным генотипом по аллелю A2 превосходили своих сверстников с альтернативными генотипами и составили 35,58±5,82 Ед/л.

Содержание трансаминазы (АсТ) в крови исследуемых животных белорусской черно-пестрой породы варьировало в интервале от 67,8 до 83,28 Е/л. Сравнивая животных с различными генотипами гена бета-казеина (CSN2) можно отметить, что наибольший показатель содержания трансаминазы отмечался у животных с гомозиготным генотипом по аллелю A1 (CSN2^{A1/A1} (83,28±22,98)), коровы же с гомозиготным генотипом по аллелю A2 (CSN2^{A2/A2} (67,80±7,29)) и гетерозиготным генотипом (CSN2^{A1/A2} (73,52±10,38)) находились в пределах нормы.

Уровень щелочной фосфатазы у исследуемых коров варьировал от 66,66 до 82,08 Ед/л и находился в пределах нормы. Наибольший показатель содержания уровня щелочной фосфатазы отмечался у животных с гомозиготным генотипом по аллелю A2 (CSN2^{A2/A2} (82,08±12,98)) и гетерозиготным генотипом CSN2^{A1/A2} (81,96±6,78). Показатели щелочной фосфатазы у группы животных с гомозиготным генотипом по аллелю A1 были значительно ниже, чем у сверстников с альтернативными генотипами, но находились в пределах нормы.

По содержанию кальция в сыворотке крови выявлены незначительные колебания от 2,74 до 2,99 ммоль/л. Сравнения содержа-

ние кальция в крови у КРС белорусской черно-пестрой породы, можно отметить, что наибольшее содержание отмечалось у коров с гомозиготным генотипом по аллелю A1 (CSN2^{A1/A1}(2,99±0,07)) и гомозиготным генотипом по аллелю A2 (CSN2^{A2/A2}(2,90±0,08)), в то время как показатели кальция у сверстников с гетерозиготным генотипом были ниже, но находились в пределах нормы.

Уровень магния в крови исследуемых животных белорусской-черной пестрой породы находился в норме. Наибольший показатель уровня магния отмечался у коров с гетерозиготным генотипом (CSN2^{A1/A2}(1,30±0,06)) и гомозиготным генотипом по аллелю A1 (CSN2^{A1/A1}(1,22±0,07)).

Содержание фосфора в крови у всех исследуемых животных находилось в пределах нормы и составило 1,56–1,74 ммоль/л.

Уровень общего холестерина в сыворотке крови исследуемой группы животных варьировал от 4,38 до 4,64 ммоль/л. Сравнивая животных с различным генотипом гена бета-казеина (CSN2) можно отметить, что наименьший показатель содержания уровня холестерина отмечался у животных с гомозиготным генотипом по аллелю A2 (CSN2^{A2/A2}(4,38±0,07 ммоль/л), в то время как у групп животных с альтернативными генотипами показатели общего холестерина были выше, но находились в пределах нормы.

Содержание глюкозы в крови у всех исследуемых групп животных с различными генотипами по гену бета-казеина (CSN2) варьировало от 2,78 до 2,88 ммоль/л, что незначительно превышает норму.

Заключение.

1. Проведена ДНК-диагностика трех генотипов, сформированных нормальным β-CNA2 и мутантным β-CNA1 аллелями. Показана встречаемость генотипов и аллелей в локусе бета-казеина у исследованных коров белорусской черно-пестрой породы, наиболее широко разводимой в условиях Беларуси. Выявлена необходимость осуществления строгого генетического контроля используемого генетического материала в этой области.

2. Выявлена ассоциация полиморфизма гена CSN2 с молочной продуктивностью крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы. Результаты по молочной продуктивности коров за 305 дней лактации показали, что наибольшая величина удоя молока отмечалась у коров с CSN2^{A1/A2} и CSN2^{A2/A2} генотипами. При этом гомозигот-

ные коровы по аллели CSN2^{A1} отставали по удою от своих сверстников с альтернативными генотипами на 1450 и 1050 кг соответственно.

3. Достоверных различий между генотипами гена CSN2 по биохимическим показателям сыворотки крови у исследуемой группы животных не обнаружено. В целом, содержание изученных компонентов в сыворотке крови соответствует физиологическим нормам, что свидетельствует о высоком уровне приспособления животных к изменяющимся внешним условиям (кормление, содержание, климат).

Список литературы

1. Валитов, Ф. Р. Полиморфизм гена бета-казеина коров плановых пород Республики Башкортостан / Ф. Р. Валитов, Л. Ф. Давлетова // Аграрная наука в инновационном развитии АПК: материалы Международной научно-практической конференции в рамках XXVI Международной специализированной выставки «Агрокомплекс-2016». – Ч. II. – Уфа, 2016. – С. 27–30.
2. Иргашев, Т. А. Гематологические показатели бычков разных генотипов в горных условиях Таджикистана / Т. А. Иргашев, В. И. Косилов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2014. – № 1 (45). – С. 89–91.
3. Kamiński, S. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health / S. Kamiński, A. Cieslińska, E. Kostyra // J. Appl. Genet. – 2007. – № 48. – P. 189–198.

References

1. Valitov F.R., Davletova L.F. Polimorfizm gena beta-kazeina korov planovy`kh porod Respubliki Bashkortostan [Polymorphism of the beta-casein gene of planned cows in the Republic of Bashkortostan]. *Agrarnaya nauka v innovaczi-onnom razviti` APK* [Agrarian science in the innovative development of the agro-industrial complex: materials of the International scientific and practical conference in the framework of the XXVI International specialized exhibition «Agrocomplex – 2016»]. Part II. Ufa, 2016, pp. 27–30. (In Russian)
2. Irgashev TA, Kosilov V.I. Gematologicheskie pokazateli by`chkov razny`kh genotipov v gorny`kh usloviyakh Tadjikistana [Hematological indicators of bulls of different geno-

types in mountainous conditions of Tajikistan]. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Bulletin of the Orenburg State Agrarian University]. 2014, no. 1 (45), pp. 89–91. (In Russian)

3. Kamiński S., A. Cieslińska, E. Kostyra Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J. Appl. Genet.* 2007, no. 48, pp. 189–198.

Received 1 April 2021