

ДНК-ДИАГНОСТИКА ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

А.В. Пикунова, Н.Г. Друшляк, В.И.Крюков

//«Развитие инновационного потенциала агропромышленного производства» Матер. Всерос. научно-практ. конф., 24.11.2010 г. –Орёл, Изд-во ОрёлГАУ, 2010. –С. 140-143.

Ген каппа-казеина (**CSN3**) – один из немногих известных генов, однозначно связанных с признаками белкомолочности и технологическими свойствами молока. В разных популяциях КРС обнаружено 6 различных аллелей (**A, B, E, F, C, G**). Наиболее часто встречаемыми являются аллели **A** и **B** [7]. **B**-аллель гена каппа-казеина ассоциирован с более высоким содержанием белка в молоке, более высоким выходом творога и сыра, а также лучшими коагуляционными свойствами молока. Установлено, что высококачественные твёрдые сыры могут быть изготовлены только из молока, полученного от коров, имеющих генотип **BB** каппа-казеина [2].

В настоящее время генотипирование животных все чаще выполняют с использованием ДНК-диагностики, которая позволяет идентифицировать генотипы молочных белков не только у маточного поголовья, но и у быков-производителей и молодняка. Это даёт возможность интенсифицировать селекционный процесс.

Перед лабораторией генетики ИНИИЦ ОрёлГАУ поставлен широкий спектр задач по организации генетического мониторинга сельскохозяйственных животных области. Проведение диагностики КРС на носительство **B**-аллеля гена каппа казеина является одной из задач этого спектра. В данном сообщении излагаются итоги отладки методики проведения анализа и первые результаты выполненных исследований.

Материалом для исследований служила кровь КРС чёрнопёстрой и симментальской пород и их гибридов СХ ИНВЕСТ СП «Никольское» Ливенского района Орловской области и ОАО «Орловское» по племенной работе. Проанализированы генотипы 21 животного.

Генотипы каппа-казеина определяли методом ПЦР-ПДРФ-анализа. ДНК выделяли из крови животных с использованием набора D1Atom DNAPrep (Биоком, Россия).

Аmplификацию проводили с помощью набора GenPak PCR Core (Биоком, Россия) с праймерами VAR 5: ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG и VAR3: TTT ATT AAT AAG TCC ATG AAT CTT на приборе MyCycler (BioRad, США). Регуляцию температурного режима выбирали по пробирке (Algorithmic mode) в объёме 23 мкл: денатурация – 30 сек при 94 °С; отжиг праймеров – 30сек при 50 °С ; синтез – 1 мин при 72⁰ С (35 циклов).

Аликвоту амплификата 10 мкл обрабатывали 20 ед. эндонуклеазы рестрикции *Hind* III в 1×буфере «W» с добавлением BSA (СибЭнзим, Россия) и инкубировали при 37 °С течение минимум 1 часа. Фрагменты разделяли в 2% агарозном геле и визуализировали в УФ после окрашивания бромистым этидием. Результаты фиксировали с помощью компьютерной видеосистемы Gel Doc (BioRad, США).

Аллель **A** не имеет сайта рестрикции для рестриктазы *Hind* III. Поэтому после рестрикции **A**-аллелей изначальный ПЦР продукт размером 532 пн остаётся неизменным (рис. 1). Аллель **B** имеет сайт рестрикции для рестриктазы *Hind* III; поэтому в результате рестрикции ПЦР фрагмент размером 532 пн «разрезается» на два фрагмента: 377 и 155 пн. Присутствие трёх фрагментов на геле после рестрикции (размером 532, 377 и 155 пн) свидетельствует, что данный генотип гетерозиготен и имеет оба аллеля АВ.

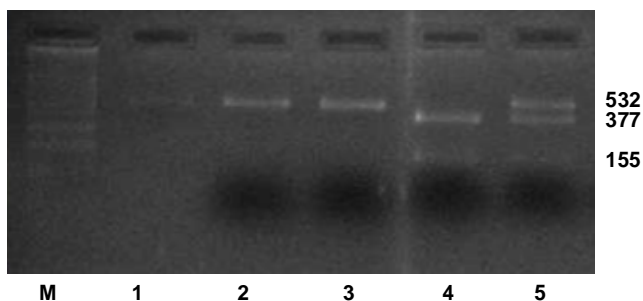


Рисунок 1. Результаты рестрикции амплификатов с использованием эндонуклеазы *Hind* III. Обозначения: М – маркер молекулярного веса; 1, 2, 3 – генотипы AA; 4 – генотип BB; 5 – генотип АВ.

Анализ крови животных позволил установить полиморфизм исследованных животных по гену каппа-казеина. Обнаружены генотипы AA (12 особей), BB (2 особи) и АВ (7 особей). Проанализированная выборка недостаточна для обобщений, но на дефицит генотипов BB среди проанализированных животных следует обратить внимание.

Внедрение метода ДНК-диагностики крупного рогатого скота разводимого в области, позволит получить более полную информацию о частотах аллелей гена CSN3 в племенных стадах. Использование этого маркера позволит более интенсивно проводить селекцию, направленную на создание стад с высокими технологическими свойствами молока, пригодного для получения высококачественных сыров и других белкомолочных продуктов. Проведение же селекции КРС по аллелям гена каппа-казеина необходимо потому, что белок контролируемый аллелем CSN3B, имеет ряд отличительных особенностей по сравнению с аллелем CSN3A: различие в размере мицелл, более высо-

кое содержание протеина, большую стабильность при нагревании и замораживании, лучшие свойства для сыроделия (более короткое время коагуляции, коагулят более плотной консистенции и более высокий выход сыра – на 5-10%). Животные с гомозиготным генотипом CSN3BB превосходят по содержанию белка на 0,2–0,4% животных других генотипов [3, 4, 5]. В ряде стран запись в племенную карточку животного результата ДНК-тестирования по данному гену является обязательной [6]. Отечественным селекционерам крупного рогатого скота следует принять эту практику.

Литература

1. Калашникова Л. А. Перспективы улучшения технологических свойств молока коров черно-пестрой породы с использованием ДНК-маркеров по гену каппа-казеина // Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных: Материалы междунар. науч. конф. – Дубровицы: ВИЖ, - 2004. - С. 12-18.
2. Димань Т. М. Поліморфна система κ-казеїну, її зв'язок із продуктивними якостями великої рогатої худоби // Вісник аграрної науки. - 1998. - С. 33-35.
3. Зиновьева Н. А., Гладырь Е. А., Коновалова Е.Н., Костюнина О. В., Сельцов В.И. Методические рекомендации по использованию молекулярно-генетических тест-систем для анализа полиморфизма генов белков молока у крупного рогатого скота. -Дубровицы: ВИЖ, 2005. -35с.
4. Ковалева Т.П. Молочная продуктивность первотелок с различными генотипами каппа-казеина // Молочное и мясное скотоводство. - 2008. - №2.- С.18-19.
5. Епишко Т.И., Курак О.П. Поліморфізм гена каппа-казеїна різних популяцій крупного рогатого скота чорно-пестрої породи. // Весці Нацыянальнай Акадэмі Навук Беларусі. Серія аграрных навук. - 2008. - №3. - С. 70-75.
6. Зиновьева Н. А., Гладырь Е. А., Костюнина О. В. ДНК-диагностика полиморфизма генов – белков молока крупного рогатого скота // Методы исследований в биотехнологии с.-х. животных. - 2004. - С. 7–22.