

**ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА КАПА-КАЗЕЇНУ У КОРІВ РІЗНИХ ПОРІД
МОЛОЧНОГО НАПРЯМУ ПРОДУКТИВНОСТІ**

І. Д. МІТІОГЛО, аспірант*

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН

E- mail: ilia.mitioglo77@gmail.com

<https://doi.org/10.31548/dopovidi2021.05.009>

Анотація. Генетичний поліморфізм білків молока, зокрема капа-казеїну, викликає значний дослідницький інтерес через можливі його асоціації з економічно важливими ознаками молочної худоби.

Метою дослідження було визначення поліморфізму гена капа-казеїну та його асоціації з ознаками молочної продуктивності у корів різних порід. Поліморфізм гена капа-казеїну досліджували в корів української червоно-рябої молочної (УЧерМ), української чорно-рябої молочної (УЧРМ), монбельярдської (М) порід і кросбредних корів, отриманих від схрещування корів української червоно-рябої молочної породи із монбельярдськими бугаями. ДНК-дослідження проведені у відділі генетики й біотехнології тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН з використанням методу ПЛР-ПДРФ.

У результаті досліджень виявлено три генотипи гена капа-казеїну: АА, АВ, ВВ. Генотипи АА і АВ виявлено в усіх досліджених групах корів, генотип ВВ зустрічався лише у корів монбельярдської породи з частотою 0,366. Найвищий надій за 305 днів першої лактації серед усіх досліджених корів був у кросбредних корів з генотипом АВ (7029 кг), найнижчий – у кросбредних тварин з генотипом АА (6359 кг). За розподілом генотипів і алелів гена капа-казеїну вітчизняні породи УЧРМ і УЧерМ подібні за генетичною структурою і мають низьку концентрацію В-алельного варіанту, очевидно, завдяки тому, що створення цих порід відбувалось шляхом відтворювального схрещування з голштинською породою, у популяціях якої відсоток цього алеля досить низький. Наявність у досліджених груп первісток саме таких генотипів визначається особливостями селекційної роботи у стаді ДП «ДГ “Нива” Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН». Результати досліджень генотипів та алелів гена капа-казеїну є додатковою генетичною характеристикою тварин, що дає можливість створення стад з бажаними ознаками молочної продуктивності

Ключові слова. капа-казеїн, поліморфізм, велика рогата худоба, ПЛР- ПДРФ

Актуальність. В останні роки генетичний поліморфізм білків молока викликає значний дослідницький інтерес через можливі

асоціації між генотипами молочних білків та економічно важливими ознаками молочної худоби. Науковці повідомляють, що певні варіанти

* Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук Дзіцюк Валентина Валентинівна

Мітїогло І. Д.

молочного білка можуть бути пов'язані з рівнем надою [4], складом молока [9] та виробництвом сиру [8]. Тому гени білків молока можуть бути корисними як генетичні маркери для додаткових критеріїв відбору в молочному скотарстві. Такими є гени, що кодують казеїни – групу білків, які присутні у молоці усіх видів ссавців і їх частка у загальній кількості білкових речовин молока становить близько 80 %. Одним із генів, які контролюють вихід та якість молока і молочних продуктів є ген капа-казеїну. У зв'язку з цим він представляє собою важливий селекційний критерій для оцінки молочних порід великої рогатої худоби.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Казеїни існують у формі чотирьох фракцій – α , β , γ , κ [2] і різняться за розчинністю, чутливості до іонів кальцію і за фізико-хімічними властивостями. Капа-казеїн (CSN3, κ -Cn) є єдиною фракцією, яка руйнується під дією сичужного ферменту і здатна стабілізувати казеїновий комплекс молока. Основою білкового поліморфізму капа-казеїну є одиничні амінокислотні заміни.

Ген κ -казеїну містить послідовність 13 kb, розділену на 5 екзонів [1]. Вченими виділено 7 алелей гена капа-казеїну: А, В, С, Е, F, G, Н. Найчастіше зустрічаються алельні варіанти А і В, які відрізняються за амінокислотами:

варіант А має амінокислотну заміну триптофана на ізолейцин, В – аспарагіну на аланін [1]. Встановлено, що алель В асоціюється з термічним опором, меншим часом згортання, кращими властивостями сиру. Вихід сиру з молока корів з генотипом ВВ на 10 % вищий у порівнянні з коровами з генотипом АА [3], що є важливим чинником у розведенні молочної худоби.

Метою нашого дослідження було визначення можливого поліморфізму гена капа-казеїну та його асоціації з характеристиками молочної продуктивності у корів різних порід, що розводяться у ДП «ДГ «Нива» Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН».

Матеріали і методи дослідження. Поліморфізм гена капа-казеїну досліджували у корів української червоно-рябої молочної (УЧерМ), української чорно-рябої молочної (УЧРМ), монбельярдської (М) і кросбредних корів, отриманих від схрещування місцевих корів української червоно-рябої молочної породи із монбельярдськими бугаями.

ДНК дослідження проведені у відділі генетики і біотехнології тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН. Для проведення досліджень використовували зразки крові. Поліморфні варіанти гена капа-казеїну досліджували методом ПЛР-ПДРФ.

Мітїогло І. Д.

Виділення ДНК проводили з використанням стандартного набору «ДНК-сорб» («Амплі-Сенс», РФ). Для здійснення ПЛР використовували реакційну суміш (10 мкл): 5,6 мкл деіонізованої води, 1,5 мкл буфера ПЛР, 0,5 мкл dNTP, 0,8 мкл двох

праймерів, 0,1 мкл Tag-полімерази, 1,5 мкл ДНК. Ампліфікацію фрагменту гена капа-казеїну проводили з використанням специфічних праймерів (S. Rinder, 1991), (табл.1).

1. Умови ПЛР-дослідження поліморфізму гена капа-казеїну

Блок молока	Праймер	ПЛР профіль			ПЛР продукт	Рестрик таза
Капа-казеїн	5'-GAAATCCSTACCATCAATACC-3' 5'CCATCTAC STAGTTTAGATG-3'	94 ⁰ C	3 хв	30 циклів	273 пн	Hinf I
		94 ⁰ C	30 с			
		58 ⁰ C	30 с			
		72 ⁰ C	30 с			
		72 ⁰ C	5 хв			

Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу у 2 % агарозному гелі після фарбування гену бромистим етидієм. Візуалізацію здійснювали на транслюмінаторі в УФ-світлі з наступним фотографуванням електрофореграм цифровою камерою. Диференціацію ампліконів за розмірами проводили за допомогою маркера молекулярних мас Ladder Low Range.

Дані про молочну продуктивність корів-первісток аналізували за результатами контрольних доїнь корів-первісток досліджених порід.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за використання методів математичної статистики та за допомогою стандартних комп'ютерних програм.

Результати досліджень та їх обговорення. Продуктом ПЛР гена

капа-казеїну з використанням специфічних праймерів (CSN3-F та CSN3-R) був фрагмент ДНК 273 п.н. Його розщеплення за допомогою рестрикційної ендонуклеази HinfI призвело до утворення чотирьох фрагментів, тобто 224, 133, 91 та 49 п.н. (рис. 1).

Три фрагменти розміром 133, 91, 49 п.н. являють собою гомозиготний генотип AA, фрагменти розміром 224 і 49 п.н. – генотип BB, 224, 133, 91, 49 – гетерозиготи AB за геном капа-казеїну.

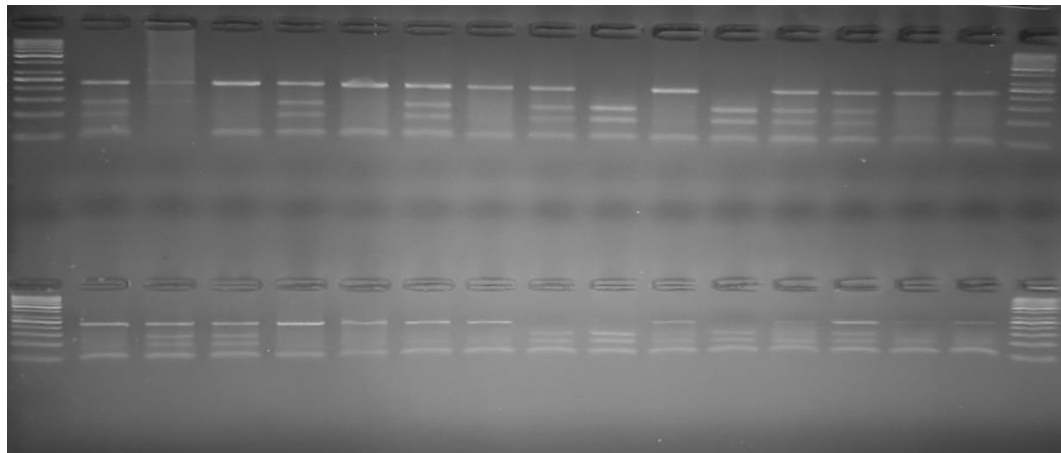
У результаті досліджень виявлено три генотипи: AA, AB, BB. В усіх досліджених групах корів-первісток виявлено генотип AA з частотою від 0,166 у первісток монбельярдської породи до 0,588 у УЧРМ. Генотип BB виявлено лише у корів монбельярдської породи, у порід УЧРМ, УЧеРМ та у

Мігіогло І. Д.

кросбредних особин він відсутній

(табл.2).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



M AB AB AB AB AB AB AB AB AA AB AA AB AB AB AB ПЛР

Рис. 1. Продукти рестрикції фрагмента гена капа-казеїна. Доріжки: 1 – маркер молекулярних мас; 2-15 генотипи тварин; 19 – ПЛР-продукт, 273 п.н.

2. Частоти генотипів і алелів за локусом капа казеїну у досліджених груп корів-первісток

порода	геноти п	Кількіс ть тварин	Частота генотип у	алель	Частота алелю	χ^2	Гетерозиготність	
							фактичн а (Hobs)	очікувана (Hex)
УЧеРМ	AA	16AA	0,533	A	0,766	4,87	0,466	0,359
	AB	14	0,466	B	0,233			
	BB							
УЧРМ	AA	10	0,588	A	0,794	2,48	0,411	0,328
	AB	7	0,411	B	0,205			
	BB	-	-					
М	AA	5	0,166	A	0,400	0,02	0,467	0,480
	AB	14	0,466	B	0,600			
	BB	11	0,366					
УЧеРМ×М	AA	8	0,381	A	0,690	4,7	0,619	0,428
	AB	13	0,619	B	0,309			
	BB							

Мітїогло І. Д.

Гетерозиготний генотип АВ виявлений в усіх досліджених групах корів з різною частотою. Так, у корів монбельярдської породи він зустрічався майже у три рази частіше, ніж генотип АА. У групах корів УЧеРМ і УЧРМ частота гетерозиготного генотипу АВ поступалась гомозиготному АА відповідно на 12 % і 30 %.

Встановлено, що частота алеля А найвища 0,766 у первісток УЧРМ, тоді як найнижчою (0,400) вона є у корів монбельярдської породи. Алель В, що важливо для переробних властивостей молока, у корів УЧеРМ і УЧРМ присутній лише в гетерозиготах АВ з невеликою різницею. У кросбредних тварин частота гетерозиготних генотипів АВ на чверть вища порівняно із УЧеРМ, однак у них теж відсутній бажаний ВВ-варіант. У корів монбельярдської породи гомозиготний генотип ВВ виявлений з частотою 0,366 наряду з гетерозиготним генотипом АВ з частотою 0,466, що свідчить про значну перевагу бажаного алелю В у даній дослідженій групі тварин.

Як свідчить аналіз результатів дослідження, фактична гетерозиготність (Hobs) за геном капа-казеїну у УЧеРМ і помісей перевищує значення очікуваної (Hex). У корів монбельярдської і УЧРМ порід спостерігається невелика перевага Hex. Очікувані та передбачувані частоти генотипів статистично не відрізняють у жодній

з досліджених груп. Значення хі-квадрат свідчить, що у досліджених групах корів немає статистично достовірного зсуву генетичної рівноваги за жодним із генотипів. Наряду з цим, гетерозиготизація за локусами капа-казеїну відбувається нерівномірно, у ній більша частка алелю А, що свідчить про тенденцію зникнення В алелю.

У літературних джерелах є повідомлення про зниження частоти алелю В гена капа-казеїну у породах молочної худоби, а в окремих породах про повну його відсутність [11]. Так, Кучерова та ін. [7] повідомили, що алель А (0,60) зустрічається частіше, ніж В (0,38) серед чеської сентиментальної худоби. Подібні висновки щодо частоти алелів та генотипів серед чеської популяції великої рогатої худоби повідомили Voleckova et al. [5]. Curi R.A. et al. [6] виявили більш високу частоту алелю А серед великої рогатої худоби симентальської та абердин-ангуської порід. Результати досліджень Trakovická A. et al. [10] свідчать, що алель А серед помісних корів симентальської та голштинської порід зустрічався частіше, ніж алель В. Результати нашого дослідження узгоджуються з повідомленнями цих авторів.

Аналіз молочної продуктивності показав, що найвищий надій за 305 днів першої лактації був у кросбредних корів з генотипом АВ і переважав з достовірною різницею

Мітїогло І. Д.

($p < 0,001$) аналогічний показник корів цієї ж групи з генотипом АА на 670 кг. Рівень надою у корів з генотипами АА і АВ у первісток УЧеРМ і УЧеРМ мало відрізнявся.

У групі первісток монбельярдської породи вищий рівень надою асоційований із капа-казеїновим генотипом ВВ (6938 кг) і переважав надій корів з генотипом

АА на 288 кг із статистично значущою різницею ($p < 0,01$). Від корів порід УЧеРМ, УЧРМ, М з гетерозиготним генотипом АВ отримано вищий надій на 47-56 кг відповідно, ніж від тварин із генотипом АА. У групі корів УЧеРМ×М різниця між генотипами АВ і АА виявилась суттєво значущою ($p < 0,05$) – 670 кг.

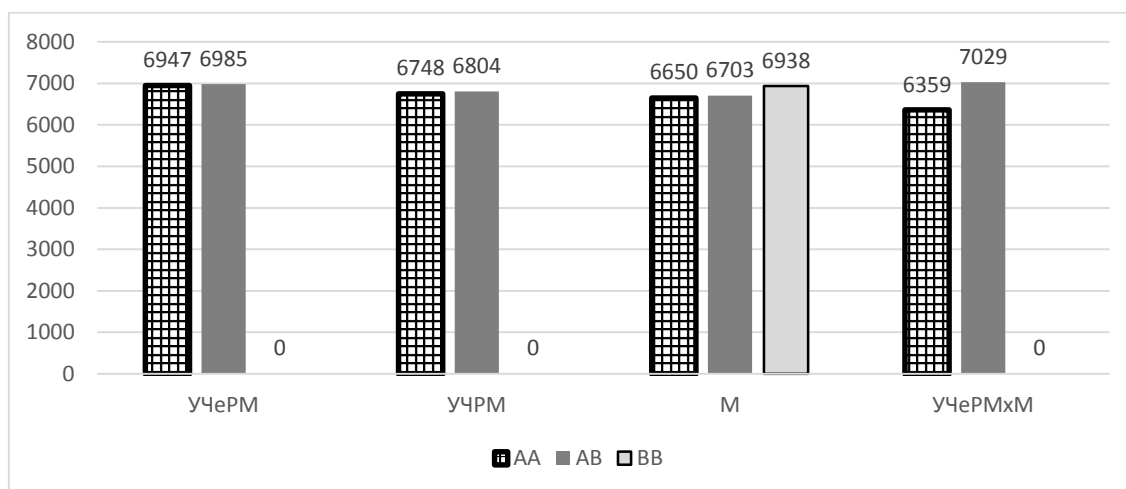


Рис. 2. Надій корів-первісток УЧеРМ, УЧРМ, М і УЧеРМ×М з різними варіантами генотипів за геном капа-казеїну

Отже, можна зазначити, що генотипи АВ можуть мати більший вплив на певні лактогенні ознаки корів молочного напрямку продуктивності.

Висновки і перспективи.

Отримані результати щодо поліморфізму гена капа-казеїну у вітчизняних порід УЧРМ і УЧеРМ свідчать про те, що їх генетична структура за розподілом його варіантів генотипів і алелів і низькою концентрацією В-алельного варіанту подібна, очевидно, завдяки тому, що створення цих порід відбувалось шляхом відтворювального схрещування з голштинською

породою, у популяціях яких відсоток алеля гена капа-казеїна ВВ досить низький. У корів монбельярдської породи концентрація В-алельного варіанту двічі вища за концентрацію А-варіанту. Наряду з цим у генотипах кросбредних корів, отриманих від схрещування корів УЧеРМ з монбельярдськими бугаями відсутній гомозиготний варіант ВВ, хоча гетерозиготний генотип майже вдвічі переважає гомозиготний АА, що все-

Мітюрло І. Д.

таки свідчить про вищу концентрацію алелю В порівняно із тваринами порід УЧерМ і УЧРМ. Наявність у дослідженої популяції саме таких генотипів визначається особливостями селекційної роботи у стаді ДГ “Нива”, яка проводиться відповідно до визначеного напрямку продуктивності. Результати наших

досліджень, як і досліджень інших авторів, свідчать що інформація щодо розподілу варіантів генотипів та алелів гена капа-казеїну є додатковою характеристикою стад, що дає змогу селекціонерам створити стада з бажаними ознаками молочної продуктивності.

Список використаних джерел

1. Alexander L.J., Stewart A.F., Mackinlay A.G., Kapelinskaya T.V., Tkach T.M. Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. *Eur J Biochem.* 1988. Vol. 178. No. 2. P.395-401. 5
2. Alipanah M, Kalashnikova L, Rodionov G. Kappa-casein genotypic frequencies in Russian breeds Black and Red Pied cattle. *Iran. J. Biotec.* 2005. No.3. P.191–194.
3. Azevedo A.L., Nascimento C.S., Steinberg R.S., Carvalho M.R., Peixoto M.G., Teodoro R.L., Verneque R.S., Guimarães S.E., Machado M.A. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genet Mol Res.* 2008. Vol. 7. No. 3. P.623- 630.
4. Bech A.M., Kristiansen K.R. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield. *J Dairy Sci* 1990. No.57. P. 53-63.
5. Boleckova J., Matejickova J., Stipkova M., Kyselova J., Barton L. The association of five polymorphisms with milk production traits in Czech Fleckvieh cattle. *Czech J. Anim. Sci.*, 2012. No. 57. P. 45-53.
6. Curi R.A., Oliveira H.N.D., Gimenes M.A., Silveira A.C., Lopes C.R. Effects of CSN3 and LGB gene polymorphisms on production traits in beef cattle. *Gen. Mol. Biol.* 2005. No. 28. P. 262–266.
7. Kučerová J, Metějčková A, Jandurová OM, Sørensen P, Němcová E, Stipková M, Kott T, Bouška J, Frelich J. Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech J. Anim. Sci.* 2006. No. 51. P:241–247.

8. Ng-Kwai-Hang K.F. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationship with production traits, milk composition and technological properties. *Can J Anim Sci* 1998. Vol. 78 (Suppl). P.131-147.
9. Robitaille G., Britten M., Morisset J., Petitclerc D. Quan-titative analysis of β -lactoglobulin A and B genetic variants in milk of cows β -lactoglobulin AB throughout lactation. *J Dairy Sci.* 2002. Vol. 69. P. 651-65.
10. Trakovická A, Moravčíková N, Navrátilová A. Kappa-casein gene polymorphism (CSN3) and its effect on milk production traits. *Acta fytotechnica et zootechnica. Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae;* 2012. No. 3. P. 61–64.
11. Журавель Е.В., Глазко В.И. Полиморфизме по локусу к-казеїна молока у різних порід крупного рогатого скота. *Сельскохозяйственная биология.* 1999. № 2. С. 120-124.

References

1. Alexander L.J., Stewart A.F., Mackinlay A.G., Kapelinskaya T.V., Tkach T.M. (1988). Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. *Eur J Biochem.* Vol. 178. No. 2. P.395-401.
2. Alipanah M, Kalashnikova L, Rodionov G. (2005). Kappa-casein genotypic frequencies in Russian breeds Black and Red Pied cattle. *Iran. J. Biotec.* No.3. P.191–194.
3. Azevedo A.L., Nascimento C.S., Steinberg R.S., Carvalho M.R., Peixoto M.G., Teodoro R.L., Verneque R.S., Guimarães S.E., Machado M.A. (2008). Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genet Mol Res.* Vol. 7. No. 3. P.623- 630.
4. Bech A.M., Kristiansen K.R. (1990). Milk protein polymorphism in Danish dairy

Митиогло І. Д.

cattle and the influence of genetic variants on milk yield. J Dairy Sci No.57. P. 53-63.

5. Boleckova J., Matejickova J., Stipkova M., Kyselova J., Barton L. (2012). The association of five polymorphisms with milk production traits in Czech Fleckvieh cattle. Czech J. Anim. Sci., No. 57. P. 45-53.

6. Curi R.A, Oliveira H.N.D., Gimenes M.A., Silveira A.C., Lopes C.R. (2005). Effects of CSN3 and LGB gene polymorphisms on production traits in beef cattle. Gen. Mol. Biol. No. 28. P. 262–266.

7. Kučerová J, Metějčíková A, Jandurová OM, Sørensen P, Němcová E, Stipková M, Kott T, Bouška J, Frelich J. (2006). Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. Czech J. Anim. Sci. No. 51. P:241–247.

8. Ng-Kwai-Hang K.F. (1998). Genetic polymorphism of milk proteins: Relationship with production traits, milk composition and technological properties. Can J Anim Sci Vol. 78 (Suppl). P.131-147.

9. Robitaille G., Britten M., Morisset J., Petitclerc D. (2002). Quantitative analysis of β -lactoglobulin A and B genetic variants in milk of cows β -lactoglobulin AB throughout lactation. J Dairy Sci. Vol. 69. P. 651-65.

10. Trakovická A, Moravčíková N, Navrátilová A. (2012). Kappa-casein gene polymorphism (CSN3) and its effect on milk production traits. Acta fytotechnica et zootechnica. Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae; No. 3. P. 61–64.

11. Zhuravel E.V., Hlazgo V.Y. (1999). Polymorfizme po lokusu κ -казейна молака у различных пород крупного рогатого скота. Selskokhoziaistvennaia byolohiya. № 2. С. 120-124 (in Russian).

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА У КОРОВ РАЗНЫХ ПОРОД МОЛОЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ

И. Д. Митиогло

Аннотация. Генетический полиморфизм белков молока, в частности каппа-казеина, вызывает значительный исследовательский интерес из-за возможных его ассоциаций с экономически важными признаками молочного скота.

Целью исследования было определение полиморфизма гена каппа-казеина и его ассоциации с признаками молочной продуктивности у коров разных пород. Полиморфизм гена каппа-казеина исследовали у коров украинской красно-рябой молочной (УЧерМ), украинской черно-рябой молочной (УЧРМ), монбельярдської (М) пород и кросбредних коров, полученных от скрещивания коров украинской красно-рябой молочной породы с монбельярдскими быками. ДНК-исследования проведены в отделе генетики и биотехнологии животных Института разведения и генетики животных имени ГО Зубец НААН с использованием метода ПЦР-ПДРФ.

В результате исследований выявлено три генотипа гена каппа-казеина: АА, АВ, ВВ. Генотипы АА и АВ обнаружено во всех исследованных группах коров, генотип ВВ встречался только у коров монбельярдської породы с частотой 0,366. Самый высокий надой за 305 дней первой лактации всех исследованных коров был в кросбредных коров с генотипом АВ (7029 кг), самый низкий - в кросбредных животных с генотипом АА (6359 кг). По распределению генотипов и аллелей гена каппа-казеина отечественные породы УЧРМ и УЧерМ подобные по генетической структуре и имеют низкую концентрацию В-аллельного варианта, очевидно, благодаря тому, что создание этих пород происходило

Мітіогло І. Д.

путем воспроизводительного скрещивания с голштинской породой, в популяциях которой процент этого аллеля достаточно низкий. Наличие в исследованных групп первенец именно таких генотипов определяется особенностями селекционной работы в стаде ГП «ОХ» Нива "Института разведения и генетики животных имени М.В. Зубца НААН ». результаты исследований генотипов и аллелей гена каппа-казеина является дополнительной генетической характеристикой животных, дает возможность создания стад с желательными признаками молочной продуктивности

Ключевые слова: каппа-казеин, полиморфизм, крупный рогатый скот, ПЦР ПДРФ

CAPA-CASEIN GENE POLYMORPHISM IN COWS OF DIFFERENT BREEDS OF DAIRY PRODUCTIVITY

I. D. Mitioglo

Abstract. Genetic polymorphism of milk proteins, in particular kappa-casein, is of considerable research interest due to its possible associations with economically important traits of dairy cattle.

The aim of the study was to determine the polymorphism of the kappa-casein gene and its association with signs of milk productivity in cows of different breeds. Polymorphism of the kappa-casein gene was studied in cows of Ukrainian red-spotted dairy (UCHERM), Ukrainian black-spotted dairy (UHRM), Montbeliard (M) breeds and crossbred cows obtained by crossing cows of Ukrainian red-spotted dairy breed with Mongolians. DNA studies were performed in the Department of Animal Genetics and Biotechnology of the Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets NAAS using the PCR-RFLP method.

As a result of research, three genotypes of the kappa-casein gene were identified: AA, AB, BB. Genotypes AA and AB were found in all studied groups of cows, genotype BB was found only in cows of Montbeliard breed with a frequency of 0.366. The highest hopes for 305 days of the first lactation among all studied cows were in crossbred cows with genotype AB (7029 kg), the lowest - in crossbred animals with genotype AA (6359 kg). According to the distribution of genotypes and alleles of the kappa-casein gene, domestic breeds of UHRM and UCHERM are similar in genetic structure and have a low concentration of B-allelic variant, apparently due to the fact that these breeds were created by reproductive crossing with Holstein breed, in populations of which this allele quite low. The presence of such genotypes in the studied groups of first-borns is determined by the peculiarities of selection work in the herd of SE "DG" Niva "of the Institute of Animal Breeding and Genetics named after MV Tooth of NAAS ». Research results genotypes and alleles of the kappa-casein gene is an additional genetic characteristic of animals, which makes it possible to create herds with the desired characteristics of milk productivity

Keywords: kappa-casein, polymorphism, cattle, PCR-RFLP