

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ И ГЕНОДИАГНОСТИКА АЛЛЕЛЕЙ В ЛОКУСЕ БЕТА-КАЗЕИНА У ХОЛМОГОРСКОЙ И ЯРОСЛАВСКОЙ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

¹Марзанова С.Н., ²Ходарович Ю.М., ¹Девришов Д.А., ³Молодцова В.В.,

⁴Алексеев Я.И., ⁴Коновалова Н.В., ⁵Марзанов Н.С.

¹Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии-МВА им. К.И. Скрябина; ² Институт биоорганической
химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ³РГУСП Коми
по племенной работе, Сыктывкар, Республика Коми; ⁴ООО НПФ Синтол,
Москва, Российская Федерация; ⁵ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Подольск-Дубровицы
Московской области, Российская Федерация

Белки молока жвачных животных кодируются высоко полиморфными генами. В последние годы возрос интерес к генетическому полиморфизму основных белков молока, появилась международная программа «Геном молока». Цель исследования - разработка тест-системы для выявления нормальных и мутантных аллелей в локусе бета-казеина CSN2 и проведение генодиагностики четырех аллелей этого локуса у двух пород крупного рогатого скота с использованием технологии аллельспецифичных TaqMan зондов. Для проведения биоинформативного анализа часть материалов были взяты из баз данных OMIA (Австралия) и NCBI (США). На основе разработанной методики проведена аттестация холмогорской и ярославской пород, принадлежащих чёрно-пёстрому генеалогическому корню. Показано, чаще всего встречаются генотипы с «плохими» CSN2^{A1} и CSN2^B аллелями. Наличие такого состояния генотипов у исследованных пород связано с невостребованностью A2-бета-казеинового молока. У коров отсутствовал редко встречаемый у молочных пород CSN2^{A3} аллель. Разработанный ПЦР-РВ-метод для диагностики нормальных и мутантных аллелей в локусе бета-казеина позволяет на ранних этапах селекционной работы формировать группы племенных быков-производителей, ремонтных бычков, быковоспроизводящих коров. Предложенная ДНК-технология даст возможность заложить основу для создания качественного поголовья крупного рогатого скота в регионах, где разводятся представители разных генеалогических корней.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, породы, локус бета-казеина, тест-система, аллельспецифичные TaqMan зонды.

Проблемы биологии продуктивных животных, 2022, 3: 74-82.

Введение

Молочные белки делятся на две группы: казеины и растворимые белки. Казеины составляют около 75-80% от общего количества молочных белков в коровьем молоке (Горбатова, 2004; Иолчиев, 2005; Хаертдинов и др., 2009; Kalyankar et al., 2016; Иванов и др., 2017). Они состоят из четырех вариантов белков: альфа S1- казеин (CSN1S1, 39-46% от общего количества казеинов), альфа-S2-казеин (CSN1S2, 8-11%), бета-казеин (CSN2, 25-35%) и каппа-казеин (CSN3, 8-15%) (Eigel et al., 1984). Сывороточные белки составляют около 16% общего молочного белка и содержат два основных белка: альфа-лактальбумин и бета-лактоглобулин. Сюда же входят пептоны/низкомолекулярные пептиды (3%) и белки мембраны шариков молочного жира (MFGM) (2-6%) (Singh H., 2006; Smoczyński et al., 2012; Cong Wang et al., 2022). Белки молока жвачных животных кодируются высоко полиморфными генами. С тех пор как вышли пионерские работы

(Aschaffenburg, Drewry., 1955), обнаружившие аллели А и В бета-лактоглобулина у крупного рогатого скота, возрос интерес к генетическому полиморфизму основных белков молока. По сути, появилась международная программа «Геном молока». Эта цепь исследований привела к тому, что было показано наличие большого полиморфизма белков молока у крупного рогатого скота и других видов сельскохозяйственных животных (Barłowska et al., 2012).

Согласно обзору литературы (Caroli et al., 2009) аллельные варианты генов молочных белков приблизительно выглядят следующим образом: α s1-CSN (A, B, C, D, E, F, G, H, I, n=9), α s2-CSN (A, B, C, D, n=4), β -CSN (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I, n=12), κ -CSN (A, A1, B, B2, C, D, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J, n=14), 11 β -LG (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W, n=11) и α -LA (A, B, C, n=3). Эти аллельные формы контролируются кодоминантными аутосомными генами, по менделевскому типу наследования. Различные генетические варианты молочных белков отличаются друг от друга всего несколькими аминокислотными заменами или делецией в полипептидной цепи (Eigel et al., 1984). Был проведен ряд фундаментальных исследований, позволивших определить частоты генетических вариантов белков молока у разных пород крупного рогатого скота. Установлена связь между качеством молока и аллелотипом по полиморфным белкам. Показана потенциальная возможность по их использованию в качестве вспомогательного средства для генетического отбора животных (Cardak, 2007; Caroli et al., 2009; Подречнева и др., 2020; Марзанов и др., 2021а, б).

Одним из таких важных белков молока является бета-казеин (CSN2). Исследованиями последних лет показано, что CSN2^{A1} и CSN2^B варианты образуют белки молока крупного рогатого скота и их производное бета-казоморфин 7, которые при потреблении вызывают в организме человека ряд нарушений в работе кишечника, ишемическую болезнь сердца, диабет, аутизм у детей, синдром внезапной смерти новорожденных (Elliott, 1999; Kaminski et al., 2007; Дубынин, Каменский, 2010; Вудфорд, 2018).

Быстрота и точность диагностики аллелей в локусе бета-казеина значительно повысилась благодаря установлению их генетической природы. В ряде стран мира проводятся активные исследования по выявлению нормальных и мутантных аллелей в локусе бета-казеина. В высокоразвитых странах Европы и Северной Америке созданы специальные программы по диагностике нормальных и мутантных аллелей бета-казеина (CSN2) в популяциях различных пород. На племенных станциях выдающихся производителей и ремонтный молодняк проверяют на носительство нормальных и мутантных аллелей по данному локусу, а результаты в обязательном порядке, регулярно публикуют в каталогах по племенным быкам. В открытой печати предложены ряд методов диагностики аллелей в локусе бета-казеина (Caroli et al., 2016; Dar et al., 2018). Однако они занимают много времени либо используется дорогостоящий метод секвенирования, или определяют ограниченное число аллелей. Таким образом, в молекулярной биологии существует очевидная потребность в разработке высокочувствительных, специфичных, быстрых и не дорогостоящих способов диагностики аллелей и генотипов бета-казеина, а также создания тест-систем для их осуществления, которые могут быть применены в ветеринарной практике.

Цель исследования - разработка тест-системы для выявления нормальных и мутантных аллелей в локусе бета-казеина (CSN2) и проведение генодиагностики этого локуса у двух пород крупного рогатого скота (холмогорской и ярославской).

Материал и методы

Источником для исследований служили образцы цельной крови от коров двух пород (холмогорская, ярославская), представителей черно-пестрого генеалогического корня крупного рогатого скота (n=101). Кровь у представителей холмогорской породы (n=71) брали в 3-х хозяйствах Республики Коми: ПлемХоз УХТА-97; ООО «Пригородный» и ООО «Агрокомплекс Инна Приполяная». У коров ярославской породы, цельную кровь брали из СПК «Подобино» Тверской области (n=30).

Для выделения ДНК использовали 100 мкл подготовленного образца цельной крови. Экстракцию ДНК проводили из образцов крови с помощью сорбентного метода («S-Сорб», EX-516-100 (ООО «НПФ Синтол»). Подбор праймеров и аллельспецифичных зондов проводили при

помощи пакета прикладных программ «Oligo 6.0» (<https://www.oligo.net/>), «Primer3» (<https://Primer3.org>), «Oligo Analyzer» (<https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/>). Для этого проводили анализ нуклеотидных последовательностей локуса бета-казеина, опубликованных в базах данных генов и фенов наследственных болезней животных Австралии (On-line Mendelian Inheritance in Animals, OMIA, <https://www.omia.org/home/>) и Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Для поиска гомологичных последовательностей в базах данных NCBI использовали алгоритм BLAST. Для просмотра хроматограмм, результатов секвенирования, использовали программу Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>).

При постановке ПЦР-РВ и секвенировании для учета результатов и обработки данных использовано программное обеспечение, поставляемое вместе с оборудованием.

Популяционно-генетический анализ встречаемости полученных генотипов и аллелей у исследованных групп животных проводили по описанным ранее методам (Меркурьева, 1977).

Результаты и обсуждение

При создании тест-системы был проведён поиск нуклеотидных последовательностей генов, ответственных за хозяйственно-полезные признаки, по базам данных нуклеотидных последовательностей OMIA (OMIA 002033-9913) и NCBI ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/X14711.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=9BWGSV03016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/X14711.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=9BWGSV03016)). В результате поиска были найдены такие последовательности, которые определяли часть структуры нужных нам генов.

В основу тест-системы положена технология дифференциации аллелей с помощью олигонуклеотидных зондов. При использовании флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных зондов для различения однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) применяли подход, основанный на различии в эффективности гибридизации аллельспецифичных зондов на каждом цикле ПЦР. Зонды метили различными флуорофорами (FAM, R6G, ROX, Cy5), а результаты реакции с ними регистрировали на четырех различных каналах детекции прибора Rotor Gene Q (Qiagen, Германия) – Green, Yellow, Orange, Red.

Общая пара праймеров и три пары зондов были скомплектованы в три реакционные смеси (PC1, PC2, PC3), каждая из которых детектирует нуклеотидную замену. В первой реакционной смеси (PC1) происходила детекция замены азотистого основания цитозина (C) на аденин (A), что в свою очередь приводило к замене аминокислоты пролин (Pro) на гистидин (His) в позиции 67. Во второй реакционной смеси (PC2) происходила замена азотистого основания цитозина (C) на гуанин (G), что в свою очередь приводило к замене аминокислоты серин (Ser) на аргинин (Arg) в позиции 122. В третьей реакционной смеси (PC3) происходила замена азотистого основания цитозина (C) на аденин (A), что в свою очередь приводило к замене аминокислоты Гистидин (His) на Глутамин (Gln) на в позиции 106.

Детекция выявляемых аллелей основана на различии в эффективности гибридизации зонда на каждом цикле ПЦР с полностью комплементарным зонду аллелем и аллелем с заменой одного нуклеотида. Для определения аллельных вариантов гена бета казеина у крупного рогатого скота применяли метод ПЦР-РВ с использованием аллельспецифичных флуоресцентных TaqMap зондов. Одна пара праймеров и три пары аллельспецифичных зондов были подобраны с учетом трех участков однонуклеотидных замен в гене бета казеина (CSN2). Для каждой замены аллельспецифичные зонды подбирали таким образом, чтобы один из них гибридизовался при температуре проведения синтеза цепей с аллелем нормального (дикого) типа, а второй – с аллелем мутантного типа. Вывод об аллельном варианте в генотипе локуса бета - казеина делали на основании сочетания результатов детекции для трех реакционных смесей (Lien et al., 1992).

В табл. 1 представлены материалы по использованным каналам, флуоресцентным меткам, амплифицируемым фрагментам, показаны длины анализируемых фрагментов (п.н.) и контролируемые параметры.

Таблица 1. Амплифицируемые фрагменты гена бета-казеина (CSN2)

Канал	Флуоресцентные метки	Амплифицируемый фрагмент	Длина фрагмента, п.н.	Контролируемый параметр
Green	FAM	Участок гена CSN2	259 п.н.	Определение генотипа по бета-казеину
Yellow	R6G	Участок гена CSN2	259 п.н.	Определение генотипа по бета-казеину
Orange	ROX	Участок гена CSN2	259 п.н.	Определение генотипа по бета-казеину
Red	Cy5	Участок гена CSN2	259 п.н.	Определение генотипа по бета-казеину

Даны варианты для распознавания генотипов в локусе бета-казеина. Часть генотипов определяли по каналу Green сигналом FAM, другая по каналу Yellow - сигналом R6G. По каналу Orange генотипы устанавливали сигналом от ROX, а по каналу Red сигналом от Cy5. В результате проведенных исследований, создан Набор для ПЦР-диагностики генотипов и аллелей в локусе бета-казеина (CSN2). Набор рассчитан на проведение 100 реакций объемом 25 мкл.

Использовали пару гибридизационных зондов для каждой реакционной смеси, специфичных для определенного аллельного варианта, меченных разными флуорофорами и разрушаемых в ходе ПЦР за счет 5' – экзонуклеазной активности Taq – полимеразы. Детекция выявляемых аллелей основана на различии в эффективности гибридизации зонда на каждом цикле ПЦР с полностью комплементарным зонду аллелем и аллелем с заменой одного нуклеотида. Поскольку только гибридизованные зонды разрушаются ферментом, накопление сигнала пропорционально эффективности гибридизации. Различие в эффективности гибридизации зондов очень незначительно, однако эта небольшая разница наливается от цикла к циклу что, в итоге, позволяет достоверно различать аллели (табл. 2).

Таблица 2. Определение аллельных вариантов гена бета казеина (CSN2) у крупного рогатого скота

Диагностируемые генотипы в локусе бета-казеина	Реакционная смесь (PC1) C/A Green/Yellow	Реакционная смесь (PC2) C/G Green/Yellow	Реакционная смесь (PC3) C/A Orange/Red
A1A1	A/A	C/C	C/C
A1A2	C/A	C/C	C/C
A2A2	C/C	C/C	C/C
A2A3	A/A	C/C	C/A
A1B	A/A	C/G	C/C
A2B	C/A	C/G	C/C
B	A/A	G/G	C/C
MVA1	C/C	C/G	C/C
MVA2	C/A	G/G	C/C
MVA3	C/C	G/G	C/C

Примечание: PC1, PC2, PC3 - реакционные смеси 1, 2, 3, содержащие флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные пробы со следующими азотистыми основаниями: аденин (A), цитозин (C), гуанин (G), используемые для диагностики генотипов и аллелей в локусе, бета-казеина; Green, Yellow, Orange, Red - каналы флуоресценции в приборе Rotor Gene Q (Qiagen, Германия) по которым определяются генотипы и аллели в локусе, бета-казеина. В локусе бета-казеина установлены новые мутации, они получили лабораторные обозначения: MVA1, MVA2, MVA3.

С использованием разработанной методики и созданного Набора проведен геногеографический анализ распространения мутантных (CSN2^{A1}, CSN2^B) и нормальных (CSN2^{A2}, CSN2^{A3}) аллелей в локусе бета-казеина у коров холмогорской (Республика Коми) и ярославской (Тульская область) пород крупного рогатого скота. По классификации (Farrell et al., 2004), в локусе бета-казеина выявлено 12 аллелей. Они принадлежат к двум семействам: CSN2^{A1} (CSN2^{A1}, CSN2^B, CSN2^C, CSN2^F, CSN2^G) и CSN2^{A2} (CSN2^{A2}, CSN2^{A3}, CSN2^D, CSN2^E, CSN2^{H1}, CSN2^{H2}, CSN2^I). В

середине 90-х был открыт еще один, 13-й аллель, у местного южнокорейского крупного рогатого скота, который получил новое обозначение - CSN2^{A4}. Данный аллель встречается у локального крупного рогатого скота в виде гетерозигот, образуя генотипы вместе с CSN2^{A1}, CSN2^{A2}, CSN2^B вариантами. Структура формируемого им белка бета-казеина слабо изучена (Chung et al., 1995).

Всего в проведенных нами исследованиях были использованы данные по 101 животным (табл. 3). Исходя из классификации (Farrell et al., 2004), у исследованных коров холмогорской породы (n=71), в локусе бета-казеина встречается больше генотипов с «плохими» CSN2^{A1} и CSN2^B аллелями, чаще всего в виде гетерозиготных генотипов, хотя CSN2^{A1/A1}- и CSN2^{B/B} - гомозиготы были тоже не редкостью.

Значительна доля встречаемости гетерозиготных генотипов с участием CSN2^{A1} и CSN2^B аллелей у другой исследованной, ярославской породы. Следует отметить, тенденции проявления тех или иных генотипов у обеих пород одинаковыми. Общим также является отсутствие гомо- и гетерозиготных генотипов с участием CSN2^{A3} аллеля. Показано, у исследованных двух пород отсутствует нарушение генетического равновесия ($\chi^2 = 1,55$; $df=3$; $P>0,05$ и $\chi^2 = 2,69$; $df=3$; $P>0,05$ соответственно).

Установлено также, что мутантные β -CN^{A1} и β -CN^B аллели обладают кодоминантным типом наследования, в отличие от ранее установленных рецессивных источников наследственных болезней. Это означает, каждое животное, будь это бык или корова, сохраняют мутантный аллель в виде гомо- или гетерозиготного генотипа. В таком случае, родители будут передавать мутантный аллель потомкам, в 100% случаях при гомозиготной форме или 50% - гетерозиготном состоянии.

Быков намного меньше, чем коров, в силу жесткого отбора. Тем не менее, несмотря на высокую стоимость племенных быков-производителей, при выявлении у них мутантных аллелей, удаляются из селекционных центров. Их заменяют ремонтными быками-производителями, не носителями. Сложнее с коровами, их больше и аттестовать всех на носительство мутаций практически невозможно.

Поэтому коров рекомендуем тестировать по локусу бета-казеина при создании особых племенных популяций, например, типов, линий, быковоспроизводящих групп коров, нуклеусов. Тогда как, быков - производителей используемых в конкретном селекционном процессе, необходимо тестировать в обязательном порядке.

В историческом плане, связанный с возникновением β -CN^{A1} и β -CN^B мутаций у молочных пород крупного рогатого скота, причиной подобного типа нарушений, по нашему мнению, является спонтанность видимых причин и рассматриваем как ошибку, сбой, в молекулах ДНК, которые проявляются в виде замен нуклеотидов. В результате возникает однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) или single nucleotide polymorphism (SNP). Не исключено, эти события были связаны с одомашниванием молочного скота, когда отбирались животные, с наиболее мягким нравом, носителей мутантных аллелей. Возможно также, что причиной была проводимая жесткая селекционная работа, направленная на получение высоких удоев, т.е. селекционный пресс на реализацию одного признака плюс экологические факторы, могли быть причиной появления каскада мутаций

Как видно на табл. 2, процесс возникновения мутаций не зависит от породы. Больше всего CSN2^{A2/A2} генотипа бета-казеина встречается у гернзейской и джерсейской пород, доля которых в Российской Федерации мала. При этом особенностью данных мутаций является, ее кодоминантность. Это уникальное состояние, когда мутация кодоминантна в генотипе и способна вырабатывать наряду с нежелательным, нормальный белок молока. Следует также особо отметить, главной причиной распространения данного явления служат близкородственные принципы разведения сельскохозяйственных животных.

Считаем, наличие такого аллелотипа у двух изученных пород связано с отсутствием целенаправленной селекции по элиминации CSN2^{A1} и CSN2^B аллелей в локусе бета-казеина. Не исключено влияние экологического фактора на формирование генотипов, поскольку обе исследованные породы, исконно разводятся на Севере и в Центральной России, практически в одинаковых условиях внешней среды.

Отсутствием у большинства хозяйств заинтересованности получать антиаллергенное

молоко, поскольку A1- и B - белки бета-казеина молока является тем источником, которые вызывают непринятие молока организмом человека (Jianqin S. et al., 2016; Вудфорд К., 2018). Отсюда, нежелание проведения конкретных селекционных мероприятий по подбору быков-производителей к стаду, отбору коров при ремонте на заданные генотипы (CSN2^{A2/A2} или CSN2^{A2/A1}) для целенаправленного получения качественного A2 бета-казеинового молока.

Общее число однонуклеотидных полиморфизмов или SNP в геноме крупного рогатого скота составляет приблизительно 10-13 миллионов. Полиморфизм, затрагивающий кодирующие части генов, нередко приводит к аминокислотным заменам и появлению белков с новыми, зачастую с нежелательными функциональными свойствами. Скрининг SNP явился важным этапом в изучении генетики крупного рогатого скота. Оказалось, многие из них явились источником наследственных заболеваний, таких как BLAD, CVM, BY (Марзанов и др., 2003; Agerholm et al., 2010; Casas, Kehrli, 2016; Chun Hsuan Chao et al., 2020; Марзанова и др., 2021; 2022), отрицательно влияющими на качество получаемой молочной продуктивности и организм человека (CSN2, CSN3) (Jianqin et al., 2016; Иванов и др., 2017; Dar et al., 2018; Вудфорд, 2018).

Разработка методов диагностики нормальных и мутантных аллелей в локусе бета-казеина позволит купировать распространение нежелательных вариантов, ухудшающих качество получаемой молочной продуктивности. Предложенный ПЦР-РВ-метод для массовой диагностики нормальных и мутантных аллелей в локусе бета-казеина, даст возможность, на ранних этапах формировать группы племенных животных-неносителей (быков-производителей, ремонтных бычков, быковоспроизводящих коров), тем самым заложить основу для создания качественного поголовья в регионах, где разводятся представители всех генеалогических корней крупного рогатого скота.

ДНК-технология и генетико-генеалогический анализ позволяют диагностировать эти мутации и проводить своевременную санацию стада. Процесс не простой и может занять годы. Искоренение мутантных β -CN^{A1} и β -CN^B аллелей возможно при проведении комплексных мероприятий, оно включает подбор гомозиготных (β -CN^{A2/A2}) или гетерозиготных (β -CN^{A2/A1}) быков к стаду, отбор коров - не носителей β -CN^{A1} и β -CN^B мутаций.

Заключение

Разработанный ПЦР-РВ-метод для диагностики нормальных и мутантных аллелей в локусе бета-казеина позволяет на ранних этапах селекционной работы формировать группы племенных быков-производителей, ремонтных бычков, быковоспроизводящих коров. На основе разработанной методики проведена аттестация холмогорской и ярославской пород, принадлежащих чёрно-пёстрому генеалогическому корню. Показано, чаще всего встречаются генотипы с «плохими» CSN2^{A1} и CSN2^B аллелями. Наличие такого состояния генотипов у исследованных пород связано с не востребоваанностью A2-бета-казеинового молока. У исследованных коров отсутствовал редко встречаемый у молочных пород CSN2^{A3} аллель.

Список литературы

1. Вудфорд К. Дьявол в молоке. Болезнь, здоровье и политика. Молоко A1 и A2. Москва: изд. РАМН, 2018. 320 с.
2. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов. 3-е изд., перера. дополн. Санкт-Петербург: ГИОРД, 2004. 314 с.
3. Дубынин В.А., Каменский А.А. Бета-казеоморфины и их роль в регуляции поведения. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2010. 306 с.
4. Иванов В.А., Марзанов Н.С., Елисеева Л.И., Таджиев К.П., Марзанова С.Н. Генотипы пород крупного рогатого скота и качество молока. // Проблемы биологии продуктивных животных. 2017. № 3: С. 48-65.
5. Иолчиев Б.С. Оценка генетического потенциала у различных видов и гибридов сельскохозяйственных животных на основе биотехнологических методов. Автореф. дисс... д.б. н. Дубровицы, 2005: 32 с.
6. Марзанов Н.С., Турбина И.С., Ескин Г.В., Турбина Г.С., Попов А.Н., Игнатъев В.М., Харлициус Б. Скрининг гена дефицита лейкоцитарной адгезии у черно-пестрого голштинизированного скота, // Сельскохозяйственная биология. 2003. № 6. С. 23-30.

7. Марзанов Н.С., Девришов Д.А., Марзанова С.Н., Гетоков О.О., Абылкасымов Д.А., Либет И.С. ДНК-диагностика популяций коров черно-пестрой породы по локусу бета-казеина. // Ветеринария. Зоотехния Биотехнология. 2021. № 3. С. 78-84. DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202103011.
8. Марзанова С.Н., Девришов Д.А., Турбина И.С., Алексеев Я.И., Коновалова Н.В., Марзанов Н.С. Генодиагностика мутации FANCI^{BY} у представителей голштинской породы и ее помесей // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 6. С. 48-57; doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-6-48-57.
9. Марзанова С.Н., Девришов Д.А., Турбина И.С., Марзанов Н.С. ДНК-технология и оценка дрейфа мутантных аллелей в популяциях голштинской породы и ее помесей // Генетика. 2022. Т. 58. № 7. С. 846-850. DOI: 10.31857/S0016675822070116.
10. Меркурьева Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве. Москва: Изд. Колос, 1977. 240 с.
11. Подречнева И.Ю., Щеголев П.О., Белокуров С.Г., Кофиади И.А. Сравнительная оценка костромской и ярославской пород крупного рогатого скота по гену бета-казеина. // Научная жизнь. 2020. Т. 15. № 9. С. 1278-1284. DOI: 10.35679/1991-9476-2020-15-9-1278-1284.
12. Хаертдинов Р.А., Афанасьев М.П., Хаертдинов Р.Р. Белки молока. Казань: Идель-Пресс, 2009: 256 с.
13. Agerholm J.S., DeLay J., Hicks B., Fredholm M. First confirmed case of the bovine brachyspina syndrome in Canada. // Can. Vet. J. 2010. Vol. 51. P. 1349-1350.
14. Aschaffenburg R., Drewry J. Occurrence of different beta-lactoglobulins in cow's milk. // Nature. 1955. Vol. 176. nr 4474): 218-219; doi: 10.1038/176218b0.
15. Barłowska J., Wolanciuk A., Litwińczuk Z., Król J. Milk proteins' polymorphism in various species of animals associated with milk production utility. // In: Milk Protein. Biochem., Genet. Molec. Biol. (Walter L., Ed.). Chapter 9. Hurley, 2012. DOI: 10.5772/50715
16. Cardak A.D. Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows // South Afr. J. Anim. Sci. 2007. Vol. 35. nr 1. P. 41-47. DOI: 10.4314/sajas.v35i1.4047.
17. Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J. Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. // J. Dairy Sci. 2009. Vol. 92. nr 11. P. 5335-5352. DOI: <https://doi.org/10.3168/ds.2009-2461>.
18. Caroli A.M., Savino S., Bulgari O., Monti E. Detecting β -casein variation in bovine milk. // Molecules. 2016. Vol. 21. nr 2. P. 141. DOI:10.3390/molecules21020141.
19. Casas E., Kehrli M.E. Jr. A review of selected genes with known effects on performance and health of cattle. // Front. Vet. Sci. 2016, Vol. 3. P. 113. DOI: 10.3389/fvets.2016.00113.
20. Chun H.Ch., Chen Y.M., Lee K.H.. Genotype screening of bovine brachyspina in Taiwan Holstein cows. // Am. J. Anim. Vet. Sci. 2020, Vol. 15. nr 3. P. 206-210. DOI 10.3844/ajavsp.2020.206.210
21. Chung E.R., Han S.K., Rhim T.J. Milk protein polymorphisms as genetic marker in Korean native cattle. // Asian-Austral. J. Anim. Sci. 1995. Vol. 8. nr 2. P. 187-194. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.1995.187>.
22. Cong Wang, Xinyu Qiao, Zengli Gao, Lianzhou Jiang, Zhishen Mu. Advancement on milk fat globule membrane: separation, identification, and functional properties. Review article. // Front. Nutr., Sec. Food Chem. 2022. Vol. 8: 807284 <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.807284>.
23. Dar A.H., Kumar S., Kumari P., Mukesh M., Singh D.V., Sharma R.K., Ghosh A.K., Singh B., Panwar V.A., Sodh M. Distribution of allelic and genotyping frequency of A1/A2 allele of beta casein in Badri cattle. // J. Livest. Biodiv. 2018. Vol. 8. nr 2. P. 115-119.
24. Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A., Farrell H.M., Halwarkar V.R., Jenness R., Whitney R.M. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. // J. Dairy Sci. 1984. Vol. 67. P. 1599-1631.
25. Elliott R.B., Harris D.P., Hill J.P., Bibby N.J., Wasmuth H.E. Type I (insulindependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. // Diabetologia. 1999. Vol. 42. P. 292-296.
26. Farrell H.M.Jr., Jimenez-Florez 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. Nomenclature of the proteins of cows' milk - sixth revision. // J. Dairy Sci. 2004. Vol. 87. P. 1641-1674.
27. Jianqin S., Leiming X., Lu X., Yelland G.W., Ni J., Clarke A.J. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behaviour of people with self-reported intolerance to traditional cow's milk. // Nutr. J. 2016. Vol. 15. nr 1. P. 45. DOI: 10.1186/s12937-016-0164-y.
28. Kalyankar S.D., Deosarkar S., Redkar D.C. Milk, Sources and Composition. // The Encyclopedia of Food and Health. 2016. Vol. 3. P. 741-747. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00463-3.
29. Kaminski S., Cieslinska A., Kostyr E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. // J. Appl. Genet. 2007. Vol. 48. nr 3. P. 189-198.
30. Lien S., Alestrom P., Klungland H., Rogne S. Detection of multiple β -casein alleles by amplification created restriction sites (ACRS). // Anim. Genet. 1992. Vol. 23. P. 333-338. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1992.tb00155.x.

31. Singh H. Membrane milk fat globules - a biophysical system for foodstuffs. // Curr. Opin. Sci. Coll. Interf. 2006. Vol. 11. nr 2-3. P. 154-163. DOI: 10.1016 / j.cocis.2005.11.002.
32. Smoczyński M, Staniewski B, Kielczewska K. Composition and structure of the bovine milk fat globule membrane—some nutritional and technological implications. // Food Rev. Int. 2012. Vol. 28. P. 188-202. DOI: 10.1080/87559129.2011.595024.

References (for publications in Russian)

1. Dubynin V.A., Kamenskij A.A. *Beta-kazomorphiny i ich rol' v reguliacii povedenia* (Beta-casomorphins and their role in the regulation of behavior. Moscow: KMK Publ., 2010. 306 p.
2. Gorbatova K.K. *Biochimia moloka I molochnykh produktov*. (Biochemistry of milk and dairy products). St. Petersburg: GIOR Publ., 2004. 314 p.
3. Iolchiev B.S. *Ocenka geneticheskogo potenciala u razlichnykh vidov i gibridov selskokhoziastvennykh zivotnykh na osnove biotekhnologicheskikh metodov*. (Assessment of genetic potential in various species and hybrids of farm animals based on biotechnological methods). Extended Abstract of Diss. Dr. Sci. Biol. Dubrovicy, 2005. 32 p.
4. Ivanov V.A., Marzanov N.S., Eliseeva L.I., Tadzhiyev K.P., Marzanova S.N. [Genotypes of cattle breeds and milk quality]. *Problemy biologii produktivnykh zivotnykh - Problems of Productive Animal Biology*. 2017. 3: 48-65.
5. Khaertdinov R.A., Afanasiev M.P., Khaertdinov R.R. *Belki moloka* [Milk proteins]. Kazan: Idel-Press Publ., 2009. 256 p.
6. Marzanov N.S., Turbina I.S., Yeskin G.V., Turbina G.S., Popov A.N., Ignatiev V.M., Harlicius B. [Screening of the leukocyte adhesion deficiency gene in Black-and-White holsteinized cattle]. *Selskokhoziastvennaja biologiya - Agricultural Biology*. 2003, 6: 23-30.
7. Marzanov N.S., Devrishov D.A., Marzanova S.N., Getokov O.O., Abylkasymov D.A., Libet I.S. [DNA diagnostics of black-and-white cow populations by beta-casein locus]. *Veterinariya. Zootekhnika. Biotekhnologiya. - Veterinary, Animal Science, Biotechnology*. 2021. 3: 78-84. DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202103011.
8. Marzanova S.N., Devrishov D.A., Turbina I.S., Alekseev Ya.I., Konovalova N.V., Marzanov N.S. [Gene diagnostics of the FANCIBY mutation in representatives of the Holstein breed and its hybrids]. *Biotekhnologiya - Biotechnology*. 2021. 37(6): 48-57; doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-6-48-57.
9. Marzanova S.N., Devrishov D.A., Turbina I.S., Marzanov N.S. [DNA technology and assessment of the drift of mutant alleles in populations of the Holstein breed and its crossis]. *Genetika - Genetics*. 2022. 58(7): 846-850. DOI: 10.31857/S0016675822070116.
10. Merkurieva E.K. *Geneticheskie osnovy selekcii v skotovodstve*. (Genetic bases of selection in cattle breeding). Moscow: Kolos Publ., 1977. 240 p.
11. Podrechnova I.Yu., Schegolev P.O., Belokurov S.G., Kofiadi I.A. [Comparative evaluation of the Kostroma and Yaroslavl cattle breeds by the beta-casein gene]. *Scientific Life*. 2020. 15(9): 1278-1284. DOI: 10.35679/1991-9476-2020-15-9-1278-1284.
12. Woodford K. *D'javol v moloke. Bolezn', zdorov'e i politika. Moloko A1 u A2* (Devil in milk. Illness, health and politics. Milk A1 and A2). Moscow: RAMN Publ. House, 2018. 320 p.

UDC 636.2:612.664.14:575.113

Development of the test system and alleles genodiagnosis in the beta-casein locus in Kholmogor and Yaroslav breed of cattle

¹Marzanova S.N., ²Khodarovich Yu.M., ¹Devrishov D.A., ³Molodtsova V.V.,
⁴Alekseev Ya.I., ⁴Konovalova N.V., ⁴Marzanov N.S.

¹*Scriabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology;*

²*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow;*

³*RGUSP Komi on breeding work, Syktyvkar, Komi Republic;* ⁴*LLC NPF Sintol, Moscow;* ⁵*Ernst VIZh, Podolsk-Dubrovitsy, Moscow oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. The milk proteins of ruminants are encoded by highly polymorphic genes. In recent years, interest in the genetic polymorphism of the main proteins of milk has increased, and the international program "Genome of Milk" has appeared. The aim of the study was to develop a test system for the detection of normal and mutant alleles in the CSN2 beta-casein locus and to carry out gene diagnostics of four alleles of this locus in two breeds of cattle using the technology of allele-specific TaqMan probes. For bioinformatic analysis, some of the materials were taken from the OMIA (Australia) and NCBI (USA) databases. On the basis of the developed methodology, the certification of the Kholmogory and Yaroslavl breeds belonging to the black-and-white genealogical root was carried out. It has been shown that genotypes with "bad" CSN2A1 and CSN2B alleles are most common. The presence of such a state of genotypes in the studied breeds is associated with the lack of demand for A2-beta-casein milk. Cows lacked the CSN2A3 allele, which is rare in dairy breeds. The developed RT-PCR method for diagnosing normal and mutant alleles in the beta-casein locus makes it possible to form groups of pedigree bulls, replacement bulls, and bull-reproducing cows at the early stages of breeding work. The proposed DNA technology will provide an opportunity to lay the foundation for creating a high-quality cattle population in regions where representatives of different genealogical roots are bred.

Keywords: cattle, breeds, beta-casein locus, test system, allele-specific TaqMan probes.

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Productive Animal Biology, 2022, 3: 74-82.

Поступило в редакцию: 26.08.2022. Получено после доработки: 09. 09.2022.

Сведения об авторах:

Марзанова Саида Нурбиевна, к.б.н., доц.; 8 916 948-00-47; s.marzanova@mail.ru

Ходарович Юрий Михайлович, к.б.н., с.н.с.; 8 916 952-50-95; e-mail: khodarovich@mail.ru

Девришов Давуд Абдулсемедович, д.б.н., проф., член-корр. РАН; +7 985 288-64-22; davud@agrovvet.ru

Молодцова Виктория Владимировна, соискатель, 8-904-200-97-85; risckomi@yandex.ru

Алексеев Яков Игорьевич, к.б.н.; 8 916 628-00-31; syntol@mail.ru

Коновалова Нина Валерьевна, с.н.с.; 8 495 977-74-55; syntol@mail.ru

Марзанов Нурбий Сафарбиевич, д.б.н., проф., г.н.с.; 8 915 353-45-72, nmarzanov@yandex.ru