

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ**

Дзіцюк В. В., Мохначова Н. Б., Добрянська М. Л.

**ВИЯВЛЕННЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ
МАРКЕРІВ ТВАРИН, АСОЦІЙОВАНИХ З
ГІПОАЛЕРГЕННИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ
МОЛОКА**

Методичні рекомендації

Чубинське, 2022

УДК 636.082:577.2

Д 43

Методичні рекомендації розглянуто і схвалено вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН (протокол № 11 від 3 листопада 2022 року).

Дзіцюк В. В., Мохначова Н. Б., Добрянська М. Л. Виявлення молекулярно-генетичних маркерів тварин, асоційованих з гіпоалергенними властивостями молока : методичні рекомендації. Чубинське, 2022. 28 с.

У рекомендаціях викладено узагальнену методику генетичного тестування великої рогатої худоби та дрібної рогатої худоби молочного напрямку продуктивності за генами бета-казеїну (*CSN2*) ВРХ та капа-казеїну (*CSN3*), бета-лактоглобуліну (*β LG*) кіз. Методику розроблено на підставі результатів власних досліджень та аналізу літературних джерел.

Розраховано на спеціалістів в галузі тваринництва, викладачів і студентів аграрних учбових закладів.

Рецензенти:

Копилова К. В. – доктор с.-г. наук, старший науковий співробітник.

Джус П. П. – кандидат біол. наук, старший науковий співробітник.

УДК 636.082:577.2

© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН, 2022 р.

© В. В. Дзіцюк, Н. Б. Мохначова, М. Л. Добрянська, 2022 р.

ЗМІСТ

	Ст.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	4
ВСТУП	5
1. МАРКЕРИ АСОЦІЙОВАНІ З АЛЕРГЕННИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ МОЛОКА	6
1.1. Ген бета-казеїну (<i>CSN2</i>) ВРХ	6
1.2. Ген капа-казеїну (<i>κ-Cn</i>) кіз	8
1.3. Ген бета-лактоглобуліну (<i>βLG</i>) кіз	9
2. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ГЕНОТИПУВАННЯ	11
2.1. Основні вимоги до роботи ПЛР-лабораторії з генотипування	11
2.2. Обладнання ПЛР-лабораторії та необхідні матеріали	11
2.3. Біологічний матеріал для молекулярно-генетичного аналізу	13
2.4. Виділення препаратів ДНК (зона 1)	13
2.5. Ампліфікація геномних локусів (зона 2)	15
2.6. Електрофоретичний аналіз ПЛР-продуктів (зона 3)	17
2.7. Рестрикційний аналіз ПЛР-продуктів (зона 3)	19
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	25

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ПДРФ – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат

F_{IS} – індивідуальний індекс фіксації Райта

QTL – локуси кількісних ознак (Quantitative Trait Locus)

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

п. н. – пар нуклеотидів

CSN2 – ген бета-казеїнуВРХ

к-Сп – ген капа-казеїну кіз

β LG – ген бета-лактоглобуліну кіз

ВСТУП

Молоко – унікальний природний продукт, що являє собою багатокомпонентну тонкодисперсну біологічну рідину. Воно в оптимальному співвідношенні містить усі життєвоважливі харчові речовини та є єдиним продуктом харчування у перші місяці життя новонародженого. Алергія на коров'яче молоко є однією з найпоширеніших харчових алергій у дітей [1]. Основними алергенами в коров'ячому молоці є сироваткові білки (α -лактальбумін, β -лактоглобулін, сироватковий альбумін і імуноглобулін) і білки казеїну (α -s1, α -s2, β -казеїн, κ -казеїн) [2]. В останні десятиріччя ведуться активні пошуки, дослідження та розробки ідеальних формул молочних сумішей для дитячого харчування, що базуються на використанні молока тварин у яких генетично обумовлено відсутність компонентів, що викликають алергічну реакцію.

Незважаючи на поширене використання у харчуванні дитячого та дорослого населення коров'ячого молока та продуктів, приготованих на його основі, особливий інтерес народів різних країн здавна привертало до себе козяче молоко. Вважається, що козяче молоко є альтернативою коров'ячому молоку для людей з непереносимістю лактози та білка коров'ячого молока [3].

Наразі дослідження козячого молока проводять не лише на рівні біохімічного складу, але й досліджують різні породи тварин на генетично детерміновані ознаки пов'язані із властивостями молока.

Методичні рекомендації «Виявлення молекулярно-генетичних маркерів тварин, асоційованих з гіпоалергенними властивостями молока» розроблені для використання діагностичними лабораторіями, суб'єктами племінної справи у молочному скотарстві. В рекомендаціях подано інформацію щодо генів асоційованих з показниками молочної продуктивності у великої рогатої худоби та кіз.

1. МАРКЕРИ АСОЦІЙОВАНІ З АЛЕРГЕННИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ МОЛОКА

Молоко жуйних тварин має подібний склад і містить білки, що мають однакові структурні, функціональні та біологічні властивості. Однак, людське молоко, на відміну від коров'ячого, не містить β -лактоглобулін. Також людське грудне молоко та молоко жуйних істотно відрізняються співвідношенням сироваткових білків і казеїнів. Саме казеїни випадають в осад при скисанні молока, утворюючи коагулят (сирну масу). Сироваткові білки залишаються розчиненими у молочній сироватці. Казеїни та сироваткові білки сильно відрізняються фізико-хімічними та алергенними властивостями. Так, коагулят містить фракцію казеїну, що включає 4 білки: альфаS1-, альфаS2-, бета-і каппа-казеїни. Сироватка містить переважно глобулярні білки BLG та альфа-лактальбумін, або ALA. Є в ній у невеликій кількості та інші компоненти, такі як бичачий сироватковий альбумін (BSA), лактоферин (LF), імуноглобуліни (Ig) та протеозопептон.

1.1. Ген бета-казеїну (CSN2) ВРХ

Бета-казеїн молочного білка складається з 209 амінокислот, що займає до 35% від загальної кількості білка в молоці [4, 5]. Казеїнові пептиди посилюють природний захист організму, регулюють кров'яний тиск та допомагають боротися зі стресом. За синтез β -казеїну у великої рогатої худоби відповідає ген бета-казеїну (CSN2). Ген бета-казеїну розташований на 6 хромосомі великої рогатої худоби [6]. CSN2 має 13 генетичних варіантів: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G, A4, які відрізняються різними структурами. Найбільш поширеними варіантами β -казеїну у молочних порід великої рогатої худоби є A1 та A2 [7].

Існує думка, що спочатку всі одомашнені корови виробляли молоко, яке містить лише A2-казеїн. Однак, ймовірно, внаслідок точкової мутації, 5000–10000 років тому в європейських стадах *Bos Taurus* з'явився варіант A1 варіант β -казеїну [8].

Різниця між варіантами β -казеїну A1 та A2 полягає у заміні однієї амінокислоти в 67 положенні. Варіант A1 в положенні 67 містить амінокислоту гістидин, а A2 амінокислоти пролін (Рис.1). Через мутацію виникає одиничний нуклеотидний поліморфізм [9]. При розчепленні ферментами шлунково-кишкового тракту молока, що містить A1 β -казеїн, утворюється біоактивний пептид β -казоформін 7 (BCM-7), який має значну опіоїдну активність [10].

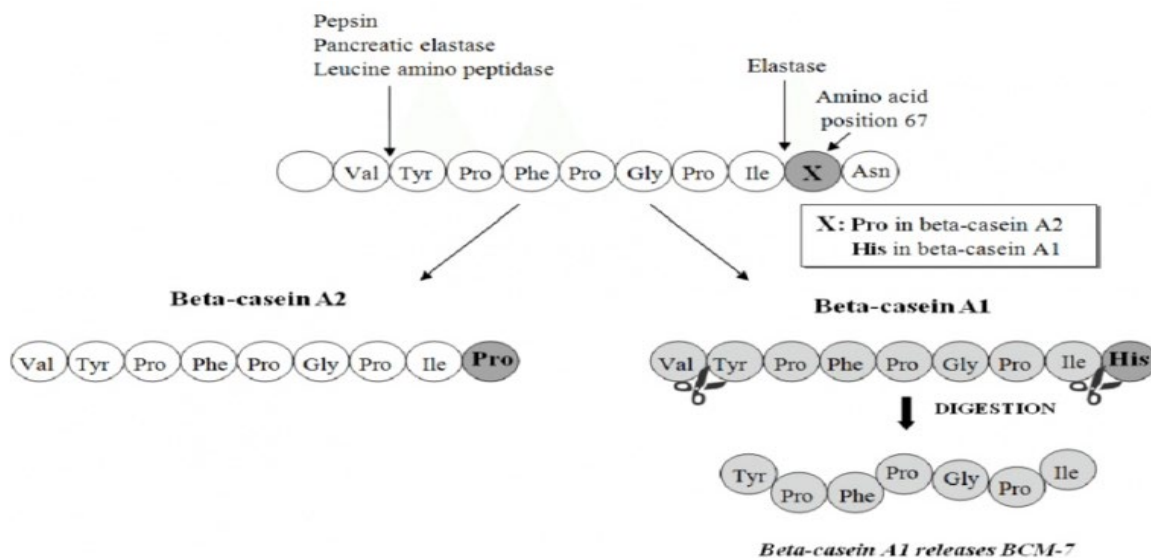


Рис 1. Утворення β -казоморфіну-7 [11]

BCM-7 – це невелика молекула, яка може легко проникати в кровообіг і викликати різні проблеми зі здоров'ям. Саме з дією BCM-7 на організм людини пов'язують різні хронічні запальні реакції: алергії, шкірні прояви, виділення муцину [12]. Варіант A1 β -казеїн також може бути причиною цукрового діабету 1-го типу, коронарної хвороби серця та аутизму [13], тоді як варіант A2 знижує рівень холестерину та зменшує ризик запальних реакцій у кишечнику [14].

Бета-казеїн A1 – найбільш поширений у коров'ячому молоці, виробленому в Європі (за винятком Франції), а також у США, Австралії та Новій Зеландії. У деяких порід худоби встановлені значні відмінності щодо співвідношення алельних варіантів бета-казеїну A1 та A2 у молоці. Переважна більшість бета-казеїну A2 характерна для таких порід, як Гернзейська та Джерсейська, причому для Гернзейської породи співвідношення A2 до A1 становить 9,6: 0,4 [15, 16].

Коров'яче молоко А2 (молоко без варіанта А1) представлене у продажу у багатьох країнах: Австралія, Великобританія, США, Нова Зеландія, Нідерланди та широко рекомендується людям, які зазвичай не сприймають молоко [17].

Білки козячого молока. Широке використання козячого молока характерне для країн із розвиненим козівництвом. Козяче молоко використовують як питне, так і у якості сировини для виготовлення йогуртів, сирів та інших кисломолочних продуктів. Враховуючи фізико – технологічні, біохімічні та ряд інших параметрів, особливий інтерес на сьогодні представляє козяче молоко для виробництва продуктів дитячого харчування. У козячому молоці в порівнянні з коров'ячим спостерігається у фракційном складі білків знижений вміст α S1 – казеїну (що сприяє гіпоалергенності), підвищений вміст β - казеїну (що впливає на швидкість утворення в шлунку дрібнодисперсного легкозасвоюваного згустку) та висока ступінь дисперсності жирової фази. В останній час посилюється тенденція до розробки функціонально нових молочних продуктів, в яких за основу взяті такі параметри як висока харчова та біологічна цінність і фізіологічна активність продукту, що зумовлюються високою якістю молока [18].

1.2. Ген капа-казеїну (κ -CN) кіз

Казеїни – найпоширеніші білки молока, є сімейством кислих, багатих проліном фосфопротеїнів. Казеїн каппа (κ -CN) – це молочний білок, який дозволяє формувати та стабілізувати молочні міцели, визначає їх розмір та функцію [19]. Він відрізняється від інших казеїнів своєю розчинністю у широкому діапазоні концентрацій іонів кальцію і містить гідрофільну С-кінцеву область. Крім цих характеристик, зрілий білок капа-казеїн має лабільний пептидний зв'язок, розщеплення якого за допомогою хімозину (або реніну) продукує розчинний гідрофільний глікопептид (казеїно-макропептид), а також нерозчинний пептид або пара- κ -CN. Казеїно-макропептид відповідає за згортання молока, тоді як функція пара- κ -CN недостатньо відома. Вивчення генетичних поліморфізмів казеїнів представляє інтерес, оскільки деякі варіанти

можуть бути більш вигідними з точки зору харчування людини [20] або бути пов'язаними з якістю молока, складом та технологічними характеристиками.

У кіз основні типи казеїнів кодуються генами, які тісно зчеплені в єдиному кластері, локалізованому на шостій хромосомі [21]. Кластер казеїнів займає ділянку 250–350 т.п.н., в якій α S1-казеїн, α S2-казеїн і β -казеїн пов'язані один з одним еволюційно (Рис.2) Ці білки характеризуються подібною молекулярною масою (~24–25 кДа), промоторними ділянками, послідовностями лідуючого пептиду та ділянками фосфорилювання. З іншої сторони, κ -казеїн еволюційно не належить до перерахованих білків і відрізняється в основному особливостями організації 5'– фланкуючої області. Ген κ -казеїну включає 5 екзонів, 4 з них несуть понад 90% інформації для кодування для зрілого білка, який містить 171 амінокислотний залишок [22].

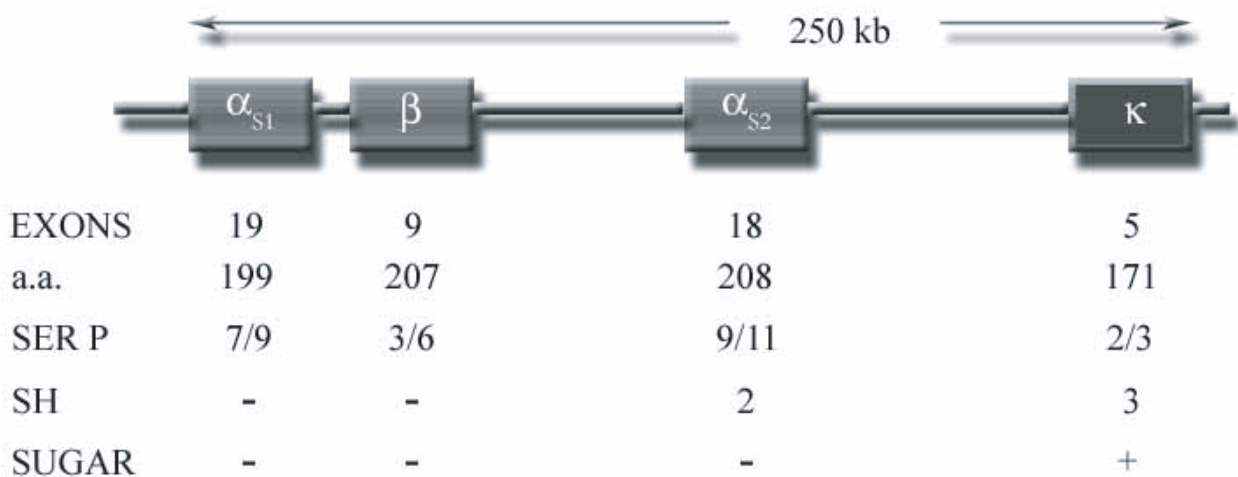


Рис. 2. Кластер казеїнів козячого молока (геномная організація) а.а. – амінокислоти; SERP – фосфосерин; SH – сульфгідрильні групи; [23]

1.3. Ген бета-лактоглобуліну (BLG) кіз

Бета-лактоглобулін є основним сироватковим білком молока жуйних тварин. Він також зустрічається в молоці інших ссавців, але відсутній у гризунів та людей [24].

Білок бета-лактоглобулін є мажорним алергеном молока для людини, особливість його ще і полягає в тому, що він є термостабільний. Бета-лактоглобулін коров'ячого молока може мати перехресну реактивність з протеїнами молока інших видів тварин. IgE-антитіла до бета-лактоглобулінів та альфа-лактальбумінів у 10% випадків мають перехресну реактивність.

На відміну від інших основних сироваткових білків для β -лактоглобуліну не виявлено чіткої функції, незважаючи на те, що він становить найбільшу частиною фракційного складу глобулярних білків, виділених із сироватки (β -лактоглобулін 65%, α -лактальбумін 25%, сироватковий альбумін 8%, інший 2%). β -лактоглобулін є білком ліпокаліном, і може зв'язуватися із різними гідрофобними молекулами, беручи участь у їх транспорті [25]. Також було показано, що β -лактоглобулін здатний зв'язувати залізо через сидерофор [26] і, таким чином може відігравати роль у боротьбі з патогенами. Бета-лактоглобулін кіз складається із 162 амінокислотних залишків, та має молекулярну масу приблизно 18 кДа. Із повідомлення Hambling, S.G. 1992 року [27], відомо що ген бета-лактоглобуліну кіз розташований на 11 хромосомі та складається з 7 екзонів та 6 інтронів.

Існування поліморфізму білку лактоглобуліну з'явився у першій доповіді Aschaffenburg R. та Drewry J. про виникнення двох форм бета-лактоглобуліну у корів у 1955 році [28]. Поліморфізм гену лактоглобуліну у кіз вперше був проаналізований методом PCR-RFLP групою дослідників Пена у 2000 році [29]. У своєму дослідженні вони повідомили про два нові алелі гену. З того часу молекулярно-генетичний поліморфізм білку лактоглобуліну активно досліджується і він є одним із генів кандидатів молочної продуктивності жуйних тварин.

2. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ГЕНОТИПУВАННЯ

2.1. Основні вимоги до роботи ПЛР-лабораторії з генотипування

З метою організації ефективної роботи та запобігання контамінації реактивів і досліджуваних зразків до молекулярно-генетичних лабораторій висувається низка вимог.

1. Лабораторія має розділятися на зони або кімнати, в яких проводять окремі етапи ПЛР-аналізу:

зона 1 – для підготовки досліджуваних проб та виділення ДНК;

зона 2 – для підготовки та проведення ПЛР;

зона 3 – для виявлення і аналізу продуктів ампліфікації.

Роботу в лабораторії має бути організовано винятково в одному напрямі – від зони 1 до зони 3.

2. У кожному приміщенні ПЛР-лабораторії має бути індивідуальний набір реагентів, витратного матеріалу, дозаторів та лабораторного устаткування. Досліджувані проби та реагенти мають зберігатися окремо.

3. Робочі поверхні, оснащення та матеріали слід обробляти ультрафіолетом. Опромінення треба здійснювати впродовж 45 хв. до початку та після завершення роботи.

4. Витратні матеріали (пробірки, наконечники, рукавички) слід використовувати одноразово. Використані наконечники для автоматичних піпеток, пробірки та інші забруднені ДНК матеріали необхідно обробляти реагентами, які спричиняють деградацію ДНК (1М HCL, 10%-ний гіпохлорит натрію або 10% хлорне вапно, 5%-ний розчин хлораміну Б).

5. Роботу проводять дозаторами змінних об'ємів за використання одноразових пробірок і наконечників з аерозольним бар'єром.

2.2. Обладнання ПЛР-лабораторії та необхідні матеріали

- індивідуальні халати та одноразові рукавички;
- настільний бокс з бактерицидною лампою другого рівня біозахисту;

- термостат для мікропробірок від +25 до 100°C;
- центрифуга до 12–14 тис. об/хв;
- мікроцентрифуга-vortex;
- вакуумний наосос з колбою-вловлювачем;
- холодильник на 2–8°C, з морозильною камерою на –20°C;
- набір автоматичних дозаторів змінного об'єму;
- штативи для дозаторів змінного об'єму;
- одноразові наконечники різного об'єму із фільтрами;
- одноразові мікропробірки від 0,2–1,5 мл;
- ДНК-ампліфікатор (термоциклер);
- ваги аналітичні;
- магнітна мішалка для приготування розчинів;
- скляний мірний посуд;
- ванна для фарбування і відмивки гелів;
- камера для горизонтального електрофорезу;
- джерело постійного струму з напругою 150–500 В;
- трансільюмінатор;
- відеосистема для візуалізації результатів (або цифровий фотоапарат);
- мікрохвильова піч для приготування агарозних гелів;
- посуд для приготування буферів і гелів (циліндри, колби з термостійкого скла та ін.);
- дистильована вода;
- агароза;
- набір для виділення ДНК;
- суміш для проведення ПЛР;
- мінерально олія;
- специфічні олігонуклеотидніпраймери;
- зразки досліджуваної ДНК.
- тріс-основа;
- борна кислота;

- ЕДТА;
- бромистий етидій;
- маркери молекулярних мас різних довжин.

2.3. Біологічний матеріал для молекулярно-генетичного аналізу

Джерелом для виділення ДНК може слугувати будь яка речовина біологічного походження (кров, сперма, шерсть, кістки, тощо).

Найбільш широко для виділення ДНК використовують кров.

Під час відбирання проб і підготовки досліджуваного матеріалу необхідно дотримуватись техніки безпеки, керуючись чинними правилами та інструкціями. Забір крові проводиться з яремної вени одноразовим шприцем об'ємом 5–10 мл або вакуумними системами типу *Venopject*, *Vacutainer* тощо (з ЕДТА або цитратом натрія). Якщо забір здійснюється в шприц, кров переноситься в одноразові пробірки з антикоагулянтом (3% розчин ЕДТА (трилон Б) із розрахунку 10:1 або 3,8 % розчином цитратанатрія у співвідношенні 1:9). Для ДНК-аналізу достатньо 0,5 мл крові. !!! Гепарин як антикоагулянт – не використовують, бо він проходить крізь усі процедури очищення і пригнічує фермент Таq-полімерази у процесі ПЛР.

Під час забору зразків біоматеріалу складається відповідний акт, де вказують: список тварин, назву господарства в якому зроблено відбір та дату відбору.

Зразки доставляють у лабораторію в день відбирання або наступного дня, зберігаючи його за 4 °С. Для тривалого зберігання кров заморожують за – 20 °С.

2.4. Виділення препаратів ДНК (зона 1)

В залежності від її природи використовуються різні підходи та методики виділення ДНК.

Загалом схема виділення ДНК виглядає наступним чином:

- руйнування тканини з наступним отриманням гомогенної речовини;
- лізис клітинних мембран та екстракція ДНК;

- ізоляція ДНК від білків;
- очистка від зайвих органічних сполук

Наразі існує чимала кількість комерційних наборів для виділення ДНК, що ґрунтуються на використанні речовин для денатурації білків та сорбентів, які значно прискорюють процес виділення нуклеїнових кислот. Кожен з таких наборів містить докладний опис методики виділення ДНК.

Вибір методики виділення ДНК залежить від мети дослідження та подальшого терміну зберігання препаратів. Саме для тривалого зберігання препаратів ДНК і застосовують сорбційні методи.

Для експрес-аналізу ДНК використовують реагент "Chelex-100" (термін зберігання ДНК – 30 діб).

Експрес метод виділення ДНК:

до 150 мкл крові додають 850 мкл деіонізованої H_2O , ретельно перемішують та інкубують за кімнатної температури 30 хв, періодично струшуючи. Центрифугують впродовж 1 хв при 6 тис. об/хв, обережно видаляють супернатант. Додають 170–180 мкл 5%-ного стерильного водного розчину "Chelex-100" та інкубують впродовж 15–30 хв за 56 °С. Ретельно перемішують шляхом струшування та витримують 8 хв за 100 °С. Центрифугують проби впродовж 5 хв при 6 тис. об/хв. Для ампліфікації використовують 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК. Зберігають зразки за -20 °С. Після кожного розморожування зразки перемішують та центрифугують впродовж 5 хв при 6 тис. об/хв.

Визначення концентрації та зберігання препаратів ДНК

Перед проведення ПЛР обов'язково проводять контроль концентрації ДНК. Концентрацію та ступінь очищення препарату ДНК визначають спектрофотометрично (за довжини хвилі 260 та 280 нанометрів) або шляхом порівняння з еталонними зразками відомої концентрації (наприклад, ДНК бактеріофагу λ).

Препарати ДНК зберігають за температури -20°C. Для ампліфікації препарат ДНК розводять до робочої концентрації 10–20 нг/мкл.

2.5. Ампліфікація геномних локусів (зона 2)

Для ДНК-ампліфікації використовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Суть методу – багатократний направлений синтез ДНК із дезоксирибонуклеотидтрифосфатів за присутності термостабільної ДНК-полімерази. Специфічність синтезу (ампліфікації) вибраної ділянки ДНК визначається синтетичними праймерами-затравками.

1. Реактиви (компоненти ПЛР-суміші), що використовують для ампліфікації ДНК у ПЛР дістають з морозильної камери і розморожують при кімнатній температурі. Усі компоненти ПЛР-суміші ретельно перемішати на Vortex.

2. Необхідну кількість чистих пробірок залежно від моделі ампліфікатора об'ємом від 0,2 до 0,5 мл, маркують відповідно кількості до досліджуваних зразків ДНК.

3. Для зменшення помилки саплерів при одночасній постановці декількох реакцій суміш готують в одній пробірці відповідно до таблиці 1 (крім ДНК). Об'єм ПЛР-суміші розраховують виходячи із кількості досліджуваних зразків. Після внесення всіх реагентів (за винятком ДНК) суміш ретельно перемішують, краплі осаджують центрифугуванням.

4. Після того як ПЛР-суміш буде внесена в попередньо промарковані пробірки, в них додають відповідну кількість ДНК окремими для кожної проби наконечниками.

5. Для контролю контамінації реагентів, з кожною реакцією необхідно вводити негативні контролю (НК) і позитивні контролю (ПК). У пробірку НК вносять 5 мкл деіонізованої води, а в пробірку з ПК – по 5 мкл зразку контрольної ДНК.

6. При використанні для ампліфікації термоциклеру без кришки з підігрівом, в пробірки додатково вносять по 15–30 мкл мінеральної олії для молекулярних досліджень.

1. Склад реакційної суміші.

№	Компонент	Концентрація	Розрахунок на об'єм однієї пробірки (25 мкл)	Кінцева конц.
1	Буфер для ПЛР	10 х	2,5 мкл	1 кратний
2	Суміш dNTP	кожен в конц. 2 мМ	2,5 мкл	200 мк 0,2 мкМ
3	Прямий праймер	50 мкМ	0,2 мкл	0,4 мкМ
4	Зворотній праймер	50 мкМ	0,2 мкл	0,4 мкМ
5	Тaq-полімераза	5 од/мкл	0,2 мкл	0,04 од/мкл
6	Розчин MgCl ₂	50 мМ	1 мкл	2 мМ
7	Розчин ДНК	50 пкг–1 мкг	Визначається користувачем	4 нг/мкл
8	H ₂ O		Довести до 25 мкл	

7. Пробірки з готовим вмістом для проведення ПЛР центрифугують на VORTEX 5–10 сек.

8. Пробірки переносять до термоблоку ампліфікатора та запускають відповідну програму ПЛР (табл. 2).

9. Після закінчення реакції ампліфікації пробірки переносять до кімнати аналізу продуктів ПЛР. Дозволяється зберігати отримані ПЛР-продукти не більше 24 годин за температури 4 °С, інакше – заморожувати для довготривалого зберігання за температури –20 °С. Робота з ампліфікованою ДНК повинна проводитися в окремій кімнаті лаборантом чи співробітником лабораторії, які не працюють у ПЛР приміщенні.

2. Послідовності праймерів та параметри проведення ПЛР

Ген	Послідовності праймерів	Параметри ПЛР		
		Т, °С	час	циклів
Велика рогата худоба				
CSN2	5'- CCTTCTTTCCAGGATGAACTCCAG-3'; 5'-AGTACGAGGAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTCT-3'.	95	5 хв	1
		95	10 с	30
		58	30 с	
		72	30 с	
		72	5 хв	1
Кози				
κ-CN	F 5' –TCCCAATGTTGTACTTTCTTAACATC-3', R 5 – GCGTTGTCCTCTTTGATGTCTCCTTAG -3'	95	4 хв	1
		95	30 с	35
		63	30 с	
		72	1 хв	
		72	5 хв	1
βLG	F5'-CGGGAGCCTTGGCCCTCTGG– 3' R5'-CCTTTGTCTGAGTTTGGGTGT– 3'	95	4 хв	1
		95	30 с	35
		65	30 с	
		72	1 хв	
		72	5 хв	1

2.6. Електрофоретичний аналіз ПЛР-продуктів (зона 3)

Електрофорез в агарозних дозволяє розділяти молекули ДНК за їх розмірами. Швидкість переміщення молекул ДНК в гелі обернено пропорційна логарифму їх розміру (молекулярної ваги). При цьому гелі фарбують бромистим етидієм, який є інтеркаліруючим барвником і зв'язується з молекулою ДНК. Ультрафіолетове світло поглинається бромистим етидієм та ДНК, та повертається у вигляді флюоресценції в спектрі видимого світла при 590 нм.

Розмір фрагментів ДНК визначають шляхом порівняння їх рухомості з маркерами молекулярних мас. Мінімальна кількість ДНК, яку можна побачити при фотографуванні геля, фарбованого бромистим етидієм, 2 нг при ширині полоски 0,5 см, оптимальна кількість 40–60 нг.

Приготування агарозного гелю. Для проведення електрофорезу приготувати 1х робочий буфер (склад 50х буферу: 242 г Тріс-основний; 57 мл льодяної оцтової кислоти; 100 мл 0,5 М ЕДТА, рН 8,0; H₂O до 1 л).

1. Для приготування 2%-ного агарозного гелю в колбу з термостійкого скла (~ на 250 мл) внести 2 г сухої агарози і 100 мл 1х робочого буферу. Додати бромистий етидій до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл. Розчинити агарозу в мікрохвильовій печі.

УВАГА! Бромистий етидій – канцерогенна сполука. Під час роботи з ним слід дотримуватись правил безпеки. Всі реагенти і матеріали, які містять бромистий етидій, слід утилізувати.

2. Після повного застигання гелю (~ 30 хв), обережно вилучити гребінь і помістити гель у електрофоретичну камеру. Залити в неї 1хТВЕ робочий буфер так, щоб гель був покритий шаром буферу товщиною 1 мм.

3. Використовуючи окремі наконечники, внести по 5 мкл кожного зразка в лунки гелю. У кожному рядку обов'язково мають бути негативні і позитивні контролю і ДНК-маркер молекулярних мас.

4. Підключити камеру до джерела струму, дотримуючись полярності (молекули ДНК рухаються до позитивного електроду). Провести електрофорез упродовж 30–40 хв за напруги електричного поля 10 В/см.

5. Після завершення електрофорезу перенести гель на транслюмінатор і, якщо необхідно, сфотографувати.

УВАГА! Ультрафіолет шкідливий для очей. Під час перегляду і фотографування гелів обличчя має бути захищеним спеціальною маскою.

2.7. Рестрикційний аналіз ПЛР-продуктів (зона 3)

Рестрикційне розщеплення передбачає гідроліз ПЛР-продуктів ендонуклеазами рестрикції в буфері, склад якого оптимізовано для кожного конкретного ферменту. Детальні умови проведення рестрикції наводяться в паспортах до ферментів.

Протокол проведення рестрикційного аналізу:

1. Розморозити пробірку з реактивами, що використовуються для рестрикції ампліфікатів та ретельно перемішати на Vortex.
2. Для зменшення помилки саплерів при одночасній постановці декількох реакцій суміш для рестрикції готують в одній пробірці відповідно до таблиці 3 (крім ампліфікату). Об'єм рестрикційної суміші розраховують виходячи із кількості досліджуваних зразків. Після внесення всіх реагентів суміш ретельно перемішують, краплі осаджують центрифугуванням.

3. Суміш для рестрикції

№	Компонент	Концентрація	Розрахунок на об'єм однієї пробірки
1	Вода		18 мкл
2	Буфер	10x	2 мкл
3	Рестриктаза	10 од./мкл	1–2 мкл
4	Ампліфікат		25 мкл

3. По 21–22 мкл готової суміші додати в пробірки з продуктами ампліфікації.

4. Пробірки з компонентами перемішують на Vortexта центрифугують 15–30 с при 6 тис об/хв.

5. Помістити проби в термостат та інкубувати впродовж 1–16 год за температурних умов, прописаних в інструкції від виробника з використання ендонуклеази.

6. Після завершення провести електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції в 2 %-ному агарозному гелі.

7. В лунки вносити по 10–20 мкл реакційної суміші. У кожному рядку має бути ДНК-маркер молекулярних мас, і, бажано, нерестрикований ПЛР-продукт.

8. Сфотографувати отримані паттерни і занести в комп'ютерну базу даних.

Реактиви для проведення ПЛР, рестрикційного аналізу і контролю зберігають за температури -20°C .

Генотип тварини визначають за розмірами продуктів рестрикції (алельними варіантами) (табл. 4).

4. Молекулярна маса ПЛР-продуктів та продуктів рестрикції

Ген	ПЛР-продукт, п. н.	Рестриктаза	Алелі, п. н.
<i>CSN2</i>	121	Ddel	A1 – 121 A2 – 86, 35
<i>κ-CN</i>	645	Hae III	A – 416, 229 G – 366, 229, 50
<i>βLG</i>	426	SacII	A – 426 B – 349, 77

Генотипи тварин за поліморфізмом гену бета-казеїну BPX (***CSN2***):

A1A1 – 121 п. н., A2A2 – 86, 35 п. н., A1A2 – 121, 86, 35 п. н.

Генотипи тварин за поліморфізмом гену капа-казеїну кіз (***κ-CN***): AA – 416,

229 п. н., GG – 366, 229, 50 п. н., AG – 416, 366, 229, 50 п. н.

Генотипи тварин за поліморфізмом гену бета-лактаглобуліну кіз (***βLG***) AA

– 426 п. н., BB – 349, 77 п. н., AB 426, 349, 77 п. н.

2.8. Інтерпретація результатів досліджень

Характеристику генетичного поліморфізму за генами бета-казеїну (*CSN2*) ВРХ, капа-казеїну кіз (*κ-CN*) та бета-лактаглобуліну кіз (*BLG*) проводили в відділі генетики та біотехнології тварин ІРГТ ім.М.В.Зубця НААН. На рисунках 3, 4 та 5 зображено спектри продуктів рестрикції досліджених генів.

Матеріалом для дослідження бета-казеїну (*CSN2*) ВРХ слугувала периферійна кров ($n = 300$) від корів сірої української породи (173 гол.), білоголової української породи (31 гол.), бурої карпатської породи (30 гол.) та українських водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) (66 гол.).

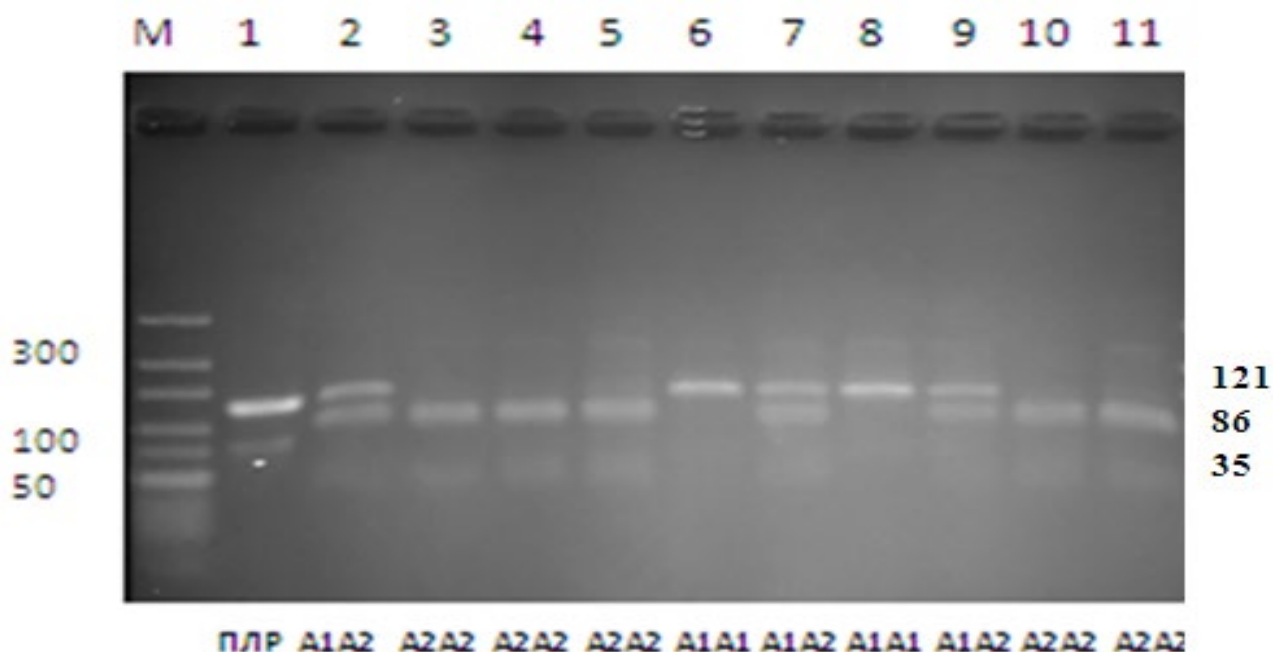


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції щодо генотипів за *CSN2*: М – маркер молекулярних мас; генотипи зразків вказані на фото

Частоти алелів та генотипів гена *CSN2* значно відрізняються у всіх досліджених порід великої рогатої худоби (табл.5). Частоти A2-алелю *CSN2* варіюють від 0 до 1,0, а генотипів *CSN2*^{A1A2} від 0 до 0,844 та *CSN2*^{A1A1} від 0 до 0,480.

5. Частота алелів та генотипів за локусом гена бета-казеїну у тварин досліджених порід ВРХ

Порода ВРХ	n	Частота генотипов	Частота алелів	H ₀	H _e	F _{is}
Сіра українська	173	A1A1 – 0,11 A1A2 – 0,844 A2A2 – 0,046	A1–0,532 A2–0,468	0,844	0,498	– 0,695
Білоголова українська	31	A1A1 – 0,480 A1A2 – 0,520 A2A2 – 0	A1– 0,740 A2–0,260	0,52	0,385	– 0,351
Бура карпатська	30	A1A1 – 1 A1A2 – 0 A2A2 – 0	A1–1 A2–0	–	–	–
Буйволи	66	A1A1 – 0 A1A2 – 0 A2A2 – 1	A1–0 A2 –1	–	–	–

Максимальний (100%) вміст A2-алелю відмічено у буйволів, а мінімальний – у бурій карпатській породі (A2-аллель відсутній). Частота $CSN2^{A2A2}$ -генотипу у всіх досліджених порід, крім водяного буйвола, була низькою (0,046) або цей генотип не зустрічався. Серед досліджених тварин сірої української породи гомозиготний генотип $CSN2^{A1A1}$ виявлено у 19 тварин, гетерозиготи генотип $CSN2^{A1A2}$ – у 146 тварин та «бажаний» генотип $CSN2^{A2A2}$ – лише у 8 тварин. Загалом у сірої української породи найчастіше зустрічався гетерозиготний генотип $CSN2^{A1A2}$ (0,844), тому відповідно переважав A1-аллель (0,532).

У білоголовій українській породі визначався гомозиготний генотип $CSN2^{A1A1}$ у 15 тварин, гетерозиготний генотип $CSN2^{A1A2}$ – у 16 тварин, а гомозиготний генотип $CSN2^{A2A2}$ – не виявлено у жодної тварини. Частоти виявлених алелів вказують на значну перевагу алелів A1 (0,740). За результатами

вивчення частоти алелів та генотипів гена бета-казеїну (*CSN2*) у бурій карпатській породі ВРХ виявлено відсутність поліморфізму. Усі протестовані тварини були носіями *CSN2^{A1A1}*-генотипу. Висока частота А2-алелю (1,0) та А2А2-генотипу (1,0) за геном *CSN2* у буйволів виділяє їх з усіх досліджених порід і робить особливо цінними для використання в молочному скотарстві.

Генотипування кіз. Матеріалом для виділення ДНК із кіз слугувала периферійна кров кіз зааненської породи (n = 60)

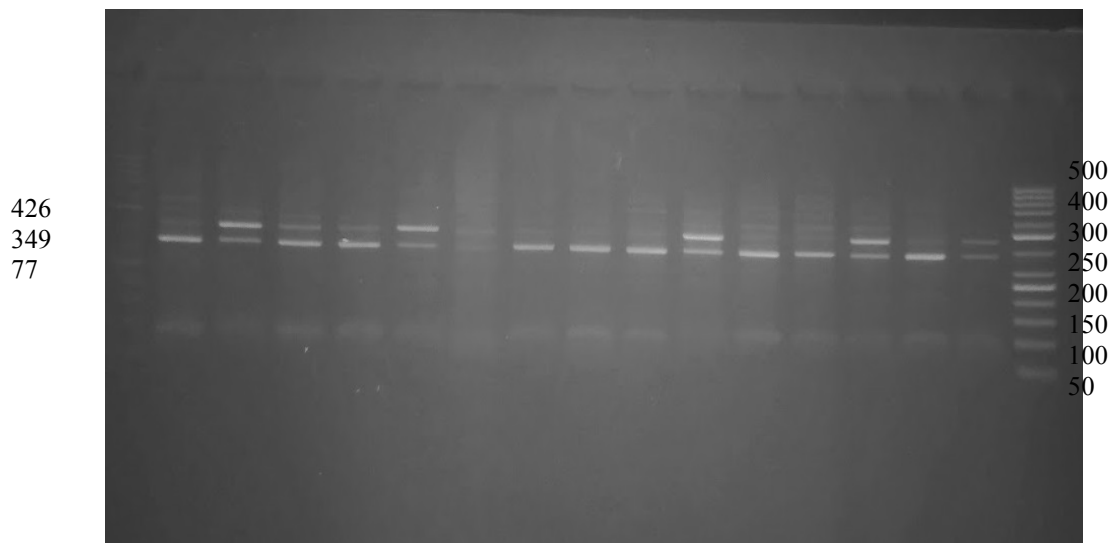


Рис. 4. Електрофореграма продуктів рестрикції ампліфікованих фрагментів локусу *BLG*.

В дослідженні було виявлено, що у групі кіз зааненської породи за геном бета-лактаглобуліну (*BLG*) алель G зустрічався з частотою 0,716, а алель А відповідно із частотою 0,283. Фактична гетерозиготність (0,500) перевищувала очікувану (0,403), а індекс фіксації Райта становив -240 (табл. 6).

Проведене дослідження по виявленню поліморфізма за геном капа-казеїну (κ -Сп) з'ясувало, що вся обрана група тварин, мала один генотип за даним локусом, а саме генотип АА (Рис. 5).

**6. Частота алелей та генотипів за локусом гена
бета-лактаглобуліну (*BLG*) кіз.**

Порода кіз	n	Частота генотипов	Частота алелів	H_0	H_e	F_{is}
Зааненська	60	GG – 0,467 AG – 0,5 AA – 0,046	G–0,716 A–0,283	0,500	0,403	– 0,695

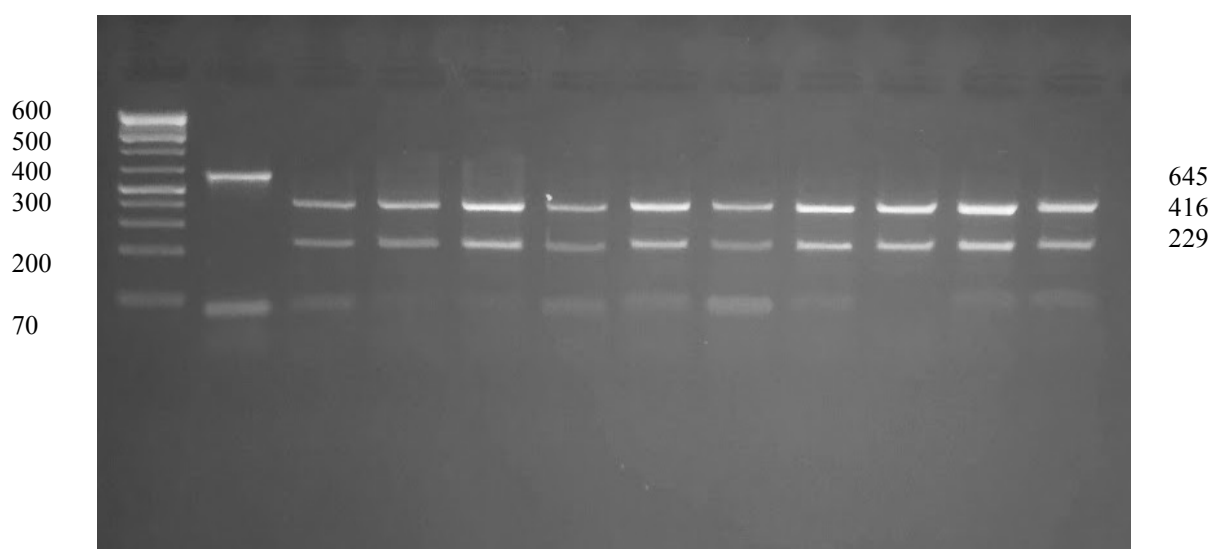


Рис. 5. Електрофореграма продуктів рестрикції ампліфікованих фрагментів
локусу κ -Cn.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kipfer S., Goldman R. D. Formula choices in infants with cow's milk allergy. *Can Fam Physician*. 2021. Vol. 67, № 3. P. 180–182. DOI: 10.46747/cfp.6703180. PMID: 33727377; PMCID: PMC7963007
2. Fiocchi A., Brozek J., Schünemann H., Bahna S. L., von Berg A., Beyer K. Diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA): a summary report. *World Allergy Organ*. 2010. Vol. 3, № 4. P. 57–161. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.10.011
3. Robinson F. Goats milk – a suitable hypoallergenic alternative? *British Food Journal*. 2001. Vol. 103, No. 3. P. 198–208. DOI: org/10.1108/00070700110386746.
4. Farrell Jr. H. M., Flores, Jimenez 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. DOI:org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6
5. Ladyka V. I., Pavlenko YU. M., Drevyts'ka T. I., Dosenko V. YE., Sklyarenko Y. U. The investigation of beta-casein gene polymorphism and its relationship with milk composition in cows. *Tekhnolohiya vyrobnytstva i pererobky produktsiyi tvarynnystva*. 2021. Vol. 2. P. 92–100. DOI:org/10.33245/2310-9289-2021-166-2-92-100
6. Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. F. Encyclopedia of dairy sciences. London : Academic press. 2003. 2799 p.
7. Jaiswal K. De S., Sarsavan A. Detection of single nucleotide polymorphism by T-ARMS PCR of cross bred cattle Karan Fries for A1, A2 beta casein types. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*. 2014. Vol. 1. P. 18–22.
8. Caroli A. M., Chessa S., Erhardt G. J. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J. Dairy Sci*. 2009. Vol. 92. P. 5335–5352. DOI: 10.3168/jds.2009-2461
9. Şahin Ö., Boztepe S., Aytekin I. A1 and A2 Bovine Milk, the Risk of Beta-casomorphin-7 and Its Possible Effects on Human Health:(I) A1 and A2 Milk and the Risk of Beta-casomorphin-7. *Selcuk J. Agr Food Sci*. 2018. Vol. 32. № 3. P. 632–639. DOI: org/10.15316/SJAFS.2018.147
10. Sharma V., Sharma N., Jawed B., Nautiyal S. C. High resolution melt curve analysis for the detection of A1, A2 β -casein variants in Indian cows. *J. Microbiol. and Biotechnology Research*. 2013. Vol. 3. P. 144–148.
11. Massella E., Piva S., Giacometti F., Liuzzo G., Zambrini A., Serraino A. Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in northern Italy. *Italian Journal of Food Safety*. 2017. Vol. 6. P. 131–133.
12. Pal S., Woodford K., Kukuljan S., Ho. S. Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients*. 2015. Vol. 7, № 9. P. 7285–7297.
13. RaiesulHaq M., Kapila R., Shandilya U. K. & Kapila S. Impact of Milk Derived β -Casomorphins on Physiological Functions and Trends in Research: A Review. *International Journal of Food Properties*. 2014. Vol. 17, № 8. P. 1726–1741.

14. Elliott R. B., Harris D. P., Hill J. P. Type I insulin dependent diabetes mellitus and cow milk: Casein variant consumption. *Diabetologia*. 1999. Vol. 42, № 3. P. 292–296.
15. Panicke L., Freye G., Erhardt G. *48th Annual Meeting of the European Association for Animal Production* am 25.-28.08.1997 in Vienna/Austria. 1997. 514 p.
16. Mishra B., Mukesh M., Prakash B., Sodhi M., Kapila R., Kishore A., Kataria R., Joshi B., Bhasin V., Rasool T. Status of milk protein, b-casein variants among Indian milch animals. *Indian J. Anim Sci.* 2009. Vol. 79. P. 722–725.
17. Gutiérrez A., Meade H. M., Ditullio P., Pollock D., Harvey M. Expression of a bovine kappa-CN cDNA in the mammary gland of transgenic mice utilizing a genomic milk protein gene as an expression cassette. *Transgenic Res.* 1996. Vol. 5, № 4. P. 271–279. DOI: 10.1007/BF01972881
18. Ladyka L. M., Shapovalov S. O., Fotina T. I. Physico-chemical composition of goat milk under conditions of monitoring studies of its quality in Eastern Ukraine. *Naukovo-tekhnichnyy byuleten' instytutu biolohiyi tvaryn i derzhavnoho naukovo-doslidnoho kontrol'noho instytutu vetpreparativ ta kormovykh dobavok*. L'viv, 2014. Vol. 5, № 1. P. 27–34.
19. Boland M., MacGibbon A., Hill J. Designer milks for the new millenium. *Livest. Prod. Sci.* 2001. Vol. 72. P. 99–109.
20. Rijnkels M. Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2002. Vol. 7. P. 327–345. DOI: 10.1023/a:1022808918013
21. Kupper J., Chessa S., Rignanese D., Caroli A., Erhardt G. Divergence at the casein haplotypes in dairy and meat goat breeds. *J. Dairy Res.* 2010. Vol. 77. P. 56–62.
22. Patel S. B., Pande A. M., Rank D. N., Arya J. S., Jacob N. Polymorphic characteristics of Kappa casein in Zalawadi goat. *Indian Journal of Biotechnology*. 2011. Vol. 10. P. 235–237.
23. Marletta D., Criscione A., Bordonaro S., Guastella A. M., D'Urso G. Casein polymorphism in goat's milk. *Dairy Science and Technology*. 2007. Vol. 87. P. 491–504 DOI: 10.1051/LAIT:2007034
24. Ballester M., Sa'nchez A., Folch J. M. Polymorphisms in the goat b-lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Research*. 2005. Vol. 72. P. 379–384. DOI: 10.1017/S0022029905000981
25. Kontopidis G., Holt C., Sawyer L. Invited review: β Lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J. Dairy Sci.* 2004. Vol. 87, № 4. P. 785–796. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1.
26. Franziska Roth-Walter, Luis F. Pacios, Cristina Gomez-Casado, Gerlinde Hofstetter. The Major Cow Milk Allergen Bos d 5 Manipulates T-Helper Cells Depending on Its Load with Siderophore-Bound Iron. *PLoS One*. 2014. Vol. 9, № 8. e104803. DOI: org/10.1371/journal.pone.0104803
27. Hambling S. G., McAlpine A. S., Sawyer L. In *Advanced Dairy Chemistry 1* (Fox, P. F., ed.). *Elsevier Science*, London. 1992. P. 141–190.
28. Aschaffenburg R., Drewry J. Occurrence of different lactoglobulin in cow's milk. *Nature*. 1955. Vol. 176. P. 218–210.

29. Pena R. N., Sanchez A., Folch J. M. Characterization of genetic polymorphism in the goat beta-lactoglobulin gene. *J. Dairy Res.* 2000. Vol. 67, № 2. P. 217–224. DOI: [org/10.1017/S0022029900004155](https://doi.org/10.1017/S0022029900004155)

НАУКОВО-МЕТОДИЧНЕ ВИДАННЯ

Валентина Валентинівна Дзіцюк

Наталія Борисівна Мохначова

Марія Леонідівна Добрянська

ВИЯВЛЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ ТВАРИН, АСОЦІЙОВАНИХ З ГІПОАЛЕРГЕННИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ МОЛОКА

Методичні рекомендації

Комп'ютерна верстка та макетування М. Л. Добрянська

Підписано до друку 03.11.2022 р.

Формат 60x84 1/16

Ум. друк арк. 1.7

Наклад 100 прим.

Надруковано в Інституті розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН
вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н., Київська обл., 08321
Свідоцтво ДК № 7292 від 25.03.2021.