

УДК 636.2:575.113.2/.22:577.21

DOI: <https://doi.org/10.31073/abg.66.14>

ОСОБЛИВОСТІ ТИПУВАННЯ ОСОБИН ВРХ ЗА АЛЕЛЬНИМИ ВАРІАНТАМИ A^1 ТА A^2 ГЕНУ БЕТА-КАЗЕЇНУ: ВИКОРИСТАННЯ РІЗНИХ МЕТОДИЧНИХ ПІДХОДІВ (AS-PCR ТА ACRS-PCR)

Р. О. КУЛІБАБА¹, М. І. САХАЦЬКИЙ¹, Ю. В. ЛЯШЕНКО²

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України (Київ, Україна)

²Інститут тваринництва НААН (Харків, Україна)

<https://orcid.org/0000-0003-1776-7147> – Р. О. Кулібаба

<https://orcid.org/0000-0002-6113-0226> – М. І. Сахацький

<https://orcid.org/0000-0003-2747-476X> – Ю. В. Ляшенко

romankx37@gmail.com

В представленій статті розглянуто питання порівняльного аналізу ефективності типування особин великої рогатої худоби за алельними варіантами A^1 та A^2 гену бета-казеїну за використання різних методичних підходів. Як основні використовуються методи AS-PCR (AS-PCR 244 bp та AS-PCR 854 bp) та ACRS-PCR (ACRS-PCR DdeI та ACRS-PCR TaqI). Для проведення порівняльного аналізу ефективності типування використовували методи біоінформатики та лабораторній діагностики. За результатами досліджень встановлено переваги та недоліки кожного з використаних методичних підходів, визначено специфічність та точність фланкування дослідного фрагменту гену бета-казеїну корів, доведено необхідність оптимізації алгоритмів типування згідно наявних умов за використання модельних об'єктів. За результатами проведених досліджень розроблено ефективний загальний алгоритм типування із застосуванням методів AS-PCR та ACRS-PCR. В якості основного, для проведення рутинного генотипування особин ВРХ, пропонується використання методу алель-специфічної ПЛР та ACRS-PCR як інструменту перевірки результатів у випадку з неоднозначними висновками та для сліпого типування зразків тощо.

Ключові слова: поліморфізм, ген, алель, бета-казеїн, рестрикція, ПЛР, ДНК, велика рогата худоба

GENOTYPING OF CATTLE BY ALLELIC VARIANTS A^1 AND A^2 OF THE BETA-CASEIN GENE: EMPLOYING DIFFERENT METHODOLOGICAL APPROACHES (AS-PCR AND ACRS-PCR)

R. O. Kulibaba¹, M. I. Sakhatskiy¹, Yu. V. Liashenko²

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine (Kyiv, Ukraine)

²The Institute of Animal Science of NAAS (Kharkiv, Ukraine)

This article addresses the comparative analysis of the efficiency of cattle genotyping based on allelic variants $A1$ and $A2$ of the beta-casein gene, employing different methodological approaches. The primary methods employed include AS-PCR (AS-PCR 244 bp and AS-PCR 854 bp) and ACRS-PCR (ACRS-PCR DdeI and ACRS-PCR TaqI). Bioinformatics and laboratory diagnostics methods were used for a comparative analysis of genotyping efficiency. The study results unveiled the ad-

vantages and disadvantages of each methodological approach employed, it identified the specificity and accuracy of flanking the experimental fragment of the bovine beta-casein gene and underscored the necessity to optimize typing algorithms based on prevailing conditions when utilizing model objects. Based on the results of the research, an effective general typing algorithm was developed using the AS-PCR and ACRS-PCR methods. The allele-specific PCR method is proposed as the primary approach for routine genotyping of cattle, with ACRS-PCR suggested as a tool to verify results in cases of ambiguous findings and for blind typing of samples, among other applications.

Keywords: polymorphism, gene, allele, beta-casein, restriction, PCR, DNA, cattle

Вступ. В останні роки, на тлі актуалізації проблеми отримання якісної та безпечної для людини продукції тваринництва, у генетиці великої рогатої худоби особливого значення набуває питання визначення різних форм бета-казеїну в молоці корів – A1 та A2 варіантів (Jiménez-Montenegro et al., 2022; Sebastiani et al., 2022). На відміну від інших показників якості молочної продукції, визначення типу бета-казеїну проводять не за аналізу молока, а за типування його продуцентів. Таким чином, використання саме ДНК-технологій для ідентифікації алелів A¹ та A² гену бета-казеїну корів – це, практично, безальтернативний ефективний інструмент для вирішення вищезазначених питань. Відмінності у типі молока, A1 чи A2, обумовлені генетичними особливостями – різні форми молока розрізняються за типом бета-казеїну, що міститься в ньому (Antonopoulos et al., 2021; Kay et al., 2021). Кожний з різних типів бета-казеїну відрізняється за своїм амінокислотним складом (варіації в позиції 67 бета-казеїну) (Raynes et al., 2015; Vigolo et al., 2023). У свою чергу, різні породи корів характеризуються відмінностями у співвідношенні частот алелів A¹ та A², що призводить до труднощів у питанні створення стад продуцентів молока певного типу (Oglobline et al., 2022; Ladyka et al., 2023).

На сьогоднішній день існує низка різних методичних підходів до типування алельних варіантів A¹ та A² локусу бета-казеїну корів (Mayer et al., 2021). В якості загальних можна виділити методи, які ґрунтуються на використанні «класичних» інструментів лабораторної діагностики – ПЛР з детекцією продуктів ампліфікації/рестрикції в гелі. В якості основних використовується декілька таких підходів – у першу чергу це алель-специфічна ПЛР (AS-PCR) та метод внесення штучного сайту рестрикції (ACRS-PCR) (Mayer et al., 2021). Використання методичних підходів на основі стандартної ПЛР має низку переваг на тлі більш специфічних методик, до яких, у першу чергу, відноситься використання ПЛР у реальному часі та пряме секвенування дослідного фрагменту гену. Незважаючи на наявні переваги останніх, вони досі не отримали широкого розповсюдження, внаслідок відносно високої вартості у випадку проведення доволі масштабних генотипувань. У представленій роботі ми акцентуємо увагу на дослідженні (порівняльному аналізі) ефективності методів, заснованих на використанні саме класичної ПЛР з електрофоретичним розділенням продуктів ампліфікації/рестрикції.

В основі методу ACRS-PCR (Artificially Created Restriction Site Polymerase Chain Reaction) лежить використання ендонуклеази рестрикції, але, на відміну від класичного PCR-RFLP, сайт для ферменту наявний тільки в ампліконі, а не у вихідному фрагменті гену (Pauciullo et al., 2021). Створення штучного сайту рестрикції в ампліконі відбувається за рахунок використання особливого праймеру, який у своєму складі містить «помилковий» (mismatch) нуклеотид. За результатами ампліфікації цільового фрагменту в ампліконі формується сайт рестрикції за рахунок наявності певного нуклеотиду в алелі та mismatch-нуклеотиду в праймері (Dąbrowski et al., 2019). Після ампліфікації проводиться стандартний рестрикційний аналіз із наступним електрофоретичним розділенням отриманих фрагментів у гелі. На цьому етапі, метод ACRS-PCR, фактично, не відрізняється від класичного рестрикційного аналізу. Розмір рестрикційних продуктів, у цьому випадку, залежить від довжини праймеру з mismatch-нуклеотидом, що призводить до певних обмежень у процедурі підбору та синтезу праймерів. Слід зазначити, що цей метод використовується для визначення алель-

них варіантів самих різних генів (тобто його використання не обмежено лише аналізом поліморфізму локусу бета-казеїну) (Ding et al., 2017).

Використання ACRS-PCR дає можливість достатньо успішно генотипувати особин великої рогатої худоби за локусом бета-казеїну.

Одна з перших модифікацій цього методу була запропонована у 1992 році Lien зі спів-авторами на основі використання TaqI у якості ендонуклеази рестрикції (Lien et al., 1992). У наступні роки виникла ціла низка модифікацій, до однієї з найбільш розповсюджених можна віднести метод, який ґрунтується на використанні ендонуклеази рестрикції DdeI (McLachlan, 2006).

Варіативність ефективності вищезазначених методів полягає в основі необхідності пошуку нових та оптимізації існуючих методик типування алелів бета-казеїну, що набуває особливої вагомості у контексті проведення генотипування особин ВРХ для вирішення комерційних питань.

В якості альтернативного варіанту розроблені методи алель-специфічної ПЛР (AS-PCR) (Giglioti et al., 2021; Ristanic et al., 2022). Алель-специфічна ПЛР має низку переваг відносно методу ACRS-PCR – у першу чергу це стосується відсутності необхідності використання ендонуклеази рестрикції та, відповідно, стадії рестрикції, що призводить до економії часу та матеріалів. Незважаючи на це, у метода AS-PCR є певні недоліки, що і призводить до необхідності проведення оптимізації протоколів та загальної процедури типування. Слід зазначити, що AS-PCR є також достатньо розвинутою методикою та використовується не тільки для типування алельних варіантів бета-казеїну, але і для визначення поліморфізму самих різних об'єктів (Chubarov et al., 2020; Lee et al., 2022; Lim et al., 2022).

Генотипування особин великої рогатої худоби за алелями A^1 та A^2 локусу бета-казеїну проводиться у різних регіонах світу, що вказує на дедалі зростаючий інтерес до цієї проблеми (Jiménez-Montenegro et al., 2022; Khan et al., 2023). В останні роки інтерес до генотипування особин ВРХ різних порід відмічений і в Україні, про що свідчить низка публікацій (Ladyka et al., 2021; Mokhnachova, 2021). При цьому, дослідження з оптимізації та підвищення ефективності методів типування особин ВРХ набуває все більшої актуальності на тлі загальної комерціалізації завдання в цілому.

Мета досліджень представленої роботи – порівняльний аналіз ефективності альтернативних методів типування особин великої рогатої худоби за алельними варіантами A^1 та A^2 гену бета-казеїну. Представлені результати є логічним продовженням досліджень за проектом №1110/8-пр-2022 “Розробити технологію молекулярно-генетичного забезпечення селекційного процесу зі створення стад корів-продуцентів $A2$ молока”. У наших попередніх публікаціях детально розглянуто питання стосовно особливостей використання методів AS-PCR (алель-специфічної ПЛР) та ACRS-PCR для диференціації алелів A^1 та A^2 гену *CSN2* (Kulibaba et al., 2023a, 2023b). Однак у представленій статті ми сфокусуємось на вирішенні питання стосовно особливостей оптимізації методичних підходів саме у порівняльному, між двома альтернативними маркерними системами, аспекті.

Матеріали та методи досліджень. З метою дослідження ефективності генотипування особин великої рогатої худоби за алелями A^1 та A^2 локусу бета-казеїну як модельний об'єкт використовували проби ДНК від корів української чорно-рябої молочної породи (цільна кров тварин).

Виділення ДНК проводили за допомогою комерційного набору реагентів «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс»). Генотипування дослідних порід великої рогатої худоби проводили за методами ACRS-PCR (2 методи – за використання ендонуклеаз рестрикції TaqI та DdeI) та AS-PCR (2 методи).

Для проведення ампліфікації фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну використовували специфічні олігонуклеотиди.

Метод ACRS-PCR (DdeI) (McLachlan, 2006).

DdeI F: CCTTCTTTCCAGGATGAACTCCAGG;

DdeI R: GAGTAAGAGGAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTCT.

Метод ACRS-PCR (TaqI) (Lien et al., 1992).

TaqI F: CCTGCAGAATTCTAGTCTATCCCCTTCCCTGGGCCCATCG;

TaqI R: GAGTCGACTGCAGATTTTCAACATCAGTGAGAGTCAGGCTCTG.

Метод AS-PCR 244 bp (Ganguly et al., 2013).

IGBR: AGACTGGAGCAGAGGCAGAG;

IGBhF (A¹): CTTCCCTGGACCCATCCA;

IGBpF (A²): CTTCCCTGGACCCATCCC.

Метод AS-PCR 854 bp (Keating et al., 2008).

854 F: GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG;

854 R (A¹): GATGTTTTGTGGGAGGCTGTTAT;

854 R (A²): GATGTTTTGTGGGAGGCTGTTAG.

Для ампліфікації дослідного фрагменту гену бета-казеїну використовували наступні програми ампліфікації: 1 цикл – денатурація 94°C, 5 хв; 35 циклів – денатурація 94°C, 30 с, відпал (60°C для ACRS-PCR TaqI та 56°C для ACRS-PCR DdeI), 30 с, елонгація – 72°C, 30 с. У випадку з методом AS-PCR температуру відпалу варіювали від 55°C до 68°C з кроком в 1°C.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили за використання MiniAmp™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific) та комерційного набору реагентів DreamTaq PCR Master Mix (ThermoScientific). Об'єм фінальної реакційної суміші склав 10 мкл, концентрація праймерів – 0,2 мкМ.

Розмір рестрикційних фрагментів у випадку з ACRS-PCR DdeI (сайт рестрикції C↓TNAG) складає 121 п. н. для алелю A¹; 86 та 35 п. н. для алелю A².

Розмір рестрикційних фрагментів у випадку з ACRS-PCR TaqI (сайт рестрикції T↓CGA) складає 251 п. н. для алелю A²; 213 та 38 п. н. для алелю A¹.

За використання методу AS-PCR 244 bp розмір ампліфікованого фрагменту складає 244 п. н., для AS-PCR 854 bp – 854 п. н. відповідно.

З метою електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації/рестрикції використовували 3% агарозний гель для методів ACRS-PCR DdeI та AS-PCR; 1,5% гель – для методу ACRS-PCR TaqI. Продукти рестрикції розділяли в агарозних гелях за напруги 150 V упродовж 40–60 хв.

Візуалізацію фрагментів ДНК у гелі проводили за використання бромистого етидію в ультрафіолетовому спектрі (312 нм). Для визначення розміру ампліфікаційних/рестрикційних фрагментів використовували маркер молекулярних мас GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific).

Для визначення температур відпалу праймерів використовували Tm Calculator (ThermoFisher Scientific) на основі Allawi & SantaLucia's thermodynamics method (Allawi and SantaLucia, 1997).

Для аналізу нуклеотидних послідовностей використовували онлайн інструментарій Nucleotide Blast. Для визначення ефективності ампліфікації при використанні біоінформаційного аналізу в якості еталонної використовували нуклеотидну послідовність X14711.1 Bovine beta-casein gene.

Більш детально результати досліджень з оптимізації протоколів ампліфікації дослідного фрагменту гену бета-казеїну за окремими маркерними системами (ACRS-PCR та AS-PCR) з наведеними алгоритмами та фотографіями електрофореграм наведено в наших попередніх публікаціях (Kulibaba et al., 2023a, 2023b).

Результати досліджень. Докладно розглянемо питання стосовно порівняльного аналізу ефективності застосування різних методологічних підходів (AS-PCR та ACRS-PCR) до типування особин великої рогатої худоби за локусом бета-казеїну. В якості основних будемо використовувати методи біоінформатики та безпосередню експериментальну перевірку запропонованих підходів в лабораторних умовах.

Розглянемо детально результати біоінформаційного аналізу запропонованих праймерних систем для детекції алелів A¹ та A² локусу бета-казеїну великої рогатої худоби. У першу чергу, проаналізуємо системи типування на основі ACRS-PCR.

За результатами біоінформаційного аналізу встановлено, що праймерна система ACRS-PCR DdeI за значенням ефективності гібридизації з еталонною послідовністю (X14711.1) є більш точною у порівнянні з системою ACRS-PCR TaqI.

Ефективність гібридизації прямого та зворотного праймерів склала 100% (за виключенням mismatch нуклеотиду). У свою чергу, для методу ACRS-PCR TaqI ефективність гібридизації прямого та зворотного праймерів склала лише 55 та 82% відповідно. У кожному випадку спостерігалась наявність додаткового фрагменту ДНК, частини праймеру, який не був гібридизований з еталонною послідовністю. Наявність цього фрагменту може, потенційно, призводити до зниження ефективності загальної ПЛР та до утворення неспецифічних продуктів ампліфікації. Додатково до всього вищезазначеного, наявність «невідповідних» еталонної послідовності азотистих основ у праймері призводить до варіативності температури відпалу, що, у свою чергу, безпосередньо відображається на ефективності ПЛР.

Перейдемо до розгляду праймерних систем на основі методу AS-PCR.

По-перше, проаналізуємо ефективність фланкування та гібридизації цільового фрагменту гену бета-казеїну за використання праймерної системи AS-PCR 244 bp.

Отримані результати відповідають вихідним даним розробника системи (Ganguly et al, 2013) – повністю співпадає розмір амплікону та положення фланкованого фрагменту в гені.

Незважаючи на загальну ефективність фланкування обраного фрагменту гену бета-казеїну праймери, які використовуються, демонструють наявність відносно великої кількості (~50) випадків неспецифічної гібридизації, що значною мірою знижує загальну ефективність типування на основі цієї системи. Наявність потенційних продуктів неспецифічної гібридизації додатково вказує на необхідність перевірки в лабораторних (експериментальних) умовах наявних теоретичних розрахунків.

По-друге, перейдемо до аналізу праймерної системи AS-PCR 854 bp.

За результатами використання методичних біоінформаційних підходів встановлено, що запропонована праймерна система дає змогу з високим ступенем точності фланкувати сьомий екзон гену бета-казеїну з утворенням фрагменту, розміром 854 пари нуклеотидів.

Слід відзначити, що оптимальна температура відпалу праймерів для кожного з олігонуклеотидів знаходиться у дуже близьких значеннях – 59,86 та 58,85°C відповідно. Близькі значення температур відпалу для прямого та зворотнього праймеру є позитивною характеристикою обраної праймерної системи та розкривають можливості підбору оптимальних параметрів алгоритмів ПЛР.

У свою чергу, результати аналізу гібридизації кожного з праймерів у програмі Nucleotide BLAST дають змогу вірогідно встановити повну відповідність еталонній послідовності (X14711.1), що вказує на їх високу специфічність та можливість подальшого індивідуального типування особин великої рогатої худоби за обраним поліморфізмом.

За результатами аналізу специфічності встановлено, що є, у меншій мірі, п'ять варіантів неспецифічної гібридизації. У всіх випадках праймери фланкують різні частини геному *Bos taurus*, що безпосередньо свідчить про максимальну видоспецифічність обраної системи. Так, наприклад, отримано результати фланкування з боку праймерів, що аналізуються, фрагментів гену, який кодує білкові модулі «цинкові пальці» та фрагменту гену ліпооксигенази тощо. Слід зазначити, що за всіма випадками неспецифічного фланкування фрагментів геному *Bos Taurus* ефективність гібридизації кожного з праймерів була не на рівні 100%, як у випадку з цільовим фрагментом. Кількість неспецифічних взаємодій варіювала залежно від об'єкту та від праймеру (прямий чи зворотній) та становила, в середньому, п'ять нуклеотидів.

Також, до додаткового позитивного моменту можна віднести той факт, що потенційні фланковані ділянки неспецифічних фрагментів геному відрізняються за розміром від цільо-

вого фрагменту (854 п. н. проти 3357, 1283, 1006 та 743 п. н.), що створює передумови для їх ефективного диференціювання на електрофореграмі.

Перейдемо до опису наступного етапу досліджень – до експериментальної перевірки ефективності використання різних праймерних систем у лабораторних умовах. Почнемо з детального аналізу результатів лабораторної перевірки застосування методів ACRS-PCR.

Встановлені, за результатом біоінформаційного аналізу, особливості застосування дослідних праймерних систем знайшли своє відображення й на електрофореграмах. За використання методу ACRS-PCR TaqI в експериментальній групі тварин виявлено особини з усіма можливими генотипами: A^1A^1 , A^1A^2 и A^2A^2 .

Кожний з генотипів представлений на електрофореграмах відповідним набором фрагментів, що повністю відповідає теоретичним розрахункам. У деяких зразках, поряд з цільовими, встановлено наявність додаткових фрагментів ДНК, які не відповідають стандартним патерам рестрикції, що значно знижує ефективність типування за рахунок декількох факторів. По-перше, неспецифічні ампліфіковані фрагменти можуть містити (потенційно) сайт рестрикції для ендонуклеази, яку використовують, що суттєво ускладнить як ефективність реакції, так й інтерпретацію отриманих патернів. По-друге, розмір неспецифічних фрагментів може збігатись з патернами рестрикції для цільового об'єкту, що ми й можемо спостерігати у випадку з використанням методу ACRS-PCR TaqI.

Оптимізація протоколів ПЛР дає можливість звести утворення неспецифічних фрагментів до мінімуму, однак, це недостатньо для отримання максимально «чистої» електрофореграми. Наявність неспецифічних фрагментів призводить до необхідності аналізувати інтенсивність свічення фрагментів у порівняльному з цільовими рестриками аспекті. Цільовий рестрикційний фрагмент (алель A^2 , один фрагмент) характеризується більшою інтенсивністю флуоресценції в ультрафіолетовому спектрі (в якості інтеркалюючого барвника використовується бромід етидію) внаслідок більшої кількості ДНК відносно фрагментів алелю A^1 (два фрагменти). На основі аналізу інтенсивності флуоресценції можна розрізнити різні бенди на електрофореграмі та ідентифікувати відповідні генотипи. Незважаючи на це, за умови зниження загальної ефективності ампліфікації розрізнити цільові та неспецифічні продукти дуже важко, що додатково призводить до труднощів при генотипуванні особин.

У свою чергу, у деяких випадках спостерігається утворення неспецифічних фрагментів, наявність яких призводить до помилкового типування особин в якості гетерозиготних. У такому разі необхідно обов'язково проводити порівняльний аналіз інтенсивності флуоресценції різних фрагментів патерну. На превеликий жаль, необхідність порівняння інтенсивності флуоресценції різних рестрикційних фрагментів за умови використання інтеркалюючих барвників ігнорується низкою авторів, що і призводить до помилок у генотипуванні особин за умови відхилення від оптимальних параметрів рестрикції.

За використання методу ACRS-PCR DdeI також виявлено особин з усіма можливими варіантами генотипів: A^1A^1 , A^1A^2 та A^2A^2 , кожний з яких повністю відповідає теоретичним (очікуваним) патернам рестрикції. За результатами аналізу електрофореграм з'ясовано, що метод ACRS-PCR DdeI є достатньо ефективним інструментом для типування особин ВРХ за дослідним локусом (*CSN2*), однак, незважаючи на всі переваги, він також має низку недоліків, деякі з яких призводять до помилок у генотипуванні.

У першу чергу, у достатньо великій кількості випадків, відмічена наявність неспецифічних фрагментів на електрофореграмі, що, беручи до уваги достатньо невеликий розмір вихідного амплікону (121 п. н.), суттєво перешкоджає ідентифікації алелю A^2 . Це відбувається за результатами наявності неспецифічного фрагменту в зоні фіксації алелю A^2 у патерні рестрикції. Наявність неспецифічного фрагменту, який є достатньо близьким до рестрику (86 п. н.) може бути чинником помилкової інтерпретації цього генотипу в якості гетерозиготного, що, у свою чергу, може призвести до зниження кількості ідентифікованих, гомозиготних за алелем A^2 , особин у дослідній популяції. Також, як і у вищенаведеному випадку, відмічено необхідність проведення порівняльного аналізу інтенсивності флуоресценції рестрикцій-

них фрагментів. Загалом, інтенсивність забарвлення фрагменту алелю A^2 повинна бути меншою, ніж у фрагмента алелю A^1 , внаслідок меншої кількості ДНК, так як амплікон алелю A^2 містить сайт рестрикції для DdeI. Ігнорування цих фактів може призводити до помилок у генотипуванні особин.

Перейдемо до експериментальної перевірки ефективності використання праймерних систем на основі методу AS-PCR (244 та 854 bp відповідно).

Використання стандартних програм ампліфікації для AS-PCR, які описані в літературних джерелах, дало можливість диференціювати алелі A^1 та A^2 локусу бета-казеїну великої рогатої худоби, але з різною ефективністю. Варіювання температурних режимів (параметрів ампліфікації) для відповідних протоколів ПЛР призвело до суттєвих змін результатів генотипування.

За використання праймерної системи AS-PCR 244 bp у випадку з генотипом A^1A^1 на електрофореграмі в наявності фрагмент ДНК розміром 244 п. н. тільки в лунці, яка відповідає алелю A^1 , для генотипа A^2A^2 – тільки в лунці, яка відповідає алелю A^2 . Для гетерозиготного генотипу фрагменти, які ампліфіковані, наявні в обох лунках. Використання різних програм ампліфікації призвело до суттєвих варіацій в ефективності ПЛР. У цьому випадку, критичний момент – підбір оптимальних параметрів протоколів ампліфікації дослідних фрагментів. При цьому, варіювання можна здійснювати як за рахунок температури, так і через додавання до загальної програми проміжних циклів.

Зниження температури відпалу нижче за мінімальну, теоретично розраховану температуру для праймерів, призводить до зменшення специфічності методу, тобто до ампліфікації обох алелів в кожному зразку, що, у свою чергу, призводить до розбіжностей у результатах типування за різними методами. Максимальне зниження значень температури відпалу, призводить, фактично, до збігу інтенсивності забарвлення ампліфікованих фрагментів алелів A^1 та A^2 , що є чинником їх невірної інтерпретації в якості гетерозиготних особин A^1A^2 . Використання оптимальних значень температури відпалу, а також кількості циклів, дало змогу максимально підвищити загальну ефективність ампліфікації за умови збереження високої специфічності реакції при повній відсутності неспецифічних продуктів ПЛР. Фінальний, найбільш ефективний алгоритм ампліфікації цільового фрагменту гену бета-казеїну за використання праймерної системи AS-PCR 244 bp наведений нами у попередній публікації (Kulibaba et al., 2023).

Однак, незважаючи на використання найбільш ефективного протоколу ПЛР, у деяких випадках відмічена наявність фрагментів ДНК, які є характерними для альтернативного алелю, що може призводити до помилкової ідентифікації особини як гетерозиготної. У такому випадку необхідно проводити порівняння інтенсивності флуоресценції обох фрагментів за прикладом, який був описаний вище для методів ACRS-PCR. В ідеальній системі інтенсивність флуоресценції різних фрагментів (A^1 та A^2) у випадку з гетерозиготними зразками буде однаковою, так як обидва варіанти представлені в еквівалентній кількості у вихідній геномній ДНК. Відмінності в інтенсивності флуоресценції можуть виникати внаслідок зниженої ефективності загальної ПЛР в одній з пробірок для проби, або за результатом неспецифічної ампліфікації альтернативного алелю. Високий рівень повторюваності (відтворюваності) для низки зразків свідчить про високу ймовірність саме другого варіанту, що вказує на основний недолік праймерних систем типу AS-PCR – підвищеною чутливістю до значення температур відпалу. Як вже було зазначено вище, праймери системи AS-PCR для різних алелів відрізняються лише одним нуклеотидом на 3' кінці праймеру (кожний нуклеотид відповідає лише конкретному алелю за принципом Вотсон-Криковської взаємодії азотистих основ в ДНК). Тому, оптимальні значення відпалу для кожного специфічного алелю дуже близькі, що, у свою чергу, призводить до відповідних вимог щодо здатності ампліфікатору підтримувати точне значення температурних режимів та вимагає проведення контрольних типувань. Ефективність та точність генотипування, таким чином, залежить від ретельного відпрацювання окремих ключових аспектів методичних підходів на модельних об'єктах, що, на превеликий жаль, дуже часто ігнорується дослідниками.

Незважаючи на вищенаведені труднощі, використання оптимізованих протоколів ПЛР дає можливість успішно генотипувати представників виду *Bos Taurus* за алелями A¹ та A² за використання методів AS-PCR 244 bp та AS-PCR 856 bp.

Результати типування повністю підтверджуються методом ACRS-PCR.

Ідентичність результатів типування для двох різних праймерних систем для AS-PCR свідчить про спільність методичних підходів у розв'язанні завдань зі збільшення специфічності, відтворюваності та ефективності ампліфікації алелів A¹ і A². Модифіковані протоколи ПЛР для AS-PCR детально наведені нами у попередніх дослідженнях (Kulibaba et al., 2023a).

Таким чином, результати досліджень напряду вказують на необхідність використання загального об'єднаного алгоритму для типування особин за алельними варіантами A¹ та A² за локусом бета-казеїну, який включає до себе низку різних методичних підходів як алель-специфічної ПЛР (яку ми пропонуємо в якості основної для проведення рутинного типування особин ВРХ), так і ACRS-PCR в якості інструменту перевірки результатів у випадку з неоднозначними висновками. У цілому, для досягнення високого рівня ефективності типування необхідно використовувати алгоритм спрямованого тестування проблемних проб на основі альтернативного методу (ACRS-PCR), що, фактично, ігнорується низкою лабораторій. Паралельно з усім вищевикладеним, доцільно періодично проводити «сліпе тестування» проб з вибірки на основі альтернативного методу (ACRS-PCR).

Саме використання вищенаведеного алгоритму типування (у випадку використання методів на основі AS-PCR та/або ACRS-PCR) дає змогу проводити масштабні рутинні генотипування особин популяцій різних порід великої рогатої худоби за алельними варіантами A¹ та A² локусу бета-казеїну.

Висновки. У порівняльному аспекті із залученням методів біоінформатики та лабораторної діагностики проаналізовано ефективність типування особин великої рогатої худоби за алельними варіантами A¹ та A² локусу бета-казеїну за використання методів AS-PCR та ACRS-PCR. З'ясовано переваги та недоліки кожної з проаналізованих праймерних систем. За результатами проведених досліджень розроблено ефективний загальний алгоритм типування за використання методів AS-PCR та ACRS-PCR. В якості основного для проведення рутинного типування особин ВРХ пропонується використання методу алель-специфічної ПЛР та ACRS-PCR як інструменту перевірки результатів у випадку з неоднозначними висновками та для сліпого типування зразків тощо.

REFERENCES

- Jiménez-Montenegro, L., Alfonso, L., Mendizabal, J. A., & Urrutia, O. (2022). Worldwide Research Trends on Milk Containing Only A2-Casein: A Bibliometric Study. *Animals*, 12 (15), 1909. doi:10.3390/ani12151909
- Sebastiani, C., Arcangeli, C., Torricelli, M., Ciullo, M., D'avino, N., Cinti, G., Fisichella, S., & Biagetti, M. (2022). Marker-assisted selection of dairy cows for β -casein gene A2 variant. *Italian Journal of Food Science*, 34 (2), 21–27. doi:10.15586/ijfs.v34i2.2178
- Antonopoulos, D., Vougiouklaki, D., Laliotis, G. P., Tsironi, T., Valasi, I., Chatzilazarou, A., Halvatsiotis P., & Houhoula D. (2021). Identification of Polymorphisms of the CSN2 Gene Encoding β -Casein in Greek Local Breeds of Cattle. *Vet. Sci.*, 8, 257. doi:10.3390/vetsci8110257
- Kay, S. I. S., Delgado, S., Mittal, J., Eshraghi, R. S., Mittal, R., & Eshraghi, A. A. (2021). Beneficial Effects of Milk Having A2 β -Casein Protein: Myth or Reality? *The Journal of Nutrition*, 151 (5), 1061–1072. doi:10.1093/jn/nxaa454
- Raynes, J. K., Day, L., Augustin, M. A., & Carver, J. A. (2015). Structural differences between bovine A1 and A2 β -casein alter micelle self-assembly and influence molecular chaperone activity. *Journal of Dairy Science*, 98 (4), 2172–2182. doi:10.3168/jds.2014-8800
- Vigolo, V., Visentin, E., Ballancin, E., Lopez-Villalobos, N., Penasa, M., & De Marchi, M. (2023). β -Casein A1 and A2: Effects of polymorphism on the cheese-making process. *J. Dairy Sci.*, 106, 5276–5287. doi:10.3168/jds.2022-23072

- Oglobline, A. N., Padula, M. P., & Doble, P. A. 2022. Quality Control of A1-Free Dairy. *Food Control*, 135, 108685. doi:10.1016/j.foodcont.2021.108685
- Ladyka, V., Sklyarenko, Yu., Pavlenko, Yu., & Malikova, A. (2023). Study of beta-casein gene polymorphism in dairy cattle populations of Ukraine. *Gestionarea fondului genetic animalier – probleme, soluții, perspective*, 20–23 septembrie 2023, Maximovca. 156–161. doi:10.61562/mgfa2023.20
- Mayer, H. K., Lenz, K., & Halbauer, E.-M. (2021). “A2 milk” authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques. *Food Research International*, 147, 110523. doi:10.1016/j.foodres.2021.110523
- Pauciullo, A., Martorello, S., Carku, K., Versace, C., Coletta, A., & Cosenza, G. (2021). A novel duplex ACRS-PCR for composite CSN1S1–CSN3 genotype discrimination in domestic buffalo. *Italian Journal of Animal Science*, 20 (1), 1264–1269. doi:10.1080/1828051X.2021.1952912
- Dąbrowski, A., Ułaszewski, S., & Niedźwieck, K. (2019). Rapid and easy detection of the five most common founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in the Polish population using CAPS and ACRS-PCR methods. *Acta Biochimica Polonica*, 66 (1), 33–37. doi:10.18388/abp.2018_2654
- Ding, M., Duan, X., Feng, X., Wang, P., & Wang, W. (2017). Application of CRS-PCR-RFLP to identify CYP1A1 gene polymorphism. *J Clin Lab Anal.*, 31 (6), e22149. doi:10.1002/jcla.22149
- Lien, S., Alestrom, P., Klungland, H., & Rogne, S. (1992). Detection of multiple β -casein (CASB) alleles by amplification created restriction sites (ACRS). *Animal Genetics*, 23, 333–338. doi:10.1111/j.1365-2052.1992.tb00155.x
- McLachlan, C. N. (2006). Breeding and milking cows for milk free of β -casein A1, United States Patent 7094949.
- Giglioti, R., Hiromi Okino, C., Azevedo, B. T., Gutmanis, G., Katiki, L. M., Oliveira, M. C., & Filho, A. E. V. (2021). Novel LNA probe-based assay for the A1 and A2 identification of β -casein gene in milk samples. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3, 100055. doi:10.1016/j.fochms.2021.100055
- Ristanic, M., Niksic, A., Niketic, M., Jelusic, S., Rajkovic, M., Glavinic, U., & Stanimirovic, Z. (2022). Use of allele specific PCR to investigate the presence of β -casein polymorphism in Holstein-Friesian cows. *Veterinarski Glasnik*, 76 (1), 17–24. doi:10.2298/VETGL211125004R
- Lee, W., Nam, I., Kim, D., Kim, K., & Lee, Y. (2022). Allele-specific polymerase chain reaction for the discrimination of elite Korean cattle associated with high beef quality and quantity. *Arch. Anim. Breed.*, 65, 47–53. doi:10.5194/aab-65-47-2022
- Chubarov, A. S., Oscorbin, I. P., Filipenko, M. L., Lomzov, A. A., & Pyshnyi, D. V. (2020). Allele-Specific PCR for KRAS Mutation Detection Using Phosphoryl Guanidine Modified Primers. *Diagnostics*, 10 (11), 872. doi:10.3390/diagnostics10110872
- Lim, Y., Park, I., Lee, H., Baek, K., Lee, B., & Cho, G. (2022). Modified Taq DNA Polymerase for Allele-Specific Ultra-Sensitive Detection of Genetic Variants. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 24 (11), 1129–1142. doi:10.1016/j.jmoldx.2022.08.002
- Khan, R., De, S., Dewangan, R., Tamboli, R., & Gupta, R. (2023). Potential status of A1 and A2 variants of bovine beta-casein gene in milk samples of Indian cattle breeds. *Animal Biotechnology*. doi:10.1080/10495398.2023.2200502
- Ladyka, V., Pavlenko, Y., & Sklyarenko, Y. (2021). β -casein gene polymorphism use in terms of brown dairy cattle preservation. *Arch. Zootec.*, 70 (269), 88–94.
- Mokhnachova, N. B. (2021). Genotyping of “Ukrainian” water buffaloes according β -CN (A2-milk), CSN3 and β LG genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Agrarian Series*, 59 (3), 361–365.

- Kulibaba, R., Sakhatskyi, M., & Liashenko, Y. (2023). Comparative analysis of A1 and A2 allele detection efficiency for bovine CSN2 gene by AS-PCR methods. *Acta Biochimica Polonica*, 70 (1), 205–209. doi:10.18388/abp.2020_6530
- Kulibaba, R., Sakhatskyi, M., & Liashenko, Yu. (2023). Analysis of genotyping features of bovine cattle individuals at the CSN2 locus using ACRS-PCR methods. *Animal Science and Food Technology*, 14 (2), 44–56. doi:10.31548/animal.2.2023.44.
- Ganguly, I., Kumar, S., Gaur, G. K., Singh, U., Kumar, A., Kumar, S., Mann, S., & Sharma, A. (2013). Status of β -casein (CSN2) Polymorphism in Frieswal (HF X Sahiwal Crossbred) Cattle. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4 (3), 249–256.
- Keating, A., Smith, T., Ross, R., & Cairns, M. (2008). A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to β -casomorphin. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 47, 99–104.
- Allawi, H. T., & SantaLucia, J. (1997). Thermodynamics and NMR of Internal G·T Mismatches in DNA. *Biochemistry*, 36 (34), 10581–10594. doi:10.1021/bi962590c

Одержано редколегією 08.12.2023 р.

Прийнято до друку 25.12.2023 р.