

На платформе Horizon discovery целевые последовательности не ранжируются по комплексу признаков, но сортируются по отдельным параметрам, в частности по параметрам функциональность и специфичность. Целевые последовательности, предложенные данным сервисом, как наиболее подходящие, представлены во второй половине таблицы. Согласно оценке Chorghor, направляющие последовательности РНК, гомологичные двум предложенным последовательностям, несмотря на высокую оценку специфичности инструментами Horizon discovery, имеют крайне высокий риск нецелевых эффектов при ошибочном спаривании 2-3 нуклеотидов. Существенно различаются также данные по прогнозу работоспособности направляющих РНК. У всех предложенных целевых последовательностей заявлена высокая функциональность, однако эффективность редактирования при этом по оценке Chorghor для одной из последовательностей является довольно низкой и составляет всего лишь 28,63.

В результате работы для дальнейших экспериментов по редактированию гена *MSTN* у овец нами отобрано три целевых последовательности: №1 – последовательность с самой высокой специфичностью и минимальным риском нецелевых эффектов, №3 – последовательность с самой высокой предварительной оценкой эффективности редактирования; №6 – последовательность, имеющая по совокупности оценок двух платформ хорошую эффективность, функциональность и специфичность.

Заключение. Для подбора целевых последовательностей при конструировании системы CRISPR/Cas9 целесообразно использовать несколько ресурсов для комплексной оценки специфичности и предварительного прогноза эффективности гомологичных направляющих РНК.

Литература. 1. Ahad, A. W. Applications of Myostatin (*MSTN*) Gene in the Livestock Animals and Humans: A Review / W. A. Ahad, M. Andrabi, S. A. Beigh, R. A. Bhat, R. A. Shah // *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* – 2017. – №6. – P. 1807-1811. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.609.222>. 2. Aiello, D. The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals / D. Aiello, K. Patel, E. Lasagna // *Anim. Genet.* – 2018. – Т. 49, № 6. – P. 505-519. <https://doi.org/10.1111/age.12696>. 3. Lino, C. A. Delivering crispr: A review of the challenges and approaches / C. A. Lino, J. C. Harper, J. P. Carney, J. A. Timlin // *Drug Deliv.* – 2018. – Т. 25, №1. – P. 1234-1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>. 4. Немудрый, А. А. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR / Cas – инструменты открытий / А. А. Немудрый, К. Р. Валетинова, С. П. Медведев, С. М. Закиян // *Acta Naturae.* – 2014. – №3. – P. 20-42.

УДК 636.2.034:575.113.2

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА У КОРОВ РАЗНЫХ ПОРОД В УКРАИНЕ

Митиогло И.Д.

Институт разведения и генетики животных имени М.В. Зубца Национальной академии аграрных наук Украины, г. Киев, Украина

Целью исследования было определение полиморфизма гена каппа-казеина и его ассоциации с признаками молочной продуктивности у коров разных пород. Полиморфизм гена каппа-казеина исследовали у коров украинской красно-рябой молочной, украинской черно-рябой молочной, й монбельярдської пород и кроссбредних коров. Генотипы AA и AB обнаружено во всех исследованных группах коров, генотип BB – у коров монбельярдської породы с частотой 0,366. Самый высокий надой за 305 дней первой лактации обнаружено в кроссбредних коров с генотипом AB (7029 кг), самый низкий – в кроссбредних животных с генотипом AA (6359 кг). Результаты исследований генотипов и аллелей гена каппа-казеина является дополнительной генетической характеристикой животных, дает возможность создания стад с желательными признаками молочной продуктивности. **Ключевые слова:** каппа-казеин, полиморфизм, крупный рогатый скот, ПЦР ПДРФ.

KAPPA-CASEIN GENE POLYMORPHISM IN COWS OF DIFFERENT BREEDS IN UKRAINE

Mitioglo I.D.

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of National Academy
of Agrarian Science of Ukraine, Kiev, Ukraine

*The aim of the study was to determine the polymorphism of the kappa-casein gene and its association with signs of milk productivity in cows of different breeds. Polymorphism of the kappa-casein gene was studied in cows of Ukrainian red-spotted dairy, Ukrainian black-spotted dairy, Montbeliard breeds and crossbred cows. Genotypes AA and AB were found in all studied groups of cows, genotype BB – in cows of Montbeliard breed with a frequency of 0.366. The highest hopes for 305 days of the first lactation were found in crossbred cows with genotype AB (7029 kg), the lowest – in crossbred animals with genotype AA (6359 kg). The results of studies of genotypes and alleles of the kappa-casein gene are an additional genetic characteristic of animals, which makes it possible to create herds with the desired characteristics of milk productivity. **Keywords:** kappa-casein, polymorphism, cattle, PCR-RFLP.*

Введение. В последние годы генетический полиморфизм белков молока вызывает значительный исследовательский интерес в связи с возможными ассоциациями между генотипами молочных белков и экономически важными признаками молочного скота. Ученые сообщают, что определенные варианты молочного белка могут быть связаны с уровнем удоя [1], составом молока [3] и производством сыра [2]. Поэтому гены белков молока являются генетическими маркерами и могут использоваться как дополнительные критерии отбора в молочном скотоводстве. Например, гены, кодирующие казеины – группу белков, которые присутствуют в молоке всех видов млекопитающих, доля которых в общем количестве белковых веществ молока составляет около 80%. Контролирует качество молока и молочных продуктов ген каппа-казеина, представляющий собой важный селекционный критерий для оценки молочных пород крупного рогатого скота.

Целью нашего исследования было определение возможного полиморфизма гена каппа-казеина и его ассоциации с характеристиками молочной продуктивности у коров разных пород, разводимых в ГП «ОХ «Нива» Института разведения и генетики животных имени М.В. Зубца НААН».

Материалы и методы исследования. Полиморфизм гена каппа-казеина исследовали у коров украинской красно-пестрой молочной (УЧерМ), украинской черно-пестрой молочной (УЧРМ), монбельярдской (М) пород и кроссбредных коров, полученных от скрещивания местных коров украинской красно-пестрой молочной породы с монбельярдскими быками. ДНК-исследования проведены в отделе генетики и биотехнологии животных Института разведения и генетики животных имени М.В. Зубца НААН. Для проведения исследований использовали образцы крови. Полиморфные варианты гена каппа-казеина исследовали методом ПЦР-ПДРФ. Выделение ДНК проводили с использованием стандартного набора «ДНК сорб» («Ампл-Сенс», РФ). Для осуществления ПЦР использовали реакционную смесь (10 мкл): 5,6 мкл деионизированной воды, 1,5 мкл буфера ПЦР, 0,5 мкл dNTP, 0,8 мкл двух праймеров, 0,1 мкл Tag-полимеразы, 1,5 мкл ДНК.

Аmplification фрагмента гена каппа-казеина проводили с использованием специфических праймеров: 5'-GAAATCCCTACCATCAATACC-3' и 5'-CCATCTACCTAGTTTAGATG-3'. Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 2% агарозном геле после окрашивания геля бромистым этидием. Визуализацию осуществляли на трансиллюминаторе в УФ-свете с последующим фотографированием электрофореграмм цифровой камерой. Дифференциацию ампликонов по размерам проводили с помощью маркера молекулярных масс Ladder Low Range.

Данные о продуктивности коров-первотелок анализировали по результатам контрольных доений.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при использовании методов математической статистики и с помощью стандартных компьютерных программ.

Результаты исследований. Продуктом ПЦР гена каппа-казеина с использованием специфических праймеров (CSN3-F и CSN3-R) был фрагмент ДНК 273 п.н. Его расщепление с помощью рестрикционной эндонуклеазы *HinfI* привело к образованию четырех фрагментов: 224, 133, 91 и 49 п.н. Три фрагмента размером 133, 91, 49 п.н. представляют собой гомозиготный генотип AA, фрагменты размером 224 и 49 п.н. – генотип BB, 224, 133, 91, 49 - гетерозиготы АВ по гену каппа-казеина. В результате исследований выявлено три генотипа: AA, АВ, BB. Во всех исследованных группах коров-первотелок выявлено генотип AA с частотой от 0,166 у коров монбельярдской породы и 0,588 – у УЧРМ. Генотип BB выявлено только у коров монбельярдской породы, в первотелок УЧРМ, УЧеРМ и в кроссбредных особей он отсутствует (таблица).

Таблица – Частоты генотипов и аллелей по локусу каппа-казеина в исследованных группах коров-первотелок

Порода	Генотип	Число животных	Частота генотипа	Аллель	Частота аллеля	χ^2	Гетерозиготность	
							фактическая (Hobs)	ожидаемая (Hex)
УЧеРМ	AA	16	0,533	A	0,766	4,87	0,466	0,359
	AB	14	0,466	B	0,233			
УЧРМ	AA	10	0,588	A	0,794	2,48	0,411	0,328
	AB	7	0,411	B	0,205			
М	AA	5	0,166	A	0,400	0,02	0,467	0,480
	AB	14	0,466	B	0,600			
	BB	11	0,366					
УЧеРМ×М	AA	8	0,381	A	0,690	4,7	0,619	0,428
	AB	13	0,619	B	0,309			

Гетерозиготный генотип АВ обнаружен во всех исследованных группах коров с разной частотой. Так, у коров монбельярдской породы он встречался почти в три раза чаще, чем генотип AA. В группах коров УЧеРМ и УЧРМ частота гетерозиготного генотипа АВ уступала гомозиготному AA на 12% и 30% соответственно.

Установлено, что частота аллеля А самая высокая 0,766 у первотелок УЧРМ, тогда как самая низкая (0,400) – у коров монбельярдской породы. Аллель В, что важно для перерабатывающих свойств молока, у коров УЧеРМ и УЧРМ присутствует только в гетерозиготах АВ с небольшой разницей. У кроссбредных животных частота гетерозиготных генотипов АВ на четверть выше по сравнению с УЧеРМ, однако, у них тоже отсутствует желаемый BB-вариант. У коров монбельярдской породы гомозиготный генотип BB обнаружен с частотой 0,366 наряду с гетерозиготным генотипом АВ с частотой 0,466, что свидетельствует о преимуществе желаемого аллеля В в данной исследованной группе животных.

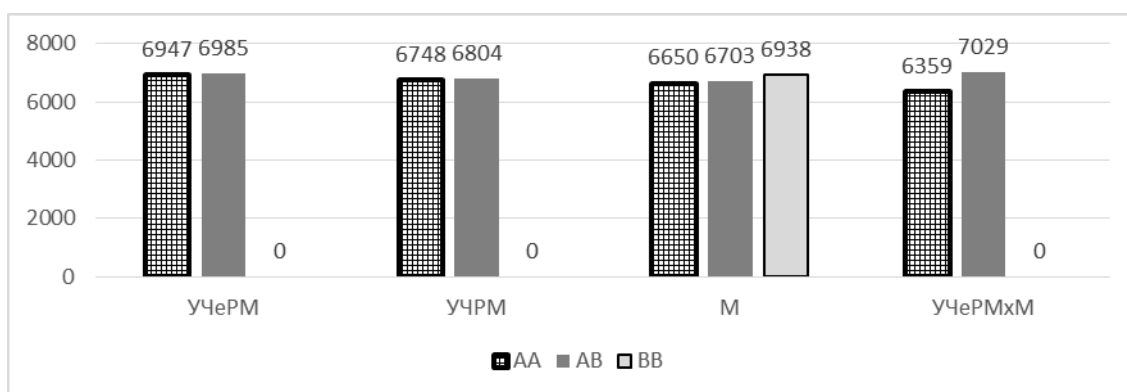


Рисунок 1 – Удой коров-первотелок УЧеРМ, УЧРМ, М и УЧеРМ×М с разными вариантами генотипов по гену каппа-казеина

Анализ молочной продуктивности (рисунок) показал, что самый высокий надой за 305 дней первой лактации был в кроссбредных коров с генотипом АВ и на 670 кг преобладал с достоверной разницей ($p < 0,001$) аналогичный показатель коров этой же группы с генотипом АА. Уровень надоя у коров с генотипами АА и АВ у первотелок УЧеРМ и УЧРМ мало отличался.

В группе коров монбельярдской породы высокий уровень удоя, ассоциированный с каппа-казеиновым генотипом ВВ (6938 кг), превышал удой коров с генотипом АА на 288 кг со статистически значимой разницей ($p < 0,01$). От коров пород УЧеРМ, УЧРМ, М с гетерозиготным генотипом АВ получено на 47-56 кг удой выше, чем от животных с генотипом АА. В группе коров УЧеРМ×М разница между генотипами АВ и АА оказалась существенно значимой ($p < 0,05$) – 670 кг.

Таким образом, можно отметить, что генотипы АВ могут иметь большее влияние на определенные лактогенные признаки коров молочного направления продуктивности.

Заключение. Полученные результаты исследований полиморфизма гена каппа-казеина в украинских породах молочного направления продуктивности свидетельствуют о том, что в популяциях коров украинской селекции преобладает генотип АА. Объяснить это можно тем, что создание этих пород происходило путем воспроизводительного скрещивания с голштинской породой, в популяциях которых процент аллеля гена каппа-казеина ВВ достаточно низкий. У коров монбельярдской породы концентрация В-аллельного варианта выше, чем концентрация А-варианта. В генотипах кроссбредных коров отсутствует гомозиготный вариант ВВ, хотя гетерозиготный генотип АВ почти вдвое превышает гомозиготный АА, что все-таки свидетельствует о более высокой концентрации аллеля В по сравнению с животными пород УЧеРМ и УЧРМ. Результаты наших исследований, как и исследований других авторов, свидетельствуют, что информация о распределении вариантов генотипов и аллелей гена каппа-казеина является дополнительной характеристикой стада, что позволяет селекционерам создать стада с желательными признаками молочной продуктивности.

Литература. 1. Bech, A. M. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield / A. M. Bech, K. R. Kristiansen // – J Dairy Sci, 1990. – №. 57. – P. 53-63. 2. Ng-Kwai-Hang, K .F. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationship with production traits, milk composition and technological properties / K .F. Ng-Kwai-Hang // – Can J Anim Sci, 1998. – Vol. 78 (Suppl). – P.131-147. 3. Robitaille G. Quantitative analysis of β -lactoglobulin A and B genetic variants in milk of cows β -lactoglobulin AB throughout lactation / G. Robitaille, M. Britten, J. Morisset, D., Petitclerc // J Dairy Sci, 2002. – Vol. 69. – P. 651-65.

УДК636.1.082

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА БЕТА-КАЗЕИНА НА МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ КОРОВ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

Парамонова М.А., Валитов Ф.Р., Кононенко Т.В.

ФГБОУ ВО Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Россия

В работе проведено исследование показателей молочной продуктивности коров черно-пестрой породы (n=82) Республики Башкортостан, Россия. Были определены генотипы гена бета-казеина (CSN2) с помощью метода ПЦР-ПДРФ. В изучаемой выборке коров частота встречаемости аллелей составляет $A1 = 0,85$ и $A2 = 0,15$. Было отмечено, что частотное распределение генотипов не соответствует равновесию Харди-Вайнберга. Большое значение статистики Хи-квадрат свидетельствует в пользу существенных различий между частотой встречаемости генотипов гена бета-казеина и свидетельствует о значительном снижении гетерозиготности. Установлено влияние полиморфизма CSN2 на молочную продуктивность. Статистический анализ ассоциации между генотипами CSN2 и количеством