

ПОЛИМОРФИЗМ α S1-КАЗЕИНА У ОВЕЦ РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Коновалова Т.В., Климанова Е.А.

ФГБОУ «Новосибирский ГАУ», г. Новосибирск, Россия

*Казеин α S1 представляет собой основной молочный белок и играет важную роль в транспортировке фосфата кальция в молоке. Целью данного исследования было определение генетического полиморфизма α S1-казеина (CSN1S1) у овец Романовской породы овец Западной Сибири. **Ключевые слова:** α S1-казеин, овцы, Романовская порода, генетический полиморфизм, ПЦР-ПДРФ.*

POLYMORPHISM OF α S1-CASEIN IN SHEEP OF ROMANOV BREED FROM WESTERN SIBERIA

Konovalova T.V., Klimanova E.A.

FSBEI "Novosibirsk State Agrarian University", Novosibirsk, Russia

*α S1 casein is a major milk protein and plays an important role in the transport of calcium phosphate in milk. The purpose of this study was to determine the genetic polymorphism of α S1-casein (CSN1S1) in Romanovskaya sheep breed of Western Siberia. **Keywords:** α S1-casein, sheep, Romanov breed, genetic polymorphism, PCR-RFLP.*

Введение. Казеин α -S1, состоит из 215 аминокислот и является одним из основных в фракция молочного белка [4]. Он играет важную роль в транспортировке фосфата кальция. Из литературных данных известны четыре аллеля (A, B, C и D) присутствующие в α -S1 казеинового гена [11]. У домашних жвачных α S1 казеин полиморфен, и варианты зависят от удоя и качества молока [2, 10]. На данный момент в молоке жвачных животных выделяют виды казеина: α s1-Cn (CSN1S1), α s2-Cn (CSN1S2), β -Cn (CSN2) и κ Cn (CSN3), кодируемые тесно сцепленными и аутосомными локусами. Казеин α -S1 у овец находится на 6 хромосоме [4,7]. Хотя впервые полиморфизм в четырех локусах казеина, их наследование и взаимоотношения сцепления были представлены в публикации описаны Di Gregorio et al. (1991), исследование их как инструмента для улучшения селективной работы остается актуальным [6, 7, 10]. Романовская порода овец одна из перспективных для животноводства России и ближнего зарубежья, сохранение и улучшение еепородных характеристик является важнейшей задачей [3, 5].

В настоящее время, развитие технологии ПЦР-ПДРФ привело к более широкому применению молекулярно-генетического анализа в селекционно-племенной работе [1, 5, 8, 11]. Такие исследования позволяют определить предпочтительные генотипы и обнаружить рецессивные мутации, связанные с различными наследственными заболеваниями. Изучение таких генетических аспектов становится все более актуальным и востребованным.

Материалы и методы исследований. Выделение ДНК осуществляли с использованием набора для очистки ДНК от Биолабмикс из цельной крови. Образцы крови были взяты у 55 овец Романовской породы вакуумным методом. Лocus CSN1S1 охарактеризовали методом ПЦР-ПДРФ с использованием эндонуклеазы рестрикции Mbo II. Были обнаружены аллели A и B, а в казеиновом локусе идентифицированы генотипы B/B, A/B и A/A.

Аmplification полиморфного фрагмента гена α S1-казеина проводили методом ПЦР [9, 11] с использованием праймеров (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика олигонуклеотидной последовательности изучаемого гена α S1-CN для проведения ПЦР-ПДФ

Нуклеотидные последовательности	T °C, отжига	Ампли-фикат, п.н. (bp)	Эндонуклеаза	Генотипы
F:5'- GGTGTCAAATTTAGCTGTAA -3'	53	372	Mbo II	AA /AB / BB
R:5'- GCCCTCTTCTCTAAAAAGGTTT -3'				

Для амплификации фрагментов гена альфа- S1-казеина (CSN1S1) были следующие условия ПЦР: первоначальная денатурация при 95°C – 3 минут (1 цикл); затем проводили 35 циклов амплификации: денатурация 95°C – 30 с, отжиг– 53°C– 35 с, элонгация 72°C – 1 мин; завершающая элонгация при 72°C – 10 минут (1 цикл).

Для разрезания исследуемого фрагмента ДНК и определения полиморфизма применяли рестриктазу Mbo II. Объем пробы ПЦР для ферментативной обработки составлял 20 μ л.

Для генотипирования гена CSN1S1, расщепление амплифицированного продукта проводили с использованием 20 U рестрикционного фермента Mbo II в буфере. Прямой подсчет использовался для оценки фенотипа и частот аллелей генетических вариантов альфа- S1-казеина.

Результаты исследований. Из имеющихся образцов крови было выделено ДНК от 55 овец Романской породы на территории Западной Сибири (Кемеровская область). После выделения ДНК проводилась проверка на электрофорезе на 1% агарозном геле (рисунок 1). Для проверки брали 2 μ л ДНК и смешивали в равной пропорции с буфером для нанесения.



Рисунок 1 – Проверка выделенной ДНК из цельной крови у овец Романовской породы на электрофорезе с использованием 1% AGE.

Продукты ПЦР проверяли на электрофорезе в агарозном геле 1,5%. Был амплифицирован фрагмент гена овечьего α 1-казеина длиной 372 п.н., включая третий экзон (рисунок 2).

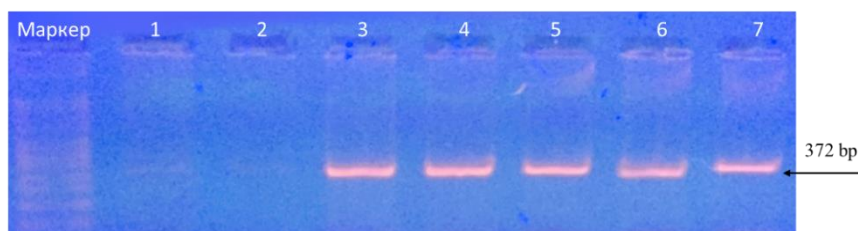


Рисунок 2 – Амплифицированный фрагмент гена α S1 казеина (372 б.п.) в 1,5%агарозный гель, 1-бланк, № 3–7 образцы с положительным результатом

После ПЦР-амплификации, ферментативного расщепления продуктов ПЦР рестриктазой Mbo II и электрофореза в 3% агарозном геле были получены фрагменты длиной 306, 160, 146, 66 б.п. (рисунок 3). По результатам можно наблюдать следующие закономерности: гомозиготные особи по аллели В, дали две полосы 306 и 66 п.н., особи А/А дали три фрагмента длиной 160, 146 и 66 п.н. У гетерозиготных особе, А/В на электрофорезе амплифицируются все четыре фрагмента.

Фрагмент длиной 66 пар оснований является результатом сайта MboII, присутствующего во всех шаблонах, и может использоваться в качестве контрольной процедуры (Kevorkian, 2008). Закономерности достоверны только для В-гомозиготных животных ($p < 0,001$).

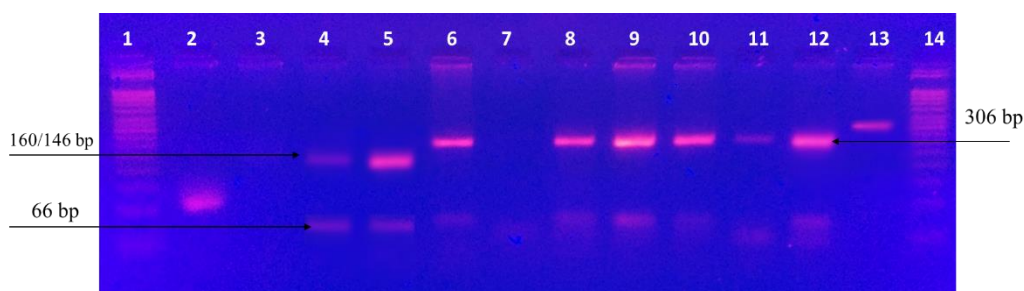


Рисунок 3 – Результаты генотипирования овец Романовской породы Западной Сибири по гену CSN1S1: 1 и 14 – ДНК маркер, 3 – бланк (пустая проба), 4 и 5 – AA, 6 – BB, 8-12 – BB, 13 – образец ПЦР

Таблица 2 – Частота встречаемости аллелей и генотипов гена CSN1S1 у овец Романовской породы

Ген	n	Частота встречаемости				
		генотипов, %			аллель	
		AA	BB	AB	A	B
CSN1S1	55	3,6	94,5	1,8	0,045	0,95

Гомозиготный генотип BB по гену α S1-CAS присутствовал в оцененных образцах в большей мере и показал частоту – 0,95. Аналогичные результаты по преобладанию генотипа В/В или popA/ popA, определяемого по фрагментам 306 п.н. и 66 п.н., с частотой встречаемости аллеля popA – 0,98 показана и у других пород овец [11].

Заключение. В настоящем исследовании показан полиморфизм гена CSN1S1 у овец Романовской породы в Западной Сибири. В полиморфизме гена CSN1S1 у нашей выборки В аллель оказалась преобладающей. Варианты генов, кодирующих молочный белок, можно рассматривать как инструмент для селекционной работы по улучшению продуктивных качеств в овцеводстве. Эти данные могут быть использованы для будущих исследований, а так же в проведении отбора с помощью маркеров.

Литература. 1. Ворожко, И. В. Современные тренды изучения полиморфизма генов, кодирующих белки козьего молока / И. В. Ворожко, И. Н. Скидан, О.О. Черняк // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85, № 5. – С. 13-21. 2. Климанова, Е. А. Ассоциация генотипов β -лактоглобулина у овец Романовской породы с гематологическими показателями крови / Е. А. Климанова, Т. В. Коновалова, В. А. Андреева и др. // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2020. – Т. 57, № 4. – С. 82-87. 3. Климанова, Е.А. Полиморфизм локуса VMP-15 у овец романовской породы в условиях Западной Сибири / Е.А. Климанова, Т.В. Коновалова // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2023. – Т. 67, № 2. – С. 197-204. 4. Климанова, Е.А. Связь α S1-казеина с молочной продуктивностью овец / Е.А. Климанова // Теория и практика современной аграрной науки. Сборник IV национальной (всероссийской) научной конференции с международным участием. – Новосибирск: Новосибирский государственный аграрный университет, 2021. – С. 673-675. 5. Кручинин, А.Г. Сравнение полиморфизма генов молочных белков козьего и овечьего молока: мировой опыт / А.Г. Кручинин, А.В. Бигаева, С.Н. Туровская // Пищевая промышленность. – 2020. – № 8. – С. 36-40. 6. Di Gregorio, P. DNA polymorphism at the casein loci in sheep / P. Di Gregorio, E. Pieragostini, P. Masina // Animal Genetics. – 1991. – Т. 1, № 22. – С. 21-30. 7. Kevorkian, S. Genotyping of α S1-casein gene in Karakul sheep breed / S. Kevorkian, M. Manea, S. Georgescu and et al. // Lucrări Ştiinţifice. – 2008. – vol. 51. – С. 79-81. 8. Konvalova, T.V. Correlations of some biochemical and hematological, parameters with polymorphisms in α s1-casein and β -lactoglobulin genes in Romanov sheep breed / T.V. Konvalova, O.I. Sebezko, O.S Korotkevich and et al.// Proceedings of the international symposium on animal science ISAS 2018. – Belgrade-Zemun, Serbia : University of Belgrade, 2018. – С. 47. 9. Pilla, F. Genotyping of α -s1 casein in sheep / F. Pilla, C. Bevilacqua, C. Leroux and et al. // Animal Genetics. – 1998. – Т. 6, № 29. – С. 472-473. 10. Popovski, Z.T. Molecular methods in animal breeding / Z.T. Popovski. – Новосибирск: Новосибирский государственный аграрный университет, 2019. – 160 с. 11. Rustempasic, A. Polymorphism of CSN1S1 gene in Pramenka breed sheep in Bosnia and Herzegovina / A. Rustempasic, A. Dokso, Z. Popovski and et al.// 24th International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry. – Sarajevo: B&H, 2013. – С. 91-94.