

УДК 636.2+636.082.2

UDC636.2+636.082.2

06.02.10 – Частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства (сельскохозяйственные науки)

06.02.10 Private zootechnics, technology of production of animal products (agricultural Sciences)

РАЗРАБОТКА ТЕСТ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ЛОКУСА БЕТА КАЗЕИНА (CSN2) В МОЛОКЕ КОРОВ

DEVELOPMENT OF A TEST SYSTEM FOR DETECTING POLYMORPHISM OF THE BETA CASEIN LOCUS (CSN2) IN COW MILK

Ковалюк Наталья Викторовна
д-р биол. наук, заведующая лабораторией биотехнологии
РИНЦ SPIN – код:8684-4923
AuthorID: 0000-0002-9890-2269
E-mail: nvk1972@yandex.ru

Kovalyuk Natalia Viktorovna
Dr.Sci.Biol., head of the laboratory of biotechnology
RSCI SPIN – code:8684-4923
AuthorID: 0000-0002-9890-2269
E-mail: nvk1972@yandex.ru

Якушева Людмила Ивановна
канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии
РИНЦ SPIN код:8132-7948
E-mail: lydmila.yakusheva@mail.ru

Yakusheva Lyudmila Ivanovna
Cand.Biol.Sci., senior researcher of the laboratory of biotechnology
RSCI SPIN-code: 8132-7948
E-mail: lydmila.yakusheva@mail.ru

Ширяева Елена Витальевна
канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии
РИНЦ SPIN – код:8808-4468
E-mail: mellen14@yandex.ru

Shiryayeva Elena Vitalievna
Cand.Biol.Sci., leading researcher of the laboratory of biotechnology
RSCI SPIN-code 8808-4468
E-mail: mellen14@yandex.ru

Шахназарова Юлия Юрьевна
научный сотрудник лаборатории биотехнологии
E-mail: July-yu@rambler.ru
ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», г. Краснодар, п. Знаменский, ул. Первомайская 4

Shakhnazarova Yuliya Yurievna
research associate laboratory of biotechnology
E-mail: July-yu@rambler.ru
FGBNU Krasnodar scientific center for animal science and veterinary medicine, Krasnodar, p. Znamensky, Pervomayskaya, 4

На основе АС-ПЦР разработана функциональная тест – система для выявления полиморфизма локуса бета казеина (CSN2). Планируется использовать тест-систему для поиска носителей аллеля А1, случайно попавших в группу животных, производящих молоко типа А2

A functional test system for detecting beta casein locus polymorphism (CSN2) has been developed based on as-PCR. It is planned to use a test system to search for carriers of the A1 allele that accidentally fell into the group of animals producing A2 type milk

Ключевые слова: ГЕН CSN2, ТЕСТ- СИСТЕМА, АЛЛЕЛЬ, А1

Keyword: CSN2 GENE, TEST SYSTEM, ALLELE, A1

DOI: <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-162-014>

Введение

Проблема производства безопасной для потребителя молочной продукции достаточно актуальна в последнее время. Рядом авторов проведены исследования, посвященные изучению влияния полиморфизма локуса бета-казеина (CSN2) на безопасность молока и молочных продуктов.

Установлено, что существует связь между потреблением молочного β -казеина типа А1 и различными заболеваниями [1-7].

Рядом хозяйств в России и в Краснодарском крае (например, в АО «Рассвет»), начат отбор животных и формирование групп коров, производящих молоко типа А2. Естественно, что при этом существует риск субъективных ошибок и на заключительном этапе формирования таких групп требуется проведение скрининговых анализов, подтверждающих отсутствие животных – носителей аллелей А1. Удобнее всего это сделать путем анализа молока, произведенного группой животных.

Цель наших исследований

Обосновать и разработать методику анализа проб молока, позволяющую оценить присутствие ДНК животных – носителей аллелей А1.

Материал и методы исследований

Исследования проведены на базе лабораторий биотехнологии ФГБНУ КНЦЗВ и молекулярно-генетической экспертизы ООО НПО «Юг-Плем». Объектом исследования были пробы молока АО «Рассвет». Нами был использован подход на основе аллель-специфической полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР).

В качестве основного документа регламентирующего деятельность лаборатории использовали МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности"

Пробы молока для анализа отбирали согласно ГОСТ 26809.1-2014 из 2 общих танков-охладителей (пробы 1А и 1В – по 1 литру из танка с молоком от коров с генотипом А2А2 - в эту группу животные были выделены предварительным генотипированием образцов крови коров -

(танк №1) и 2А и 2В (по одному литру) - из танка от коров стада, где генотипирование не проводилось (танк №2); всего 4 пробы).

Из каждого танка, таким образом, отбирается по 2 пробы молока. Допустимо хранение проб при 4°C не более суток.

В лаборатории доставленные пробы (4 пробы по 1 литру) тщательно перемешивались и из каждой отбиралось по 1000 мкл молока, пробирки при этом маркировались: 1А, 1В, 2А, 2В. Затем пробирки центрифугировали при 4000 об/мин – 5 минут. Теоретически каждая пробирка при этом содержала около 300000 соматических клеток.

Затем супернатант удаляли, оставив около 30 мкл жидкости над осадком, также необходимо удалить ватной палочкой жировой слой на стенках пробирки, так как липидная фракция может препятствовать выделению ДНК и последующей постановке ПЦР. Затем добавляли 400 мкл лизирующего раствора и 20 мкл сорбента и продолжить выделение по методике, прилагаемой к наборам D1024 Diatom DNA Prep 100.

Пробирки с выделенной ДНК маркировали: 1А, 1В, 2А, 2В

Выделенная ДНК использовалась для постановки ПЦР.

При постановке ПЦР подписывается 5 пробирок из набора U1010-0.8 Gene Pak PCR Core: 1А^{ПЦР}, 1В^{ПЦР}, 2А^{ПЦР}, 2В^{ПЦР}, «-» К (отрицательный контроль).

Согласно инструкции к набору U1010-0.8 Gene Pak PCR Core в пробирку с лиофилизированными компонентами (голубого цвета) вносится:

10 мкл раствора PCRdiluent;

0,5 мкл раствора разведенного праймера ВК 1.1;

0,5 мкл раствора разведенного праймера ВК 2;

6 мкл деионизированной воды;

3 мкл ДНК из 1А- 1А^{ПЦР}, 1В- 1В^{ПЦР}, 2А -2А^{ПЦР}, 2В-2В^{ПЦР} (3 мкл деионизированной воды вместо ДНК вносится в пробирку с отрицательным контролем). Общий объем реакционной смеси – 20 мкл.

Подготовленные пробирки устанавливали в амплификатор. Использовали следующую программу амплификации: 94°С 4 минуты (1 цикл); 94°С 20 секунд, 69°С 20 секунд, 72°С 20 секунд (30 циклов): 72°С – 3 минуты (1 цикл). Результаты реакции учитываются в 2,5% агарозном геле, окрашенном этидием бромидом. Для приготовления геля 2,5 г агарозы смешивается со 100 мл 1X TBE буфера и 10 мкл этидия бромида, смесь доводится до кипения, остужается и заливается в плашку с установленной гребенкой. После застывания геля гребенка вынимается и под буфер в карманы геля вносятся образцы после ПЦР. Электрофорез проводится в 1X TBE буфере при напряжённости электрического поля в 5 В/см.

Нами сконструированы праймеры следующей последовательности:

ВК 1.1 5'GGA TGT TTT GTG GGA GGC TGT TAT3'

ВК 2 5'ATA AAA TCC ACC CCT TTG CCC AGA 3'

OMIA 002033-9913 : A2 milk in Bostaurus

Хромосома 6, ген CSN2 (casein beta), Reference sequence UMD3.1, g.87181619A>C

Характеристики праймеров представлены на рис.2

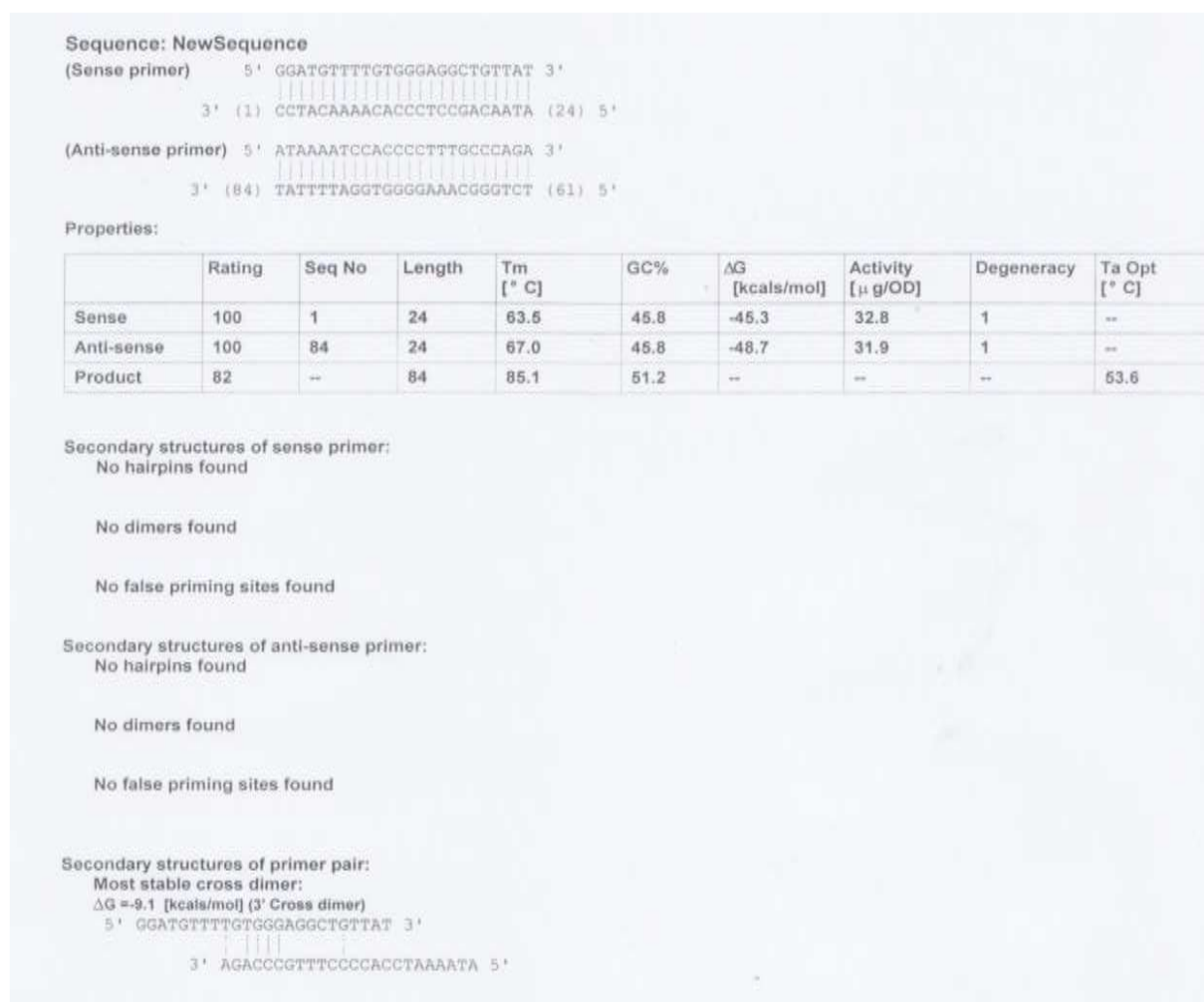


Рисунок.2 Характеристики праймеров ВК 1.1 (Senseprimer) и ВК 2 (Anti - senseprimer).

Результаты исследований

Возможные варианты чтения результатов:

а) В пробирках 1А^{ПЦР}, 1В^{ПЦР} – полосы размером 84 пары нуклеотидов не визуализируются; в пробирках 2А^{ПЦР}, 2В^{ПЦР} – визуализируются полосы размером 84 пары нуклеотидов, в пробирке «-» К - полоса размером 84 пары нуклеотидов отсутствует. В данном случае анализ подтверждает отсутствие ДНК от коров с генотипом А1А2 и генотипом А1А1 в пробах молока из танка №1, но подтверждает наличие ДНК от коров с генотипом А1А2 и генотипом А1А1 в пробах молока из танка №2, контаминация отсутствует;

б) В пробирках 1A^{ПЦР}, 1B^{ПЦР} и 2A^{ПЦР}, 2B^{ПЦР} – визуализируются полосы размером 84 пары нуклеотидов, в пробирке «-» К полоса размером 84 пары нуклеотидов отсутствует. В данном случае анализ подтверждает наличие ДНК от коров с генотипом А1А2 и генотипом А1А1 в пробах молока из танка №1 и из танка №2, контаминация отсутствует;

в) при любом сочетании в пробе с отрицательным контролем визуализируется полоса размером 84 пары нуклеотидов. Данный результат свидетельствует о контаминации. Необходимо принять соответствующие меры.

На рисунке 1 представлена электрофореграмма варианта анализа а).

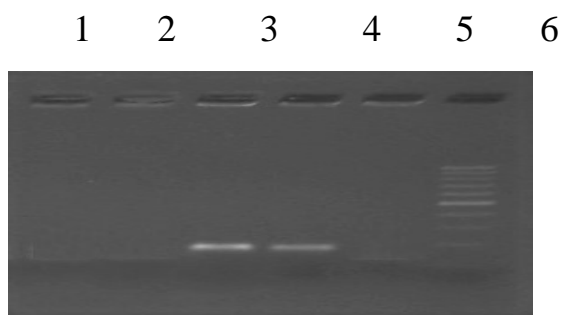


Рисунок 1. 1A^{ПЦР}, 1B^{ПЦР} – полосы размером 84 пары нуклеотидов не визуализируются (дорожки 1,2); в пробирках 2A^{ПЦР}, 2B^{ПЦР} – визуализируются полосы размером 84 пары нуклеотидов (дорожки 3,4), в пробирке «-» К полоса размером 84 пары нуклеотидов отсутствует (дорожка 5), маркер молекулярных весов (дорожка 6).

Выводы

Разработанная тест-система показала свою эффективность. Примерная чувствительность, определенная в серии последовательных разведений, позволяет выявить следы ДНК А1 в разведении 1:50, то есть посредством данной тест-системы возможно выявлять одно животное с иным генотипом в группе из 50 животных с генотипом А2.

Библиографический список

1. Chia, J. S. J. A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes /J. S. J. Chia, J. L. McRae, S. Kukuljan, K. Woodford, R. B. Elliott, B. Swinburn, K. M. Dwyer //Nutr. Diabetes.- 2017 -Pubmed reference: 28504710 DOI: 10.1038/nutd.2017.16.

2. Duarte-Vázquez, M.Á., Production of Cow's Milk Free from Beta-Casein A1 and Its Application in the Manufacturing of Specialized Foods for Early Infant Nutrition/

M.Á.Duarte-Vázquez, C. García-Ugalde, L.M.Villegas-Gutiérrez, B.E. García-Almendárez, J.L. Rosado // *Foods* 6.- 2017 - Pubmed reference:28704923 DOI:10.3390/foods6070050.

3.He, M., Effects of cow's milk beta-casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: a multicentre, randomised controlled study/ M. He, J. Sun, Z.Q. Jiang, Y.X Yang // *Nutr J* 16:72. - 2017 -DOI:10.1186/s12937-017-0275-0.

4.Kamiński, S. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health/ S. Kamiński, A. Cieslińska, E. Kostyra // *J Appl Genet* 48:189-98, 2007- DOI:10.1007/BF03195213.

5.Parashar, A. A1 milk and its controversy-a review/ A.Parashar, R. K. Saini . // *International Journal of Bioassays*. - 2015. - № 4.- P: 4611-4619.

6. Parashar, A. A1 milk and its controversy-a review/ A. Parashar, R. K. Saini // *International Journal of Bioassays*.- 2015. - № 4.12.- P: 4611-4619.

7.Woodford, Ho. S. Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study/ Ho. S.Woodford, K.Kukuljan., S Pal//*Eur J Clin Nutr* 68:994-1000, 2014. Pubmed reference:24986816. DOI:10.1038/ejcn.2014.127.

References

1.Chia, J. S. J. A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes /J. S. J. Chia, J. L. McRae, S. Kukuljan, K. Woodford, R. B. Elliott, B. Swinburn, K. M. Dwyer // *Nutr. Diabetes*.- 2017 -Pubmed reference: 28504710 DOI: 10.1038/nutd.2017.16.

2. Duarte-Vázquez, M.Á., Production of Cow's Milk Free from Beta-Casein A1 and Its Application in the Manufacturing of Specialized Foods for Early Infant Nutrition/ M.Á.Duarte-Vázquez, C. García-Ugalde, L.M.Villegas-Gutiérrez, B.E. García-Almendárez, J.L. Rosado // *Foods* 6.- 2017 - Pubmed reference:28704923 DOI:10.3390/foods6070050.

3.He, M., Effects of cow's milk beta-casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: a multicentre, randomised controlled study/ M. He, J. Sun, Z.Q. Jiang, Y.X Yang // *Nutr J* 16:72. - 2017 -DOI:10.1186/s12937-017-0275-0.

4.Kamiński, S. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health/ S. Kamiński, A. Cieslińska, E. Kostyra // *J Appl Genet* 48:189-98, 2007- DOI:10.1007/BF03195213.

5.Parashar, A. A1 milk and its controversy-a review/ A.Parashar, R. K. Saini . // *International Journal of Bioassays*. - 2015. - № 4.- P: 4611-4619.

6. Parashar, A. A1 milk and its controversy-a review/ A. Parashar, R. K. Saini // *International Journal of Bioassays*.- 2015. - № 4.12.- P: 4611-4619.

7.Woodford, Ho. S. Comparative effects of A1 versus A2 beta-casein on gastrointestinal measures: a blinded randomised cross-over pilot study/ Ho. S.Woodford, K. Kukuljan., S Pal//*Eur J Clin Nutr* 68:994-1000, 2014. Pubmed reference:24986816. DOI:10.1038/ejcn.2014.127.