

На правах рукописи

**ЗАРИПОВ ОЛЕГ ГАЯЗОВИЧ**

**ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА  
ПО ГЕНАМ БЕТА-ЛАКТОГЛОБУЛИНА И КАППА-КАЗЕИНА  
МЕТОДАМИ ДНК-ТЕХНОЛОГИИ**

Специальность: 03.01.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2010

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия  
ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук, доцент  
**Ахметов Тахир Мунавирович**

**Официальные оппоненты:** доктор ветеринарных наук, профессор  
**Хазипов Нариман Залилович**

кандидат биологических наук, доцент  
**Бабынин Эдуард Викторович**

**Ведущая организация:** ФГНУ «Всероссийский научно-исследовательский  
институт племенного дела», Московская область,  
Пушкинский р-н, п. Лесные Поляны.

Защита состоится 25 марта 2010 года в 13:00 ч. на заседании диссертационного  
совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете  
им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского  
Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2010 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор

Абрамова З.И.

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** В связи с заинтересованностью перерабатывающих предприятий молочной промышленности в закупках качественного сырья для производства белкомолочной продукции, возникла потребность в привлечении современных молекулярно-генетических методов диагностики в животноводство для улучшения технологических свойств молока.

Процесс производства высококачественного сыра и творога возможен лишь при условии, что молоко направляемое на их выработку является сыропригодным. т.е. способно образовывать плотный казеиновый сгусток под действием сычужного фермента.

Для производства пастеризованных и стерилизованных продуктов молоко подвергается обработке с использованием высоких температур. Поэтому, проблема повышения термостабильности белков молока также является особо актуальной.

Опыт многих стран свидетельствует об использовании в животноводстве генетических маркеров, связанных с качественными признаками молочной продуктивности. Одними из таких маркеров являются гены бета-лактоглобулина и каппа-казеина (Л.А. Калашникова, 2003).

Ген каппа-казеин – один из немногих известных генов, однозначно связанный с признаками белкомолочности и технологическими свойствами молока. В-аллель гена каппа-казеина ассоциирован с более высоким содержанием белка в молоке, более высоким выходом творога и сыра, а также лучшими коагуляционными свойствами молока. Практика показывает, что высококачественные твёрдые сыры могут быть изготовлены только из молока, полученного от коров, имеющих генотип *BB* каппа-казеина. Хотя многими учеными установлено влияние гена бета-лактоглобулина на биохимические и технологические характеристики молока, нет единого мнения какой из аллелей, *A* или *B* наиболее предпочтителен.

В настоящее время генотипирование животных все больше связывают с работами в области ДНК-технологий, что позволяет идентифицировать генотипы молочных белков у маточного поголовья, производителей и молодняка (О.В. Костюнина, 2005).

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы является разработка и усовершенствование способов определения аллельного полиморфизма генов бета-лактоглобулина и каппа-казеина у крупного рогатого скота на основе метода полимеразной цепной реакции.

В соответствии с целью работы для решения были поставлены следующие задачи:

- Оптимизировать технику выделения ДНК из крови и спермы крупного рогатого скота для молекулярно-генетических исследований.
- Оптимизировать технику ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по генам бета-лактоглобулина и каппа-казеина; разработать новые способы проведения ПЦР.

- Определить частоту встречаемости аллельных вариантов и генотипов бета-лактоглобулина и каппа-казеина у крупного рогатого скота с использованием ДНК-анализа.
- Оценить молочную продуктивность коров с разными генотипами бета-лактоглобулина.
- Изучить качество и технологические свойства молока коров с разными генотипами бета-лактоглобулина.

**Научная новизна.** Оптимизированы технические приемы выделения ДНК из крови и спермы и способы проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по генам каппа-казеина и бета-лактоглобулина.

Разработаны способы проведения высокоточной и аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* гена каппа-казеина с оптимизированной техникой 2-х стадийной ПЦР.

**Практическая значимость.** Оптимизированные технические приемы пробоподготовки нуклеиновых кислот и ПЦР-ПДРФ-анализа для генотипирования крупного рогатого скота по генам бета-лактоглобулина и каппа-казеина позволяют осуществлять достоверную оценку их аллельного полиморфизма.

Разработанные и предложенные подходы проведения высокоточной и аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* гена каппа-казеина с оптимизированной техникой 2-х стадийной ПЦР позволяют осуществлять эффективную экспресс-идентификацию аллельных вариантов *AA*, *AB*, *BB* гена CSN3.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации доложены на:

- ежегодных итоговых заседаниях ученых советов ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана (2007-2009 гг.);
- всероссийской научно-практической конференции «Технологические и технические аспекты развития сельского хозяйства», посвященной 85-летию КГАУ (Казань, 2007 г.);
- международной научно-практической конференции «Современные подходы развития АПК», посвященной 135-летию КГАВМ им. Н.Э. Баумана (Казань, 2008 г.).

**Публикация результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано 9 научных статей, в том числе 4 в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК. Получен 1 патент РФ на изобретение.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

- Технические приемы выделения нуклеиновых кислот и проведения ПЦР-ПДРФ, оптимизированные для генотипирования крупного рогатого скота по генам бета-лактоглобулина и каппа-казеина, являются эффективными инструментами ДНК-анализа аллельного полиморфизма.
- Способы проведения высокоточной и аллель-специфичной ПЦР, разработанные для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* гена каппа-казеина в оптимизированной технике 2-х стадийной ПЦР, обеспечивают эффективную наработку специфичных ампликонов и

позволяют осуществлять достоверную экспресс-идентификацию искомым генотипов.

- Определены частоты встречаемости желательных аллелей и генотипов по генам бета-лактоглобулина и каппа-казеина крупного рогатого скота, влияющие на молочную продуктивность, состав и физико-химические показатели молока;
- *A*-аллель гена бета-лактоглобулина оказывает положительное влияние на молочную продуктивность коров (удой, содержание белка, лактозы и сухих веществ в молоке); молоко таких коров характеризуется повышенной термостабильностью, тогда как *B*-аллель гена бета-лактоглобулина улучшает сыродельческие свойства молока.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 130 страницах компьютерного текста (текстовый редактор «Microsoft Word 2003», стиль «Times New Roman», размер шрифта 14 пт, интервал полуторный) и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследования, выводы, практические предложения, список использованной литературы (всего 232 источника, в том числе 159 иностранных) и приложения. Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 20 рисунками.

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследования по теме диссертации проводились в период с 2006 по 2009 гг. на кафедре технологии животноводства ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», в ФГУ «Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория», ООО «Дусым» Атнинского района, а также в ГУП головном племенном предприятии «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан.

Для определения полиморфизма гена бета-лактоглобулина и оценки хозяйственно-полезных признаков у животных с разными генотипами бета-лактоглобулина, было отобрано в ООО «Дусым» 158 черно-пёстро х голштинских коров. Наряду с этим, для определения полиморфизма гена бета-лактоглобулина и каппа-казеина были отобраны 70 быков-производителей в ГУП ГПП «Элита». В нашем исследовании использовались как чистопородные, так и помесные по голштинской породе быки-производители, все быки имели комплексный класс элита-рекорд. Оценку полиморфизма генов бета-лактоглобулина и каппа-казеина проводили на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для дальнейшего исследования согласно принципа аналогов (А.И. Овсянников, 1976), по результатам генотипирования по гену бета-лактоглобулина были сформированы 3 группы черно-пёстро х голштинских коров. В первую группу включены первотёлки с генотипом бета-лактоглобулина *BB* (контрольная группа), во вторую – генотипом *AB*, в третью – генотипом *AA*.

Наряду с экспериментальными материалами использовались данные зоотехнического и племенного учета ООО «Дусым», то есть следующие документы: материалы годовых отчётов, материалы бонитировки, племенные свидетельства, документы первичного зоотехнического учёта (карточки коров и быков – форма 1-МОЛ, 2-МОЛ, а также акты контрольных доек).

Исследуемое поголовье крупного рогатого скота в течение проведения опыта находилось в одинаковых условиях кормления и содержания, при этом были клинически здоровыми. Обслуживающий персонал (доярки, скотники и т.п.) в период проведения исследований был постоянным, что исключало влияние данного стрессового фактора на хозяйственно-полезные признаки животных.

Коров кормили по принятым в ООО «Дусым» рационам с учетом норм и рационов кормления сельскохозяйственных животных (А.П. Калашников и др., 2003). Рационы кормления подопытных коров-первотелок были сбалансированы по 23 основным показателям. Основными кормами в зимний период являлись: силос из кукурузы, сенаж из однолетних викоовсяных смесей, сено кострцовое, которые коровы получали в одинаковом количестве. Корнеклубнеплоды, зерновые концентраты и минерально-витаминные добавки вводили в рацион в зависимости от живой массы и фактического удоя коров. Кормление животных в летний период обеспечивалось за счёт зелёного корма на пастбище и в виде зелёной подкормки при содержании в стойлах. Кроме того, давали концентрированные корма, в расчёте 300-350 г на 1 кг молока.

Кровь, полученную из яремной вены животных, вносили в пробирки с 100 мМ ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ.

Спермодозы от быков-производителей поступали в замороженном виде.

**Выделение ДНК из крови** проводили разработанным нами аммиачным и комбинированным щелочным способом.

**Аммиачный способ.** 100 мкл крови смешивали с 1000 мкл дистиллированной воды и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отбрасывали, а к осадку добавляли 100 мкл 10 % раствора аммиака «25-37<sup>0</sup>С» и тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре до просветления суспензии. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 95<sup>0</sup>С в течение 15 мин с открытой пробиркой.

**Комбинированный щелочной способ.** 100 мкл крови смешивали с 1 мл дистиллированной воды и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а к осадку добавляли 50 мкл 0,2 М NaOH и тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре до просветления суспензии. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 60<sup>0</sup>С в течение 10 мин. К лизату добавляли равный объем (50 мкл) 1М Трис-HCl (pH 8,0) и тщательно встряхивали смесь на вортексте при комнатной температуре. К полученному гомогенату добавляли 500 мкл 96% этанола и выдерживали полученную смесь при -20<sup>0</sup>С в течение 30 мин. Нуклеопротеидный комплекс осаждали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок высушивали при 60<sup>0</sup>С в течение 12 мин с открытой пробиркой. К высушенному осадку добавляли 100 мкл 10% аммиака, тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре и выдерживали в термостате при 60<sup>0</sup>С в течение 10 мин, затем повторно встряхивали на вортексе и выдерживали в термостате при 60<sup>0</sup>С в течение 10 мин. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 95<sup>0</sup>С в течение 15 мин с открытой пробиркой.

**Выделение ДНК из спермы** проводили разработанным нами комбинированным щелочным способом.

**Комбинированный щелочной способ.** 50 мкл спермы растворяли в 500 мкл дистиллированной воды и осаждали при 10000 об/мин в течение 10 мин. К осадку добавляли 50 мкл лизирующего раствора (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM EDTA-Na (pH 8,0), 2% SDS, 1 mg/ml протеиназы K, 10 mM 2-меркаптоэтанола), тщательно суспендировали на вортексе и инкубировали при 55<sup>0</sup>С в течение 1 часа, через каждые 15 мин встряхивая на вортексе. К лизату добавляли 50 мкл 0,5 M NaOH и тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре до просветления суспензии. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 55<sup>0</sup>С в течение 30 мин, через каждые 15 мин встряхивая на вортексе. Добавляли равный объем (50 мкл) 1M Трис-HCl (pH 8,0) и тщательно встряхивали смесь на вортексте при комнатной температуре. Затем смешивали с 500 мкл 96% этанола осторожным покачиванием пробирки и выдерживали полученную смесь в морозильнике при -20<sup>0</sup>С в течение 30 мин. Нуклеопротеидный комплекс осаждали центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок высушивали при 60<sup>0</sup>С в течение 10 мин с открытой пробиркой. К высушенному осадку добавляли 100 мкл 10% аммиака, тщательно встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре и выдерживали в термостате при 60<sup>0</sup>С в течение 15 мин, затем повторно встряхивали на вортексе и повторяли процедуру термостатирования (60<sup>0</sup>С, 15 мин). Полученный гомогенат инкубировали в термостате при 95<sup>0</sup>С в течение 15 мин с открытой пробиркой. Препараты ДНК хранили в условиях морозильника. Перед использованием пробы ДНК размораживали в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 15 мин.

**Анализ локуса гена бета-лактоглобулина.** ПЦР проводили на программируемом термоциклере «Терцик» (Россия) в объеме 20 мкл с праймерами BLGP3: 5'-GTCCTTGTGCTGGACACCGACTACA-3' и BLGP4: 5'-CAGGACACCGGCTCCCGGTATATGA-3', сконструированных Дж. Ф. Медрано и Е. Акилар-Кордова (J.F. Medrano and E. Aguilar-Cordova, 1990) для амплификации фрагмента гена бета-лактоглобулина длиной 262 bp.

Для определения полиморфизма гена бета-лактоглобулина по вариантам A и B 20 мкл ПЦР пробы обрабатывали 5 ед. эндонуклеазы рестрикции *HaeIII* в 1×буфере «С» фирмы СибЭнзим (Россия) при 37<sup>0</sup>С течение ночи.

Для визуализации фрагментов ДНК пробы вносили в лунки 2,5 % агарозного геля с содержанием этидия бромид (0,5 мкг/мл) и проводили горизонтальный электрофорез при 15 В/см в течение 50 мин в 1×ТВЕ буфере.

**Анализ локуса гена каппа-казеина.** ПЦР проводили на программируемом термоциклере «Терцик» (Россия) в объеме 20 мкл, с серией отобранных праймеров:

1) Праймеры JK5: 5'-ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG-3' и JK3: 5'-GCSSATTTTCGCCTTCTCTGTAACAGA-3', сконструированные Дж. Ф. Медрано и Е. Акилар-Кордова (J.F. Medrano and E. Aguilar-Cordova, 1990) для амплификации фрагмента гена каппа-казеина длиной 350 bp.

2) Праймеры AB1: 5'-TGTGCTGAGTAGGTATCCTAGTTATGG-3' и AB2: 5'-GCGTTGTCTTCTTTGATGTCTCCTTAG-3', сконструированные А Барросо и др. (A. Barroso et al, 1998) для амплификации фрагмента гена каппа-казеина длиной 453 bp.

3) Праймеры K1: 5'-GAAATCCCTACCATCAATACC-3' и K2: 5'-CCATCTACGCTAGTTTAGATG-3', сконструированные С. Камински (S. Kaminski, 1993) для амплификации фрагмента гена каппа-казеина длиной 271 bp.

4) Праймеры JK5-hs: 5'-GGGGGATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG-3' и JK3-hs: 5'-CCCCGCCCATTTCGCCTTCTCTGTAACAGA-3', сконструированные Р.Р. Вафиным с соавт. (2007) для амплификации фрагмента гена каппа-казеина длиной 359 bp.

Для определения аллельного полиморфизма гена каппа-казеина 20 мкл ПЦР пробы обрабатывали 10 ед. эндонуклеазы рестрикции *Hinf I* в 1×буфере «O» фирмы СибЭнзим (Россия) или 10 ед. эндонуклеазы рестрикции *HindIII* в 1×буфере «W» фирмы СибЭнзим (Россия) при 37 °С течение ночи.

5) Праймеры В-F-hs: 5'-CCCCCGTGAGCCTACAAGTACACCTACCAT-3', В-R-hs: 5'-CCCCCGATGTCTCCTTAGAGTATTTAGACC-3', А-F-hs: 5'-GGGGGGCTGTTCACACASAAAAACAGTAAAG-3' и А-R-hs: 5'-GGGGGGTGCCTAACCTTATACAGCSTTTCG-3', сконструированные нами для амплификации фрагментов аллелей гена каппа-казеина длиной 242 bp (А) и 156 bp (В).

Для визуализации фрагментов ДНК пробы вносили в лунки 2,5 % агарозного геля с содержанием этидия бромид (0,5 мкг/мл) и проводили горизонтальный электрофорез при 15 В/см в течение 50 мин в 1×ТВЕ буфере.

Частоту встречаемости генотипов каппа-казеина и бета-лактоглобулина определяли по формуле:

$p = n/N$ , где  $p$  – частота определения генотипа,  $n$  – количество особей, имеющих определенный генотип,  $N$  – число особей.

Частоту отдельных аллелей определяли по формуле:

$P_A = (2n_{AA} + n_{AB}) : 2N$  и  $q_B = (2n_{BB} + n_{AB}) : 2N$ , где  $P_A$  – частота аллеля А,  $q_B$  – частота аллеля В,  $N$  – общее число аллелей.

По закону Харди-Вайнберга рассчитывали ожидаемые результаты частот генотипов в исследуемой популяции.

Молочную продуктивность определяли ежемесячно путём проведения контрольных доек (3 раза в месяц). На основании контрольных доек рассчитывали общую молочную продуктивность за 305 дней лактации, а также за укороченную лактацию, но не меньше 240 дней. Содержание жира в молоке определяли кислотным методом по Гербергу, а содержание белка – методом измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определения массовой доли белка.

Определяли плотность молока с помощью ареометра (лактоденсиметра), сортность (класс) молока по редуктазной пробе с резазурином по цветовой шкале, сухое вещество в молоке – методом высушивания в сушильном шкафу до постоянной массы при температуре 105 °С, содержание лактозы в молоке – на спектрофотометре (ГОСТ Р 51259-99).

Для определения сыропригодности молока использовали сычужную и сычужно-бродильную пробы (ГОСТ 9225-84).

Продолжительность свертывания молока определяли в минутах, учитывая время с момента внесения фермента до образования плотного сгустка.

Сыропригодность молока определяли по продолжительности его свертывания сычужным ферментом и делили на три типа:

I тип – молоко свертывается менее чем за 15 мин;

II тип – в течение 15-40 мин;

III тип – более чем за 40 мин, или же совсем не свертывается (Н.В. Барабанщиков, 1990).

Для изготовления сыра больше всего подходит молоко II типа и по нему отработаны технологические режимы производства. Молоко, медленно свертывающееся сычужным ферментом, считается несиропригодным.

Плотным считали сгусток без выделения сыворотки, пузырьков газа, трещин, пустот. При повороте пробирки на 180° сгусток не выпадал или выпадали лишь отдельные кусочки.

Рыхлым считали сгусток, имеющий немногочисленные глазки пузырьков газа, трещины. При повороте пробирки на 180° сгусток деформировался и выпадало до 50% от общего количества сгустка.

Дряблым считали сгусток, сильно пронизанный пузырьками газа, разорванный на куски, хлопьевидный. При повороте пробирки на 180° сгусток выпадал полностью или выпадало более 50% от общего количества сгустка.

Термоустойчивость молока определяли по тигловой пробе. В пробирки из молибденового стекла отмеряли по 2 мл молока. Затем пробирки с молоком ставили в ультратермостат и нагревали до температуры 135°C, замечая время. Если в течение 5 мин консистенция молока не изменялась, то оно считалось термоустойчивым. Определяли также термостабильность, т.е. промежуток времени от момента помещения пробирок в ультратермостат до появления первых признаков коагуляции белков.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel. Уровень достоверности полученных результатов определяли по критерию Стьюдента.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

#### **3.1. Оптимизация техники выделения ДНК из крови и спермы**

ДНК из крови выделяли разработанным нами аммиачным и комбинированным щелочным способом.

Выделенные нами препараты ДНК из крови аммиачным и комбинированным щелочным способами показали эффективность своего применения в ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по генам каппа-казеина и бета-лактоглобулина.

Комбинированный щелочной способ выделения ядерной ДНК из лейкоцитов крупного рогатого скота позволяет сохранить экстрагированные нуклеиновые кислоты для ДНК-диагностики по генам бета-лактоглобулина и каппа-казеина в течение 1 года с более чем 30 кратной заморозкой-разморозкой.

Эффективность выделения ДНК из спермы быков-производителей была достигнута использованием в лизирующем растворе 2-меркаптоэтанола – сульфидредуцента, разрушающего дисульфидные связи, что в конечном счете позволяло протеиназе К и SDS довершить процедуру лизиса.

Заключительным этапом комбинированного щелочного способа экстракции ядерной ДНК из лейкоцитов и спермы крупного рогатого скота являлось

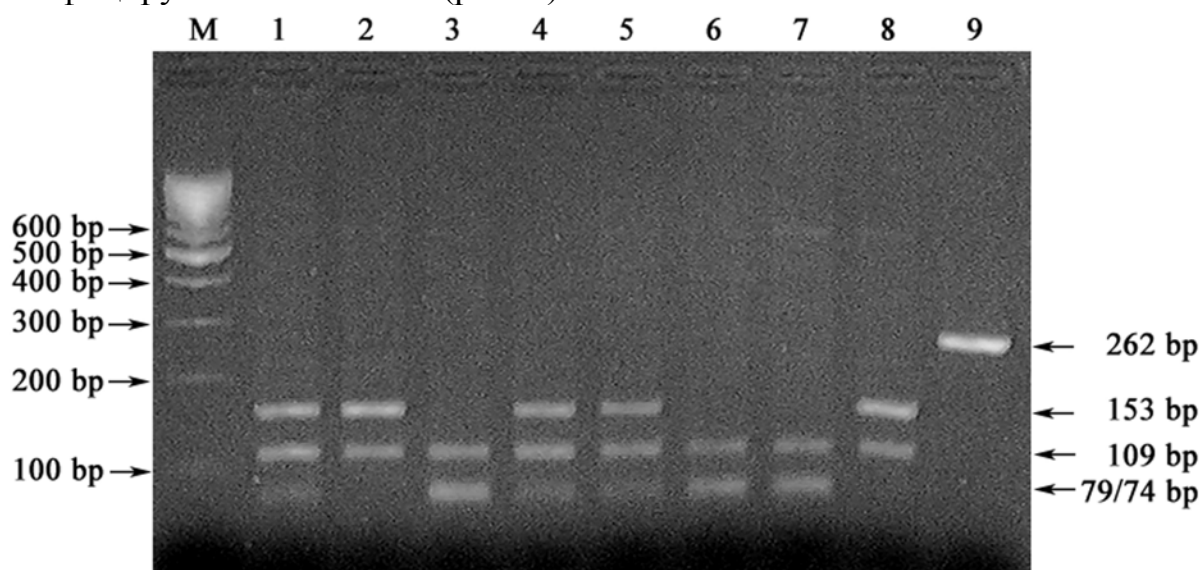
применение 10% раствора аммиака, использованного в качестве растворителя осажденного нуклеопротеидного комплекса, предварительно экстрагированного NaOH. Выбранный подход растворения нуклеиновых кислот с последующим выпариванием аммиака позволял получать пригодные для молекулярно-генетических исследований препараты ДНК с долгосрочным периодом хранения.

Выделенные нами препараты ДНК из спермы быков-производителей оптимизированным комбинированным щелочным способом также показали эффективность своего применения в ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по генам бета-лактоглобулина и каппа-казеина.

### 3.2. Оптимизация техники ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по гену бета-лактоглобулина

Для оценки качества работы известных протоколов по генотипированию крупного рогатого скота по гену бета-лактоглобулина нами была протестирована пара олигонуклеотидных праймеров: BLGP3+BLGP4 по оптимизированной нами технике ПЦР-ПДРФ.

Праймеры BLGP3+BLGP4 инициируют амплификацию фрагмента гена бета-лактоглобулина крупного рогатого скота длиной 262 bp, а  $\beta$ -LGB-ПДРФ-*HaeIII* профиль (AA=153/109 bp, BB=109/79/74 bp и AB=153/109/79/74 bp) идентифицирует его генотипы (рис. 1).



**Рис. 1. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ гена  $\beta$ -лактоглобулина крупного рогатого скота с праймерами BLGP3+BLGP4 и эндонуклеазным расщеплением ферментом *HaeIII***

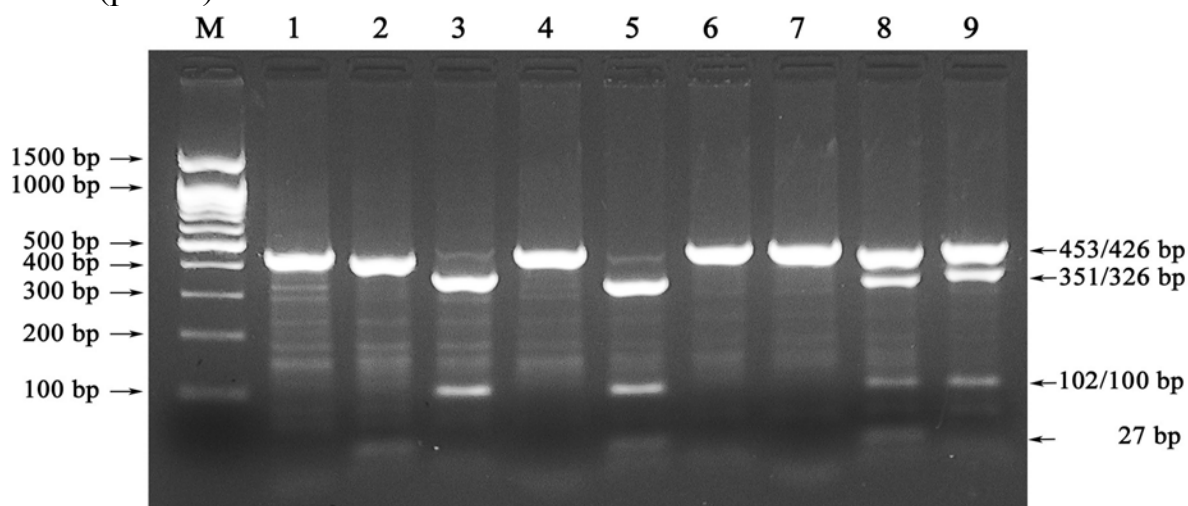
**Обозначения:** М) ДНК-маркеры 1000-100 bp (СибЭнзим); 1, 4, 5) генотип AB (153/109/79/74 bp); 2, 8) генотип AA (153/109 bp); 3, 6, 7) генотип BB (109/79/74 bp); 9) цельный ПЦР-фрагмент гена бета-лактоглобулина (262 bp).

Полученные результаты ПЦР-ПДРФ с праймерами BLGP3+BLGP4 являются удовлетворительными в плане воспроизводимости и идентификации генотипов крупного рогатого скота по гену бета-лактоглобулина.

### 3.3. Оптимизация техники ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по гену каппа-казеина

Для оценки качества работы известных протоколов по генотипированию крупного рогатого скота по гену каппа-казеина нами была протестирована серия олигонуклеотидных праймеров: АВ1+АВ2, К1+К2, JK5+JK3 по оптимизированной нами технике ПЦР-ПДРФ.

Праймеры АВ1+АВ2 инициируют амплификацию фрагмента гена-каппа-казеина крупного рогатого скота длиной 453 bp, а ПДРФ-*HinfI* профиль (AA=326/100/27 bp, BB=426/27 bp и AB=426/326/100/27 bp) и ПДРФ-*HindIII* профиль (AA=453 bp, BB=351/102 bp и AB=453/351/102 bp) идентифицируют его генотипы (рис. 2).



**Рис. 2. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ гена каппа-казеина крупного рогатого скота с праймерами АВ1+АВ2 и эндонуклеазным расщеплением ферментом *HinfI* или *HindIII***

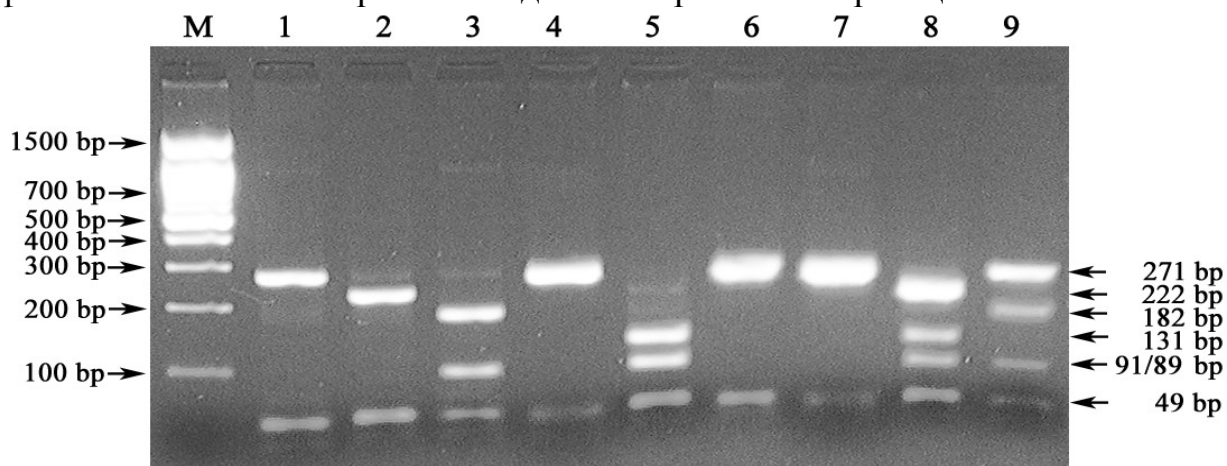
**Обозначения:** М) ДНК-маркеры 1500-100 bp (СибЭнзим); 1) цельный ПЦР-фрагмент генотипа BB гена каппа-казеина (453 bp); 2) генотип BB (426/27 bp (*HinfI*)); 3) генотип BB (351/102 bp (*HindIII*)); 4) цельный ПЦР-фрагмент генотипа AA гена каппа-казеина (453 bp); 5) генотип AA (326/100/27 bp (*HinfI*)); 6) генотип AA (453 bp (*HindIII*)); 7) цельный ПЦР-фрагмент генотипа AB гена каппа-казеина (453 bp); 8) генотип AB (426/326/100/27 bp (*HinfI*)); 9) генотип AB (453/351/102 bp (*HindIII*)).

Полученные результаты ПЦР-ПДРФ гена каппа-казеина крупного рогатого скота с праймерами АВ1+АВ2 являются удовлетворительными в плане воспроизводимости и идентификации генотипов. Слабый «фон неспецифики» по сравнению с сильным ПЦР-сигналом (453 bp) существенно не влияет на информативность интерпретации генотипов.

Праймеры К1+К2 инициируют амплификацию фрагмента гена-каппа-казеина крупного рогатого скота длиной 271 bp, а ПДРФ-*HinfI* профиль (AA=131/91/49 bp, BB=222/49 bp и AB=222/131/91/49 bp) и ПДРФ-*HindIII* профиль (AA=271 bp, BB=182/89 bp и AB=271/182/89 bp) идентифицируют его генотипы (рис. 3).

Полученные результаты ПЦР-ПДРФ гена каппа-казеина крупного рогатого скота с праймерами К1+К2 являются удовлетворительными в плане воспроизводимости и идентификации генотипов; а наличие димерности на одной

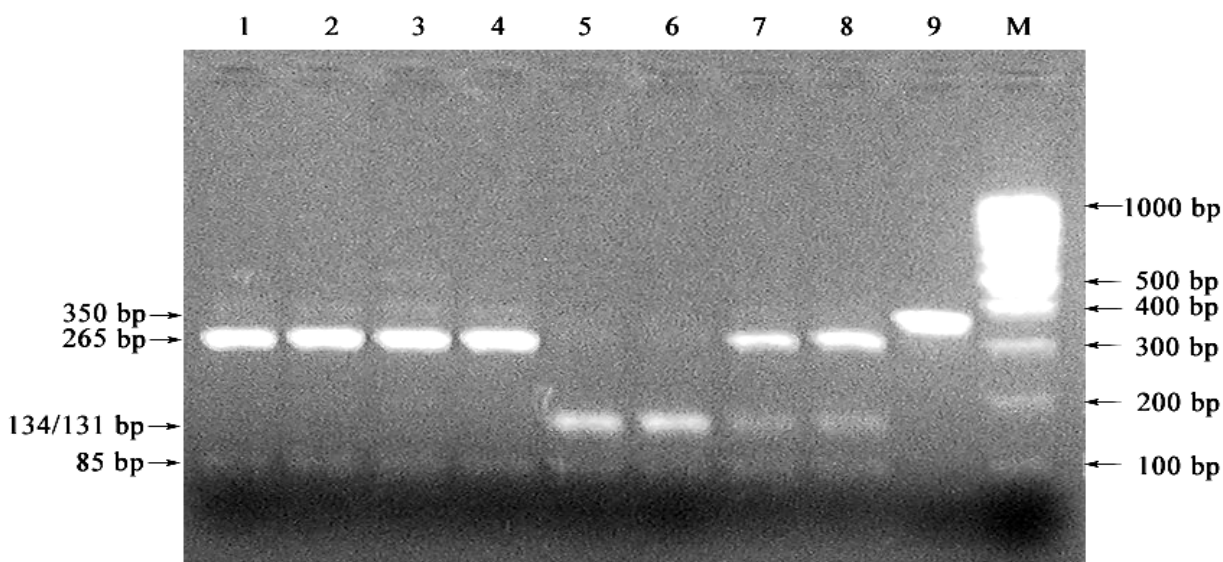
длине с неинформативным фрагментом *HinfI* рестрикции (49 bp) не снижает эффективности генотипирования с данным протоколом реакции.



**Рис. 3. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ гена каппа-казеина крупного рогатого скота с праймерами К1+К2 и эндонуклеазным расщеплением ферментом *HinfI* или *HindIII***

**Обозначения:** 1) цельный ПЦР-фрагмент генотипа *BB* гена каппа-казеина (271 bp); 2) генотип *BB* (222/49 bp (*HinfI*)); 3) генотип *BB* (182/89 bp (*HindIII*)); 4) цельный ПЦР-фрагмент генотипа *AA* гена каппа-казеина (271 bp); 5) генотип *AA* (131/91/49 bp (*HinfI*)); 6) генотип *AA* (271 bp (*HindIII*)); 7) цельный ПЦР-фрагмент генотипа *AB* гена каппа-казеина (271 bp); 8) генотип *AB* (222/131/91/49 bp (*HinfI*)); 9) генотип *AB* (271/182/89 bp (*HindIII*)); М) ДНК-маркеры 1500-100 bp (СибЭнзим).

Праймеры JK5+JK3 инициируют амплификацию фрагмента гена-каппа-казеина крупного рогатого скота длиной 350 bp, а ПДРФ-*HinfI* профиль идентифицирует его генотипы (*AA*=134/131/85 bp, *BB*=265/85 bp и *AB*=265/134/131/84 bp) (рис.4).



**Рис. 4. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ гена каппа-казеина крупного рогатого скота с праймерами JK5+JK3 и эндонуклеазным расщеплением ферментом *HinfI***

**Обозначения:** 1-4) генотип *BB* (265/85 bp (*HinfI*)); 5-6) генотип *AA* (134/131/85 bp (*HinfI*)); 7-8) генотип *AB* (265/134/131/84 bp (*HinfI*)); 9) цельный ПЦР-фрагмент генотипа *AB* гена каппа-казеина (350 bp); М) ДНК-маркеры 1000-100 bp (СибЭнзим).

Полученные результаты ПЦР-ПДРФ гена каппа-казеина крупного рогатого скота с праймерами JK5+JK3 являются удовлетворительными в плане воспроизводимости и идентификации генотипов. Для базисной интерпретации генотипов следует ориентироваться на мажорные идентифицирующие ПДРФ-*HinfI* фрагменты: для генотипа  $BB=265$  bp, для  $AA=134/131$  bp, для  $AB=265$  и  $134/131$  bp, соответственно.

### 3.4. Разработка способа проведения высокоточной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по гену каппа-казеина

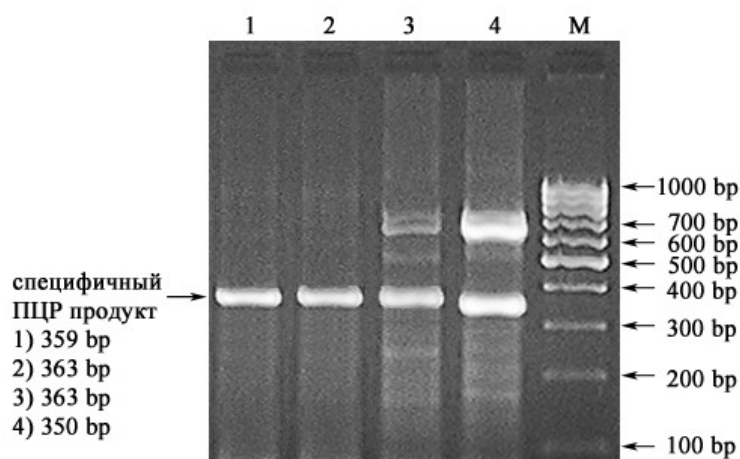
Разработанный нами способ проведения высокоточной ПЦР, *схож* с разновидностями «touch up» ПЦР (F. Weighardt, G. Biamonti, S. Riva, 1993; M. Ailenberg, M. Silverman, 2000) тем, что в качестве праймеров используются олигонуклеотиды, которые состоят из 3'-участка, комплементарного последовательности-мишени, и 5'-участка, не комплементарного последовательности-мишени, *отличим* тем, что в качестве праймеров используются олигонуклеотиды с потенциальной температурой гибридизации по всей длине, превышающей температуру отжига их 3'-комплементарного участка на 5-10<sup>0</sup>С, а при проведении ПЦР отжиг ведут при температуре, соответствующей указанной потенциальной температуре гибридизации.

Выбранная стратегия проведения высокоточной ПЦР основывается на том, что используется фиксированная температура потенциального оптимума отжига праймеров по всей 5'-3' длине, при этом связывание 3'-комплементарного участка олигонуклеотида с нуклеиновой кислотой исследуемого биологического объекта затрудняется в виду несоответствия температур гибридизации на 5-10<sup>0</sup>С, однако неспецифичное праймирование находится в значительно более угнетенном состоянии, чем достигается более эффективная наработка только специфичных ампликонов, которые в дальнейшем являются мишенями для праймеров в системе 100% комплементарности.

Разработанный способ проведения высокоточной ПЦР был нами протестирован в сравнении с классической ПЦР и ближайшим аналогом на предмет оценки аллельного полиморфизма гена каппа-казеина крупного рогатого скота.

При проведении *классической ПЦР* для амплификации фрагмента гена каппа-казеина крупного рогатого скота с праймерами JK5+JK3 (J.F. Medrano, E. Aguilar-Cordova, 1990) нами получен наряду со специфичным ПЦР продуктом размером 350 bp также неспецифичный фрагмент амплификации размером приблизительно 600-700 bp (рис. 5, трек 4).

При проведении ПЦР в *режиме ближайшего аналога* (F. Weighardt, G. Biamonti, S. Riva, 1993) для амплификации фрагмента гена каппа-казеина крупного рогатого скота с модифицированными праймерами N-JK5+N-JK3 нами выявлены наряду со специфичным ПЦР продуктом размером 363 bp также слабые неспецифичные фрагменты амплификации размером приблизительно 600-700 bp (рис. 5, трек 3).



**Рис. 5. Электрофореграмма результата тестирования способов ПЦР на предмет индикации гена каппа-казеина крупного рогатого скота**

**Обозначения:**

- 1) *разработанный способ* проведения ПЦР с праймерами JK5-hs и JK3-hs;
- 2) *разработанный способ* проведения ПЦР с праймерами N-JK5 и N-JK3;
- 3) способ проведения ПЦР с праймерами N-JK5 и N-JK3 *в режиме ближайшего аналога*;
- 4) *классическая ПЦР* с праймерами JK5 и JK3;
- 5) ДНК-маркеры 1000-100 bp (СибЭнзим).

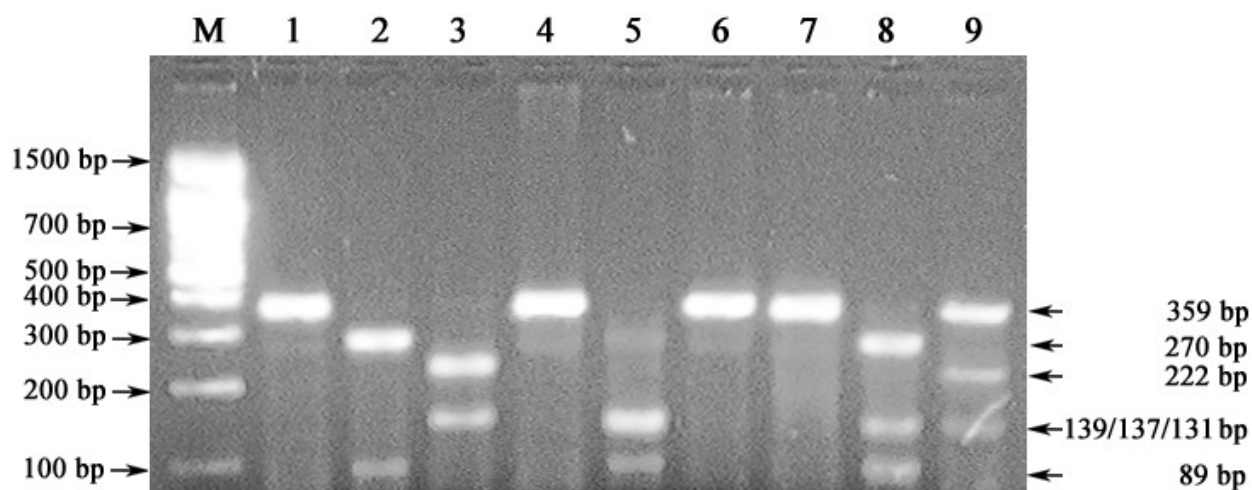
При проведении ПЦР в *режиме разработанного способа* для амплификации фрагмента гена каппа-казеина крупного рогатого скота с модифицированными праймерами N-JK5+N-JK3 и JK5-hs+JK3-hs амплифицировались только специфичные ПЦР продукты размером 363 bp (рис. 5, трек 2) и 359 bp (рис. 5, трек 1), соответственно.

Таким образом, исключение амплификации неспецифичных продуктов достигалось также, за счет уменьшения времени синтеза до 10 сек и повышения температуры отжига до 63<sup>0</sup>С.

На основании положительного результата по исключению неспецифичной амплификации при использовании предлагаемого способа проведения ПЦР с модифицированными праймерами JK5-hs и JK3-hs (рис. 5, трек 1) нами были предприняты дальнейшие действия по оптимизации режима 2-х стадийной ПЦР с температурным совмещением стадий отжига и синтеза при 68(72)<sup>0</sup>С (рис. 6 и 7).

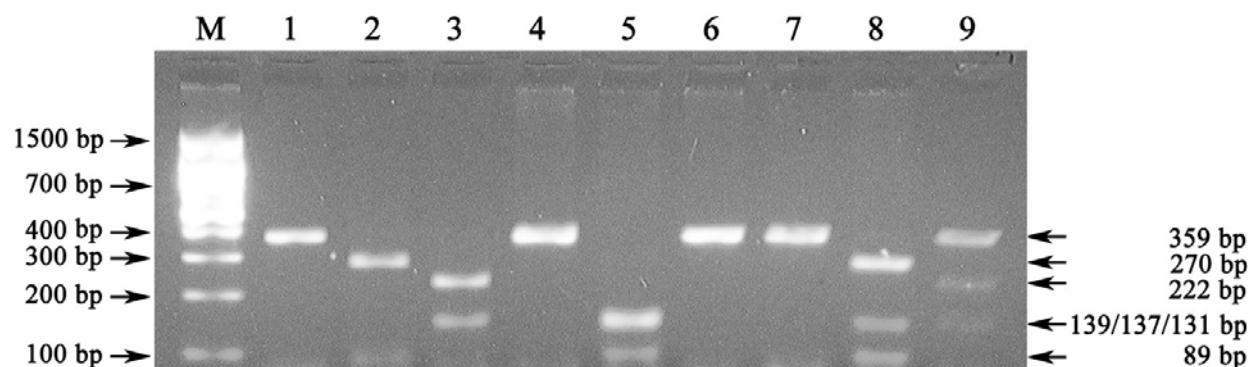
В режиме 2-х стадийной ПЦР модифицированные праймеры JK5-hs и JK3-hs эффективно инициируют амплификацию фрагмента гена каппа-казеина крупного рогатого скота длиной 359 bp, а ПДФР-*HinfI* профиль (AA=139/131/89 bp, BB=270/89 bp и AB=270/139/131/89 bp) и ПДФР-*HindIII* профиль (AA=359 bp, BB=222/137 bp и AB=359/222/137 bp) идентифицируют его генотипы (рис. 6 и 7).

Полученные результаты ПДФР-ПЦР гена каппа-казеина крупного рогатого скота с праймерами JK5-hs+JK3-hs являются удовлетворительными в плане воспроизводимости и идентификации генотипов.



**Рис. 6. ПЦР-ПДРФ-*HinfI* (*HindIII*) профиль гена каппа-казеина крупного рогатого скота, иницированный праймерами JK5-hs и JK3-hs при температуре 68<sup>0</sup>С на стадии «отжиг-синтез»**

**Обозначения:** М) ДНК-маркеры 1500-100 bp (СибЭнзим); 1) цельный ПЦР-фрагмент генотипа *BB* гена каппа-казеина (359 bp); 2) генотип *BB* (270/89 bp (*HinfI*)); 3) генотип *BB* (222/137 bp (*HindIII*)); 4) цельный ПЦР-фрагмент генотипа *AA* гена каппа-казеина (359 bp); 5) генотип *AA* (139/131/89 bp (*HinfI*)); 6) генотип *AA* (359 bp (*HindIII*)); 7) цельный ПЦР-фрагмент генотипа *AB* гена каппа-казеина (359 bp); 8) генотип *AB* (270/139/131/89 bp (*HinfI*)); 9) генотип *AB* (359/222/137 bp (*HindIII*)).



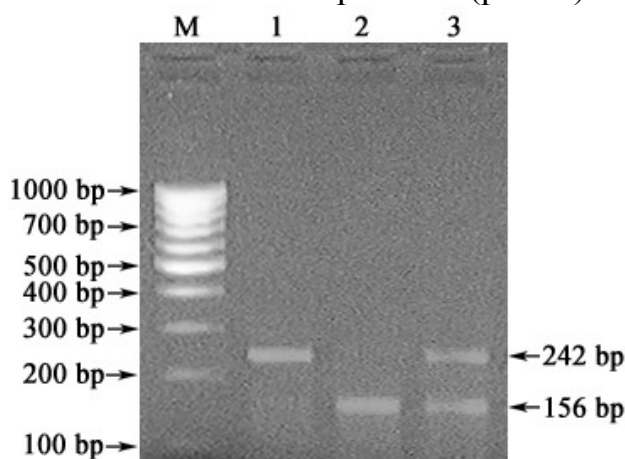
**Рис. 7. ПЦР-ПДРФ-*HinfI* (*HindIII*) профиль гена каппа-казеина крупного рогатого скота, иницированный праймерами JK5-hs и JK3-hs при температуре 72<sup>0</sup>С на стадии «отжиг-синтез»**

**Обозначения:** М) ДНК-маркеры 1500-100 bp (СибЭнзим); 1) цельный ПЦР-фрагмент генотипа *BB* гена каппа-казеина (359 bp); 2) генотип *BB* (270/89 bp (*HinfI*)); 3) генотип *BB* (222/137 bp (*HindIII*)); 4) цельный ПЦР-фрагмент генотипа *AA* гена каппа-казеина (359 bp); 5) генотип *AA* (139/131/89 bp (*HinfI*)); 6) генотип *AA* (359 bp (*HindIII*)); 7) цельный ПЦР-фрагмент генотипа *AB* гена каппа-казеина (359 bp); 8) генотип *AB* (270/139/131/89 bp (*HinfI*)); 9) генотип *AB* (359/222/137 bp (*HindIII*)).

Таким образом, разработанный нами способ проведения высокоточной ПЦР в режиме 2-х стадийной ПЦР с температурным совмещением стадий отжига и синтеза при 68(72)<sup>0</sup>С является действенным инструментом генотипирования крупного рогатого скота по гену каппа-казеина.

### 3.5. Разработка способа проведения аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* гена каппа-казеина

Нами разработан способ проведения аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* гена каппа-казеина, **схожий** со способом, предложенным Г. Ринконом и Дж.Ф. Медрано (G. Rincon and J. F. Medrano, 2003), включающим подготовку пробы нуклеиновой кислоты, внесение указанной пробы в реакционную смесь для ПЦР, состоящую из дНТФ, буферной системы, Taq ДНК полимеразы, 4-х праймеров; проведение ПЦР; детекцию амплифицированных фрагментов ДНК методом гель-электрофореза; **отличающийся** тем, что, используются другие последовательности праймеров, все из которых являются аллель-специфичными, не имеющие дополнительных некомплементарных ни к одному из аллелей гена каппа-казеина крупного рогатого скота «mismatch-нуклеотидов» в позиции  $-2$  от 3'-терминальных нуклеотидов праймеров, но имеющие 5'-некомплементарные участки (n) длиной 5-3 нуклеотидов: *B*-аллель-специфичные праймеры «B-F-hs»: 5'-ccccGTGAGCCTACAAGTACACCTACCAT-3' и «B-R-hs»: 5'-cCcccGATGTCTCCTTAGAGTATTTAGACC-3', которые инициируют амплификацию *B*-аллель-специфичного фрагмента ДНК гена каппа-казеина крупного рогатого скота размером 156 bp; *A*-аллель-специфичные праймеры A-F-hs: 5'-gggggCTGTTACACACAAAAACAGTAAAG-3' и A-R-hs: 5'-gggGGGTGCCTAACCTTATACAGCCTTTTCG-3', которые инициируют амплификацию *A*-аллель-специфичного фрагмента ДНК гена каппа-казеина крупного рогатого скота размером 242 bp; проводят 2-х стадию ПЦР с совмещением температуры отжига и синтеза при 72<sup>0</sup>С (рис. 8).



**Рис. 8. Электрофореграмма технического результата предложенного способа (техники) аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* гена каппа-казеина с праймерами «B-F-hs»+«B-R-hs»+«A-F-hs»+«A-R-hs».**

**Обозначения:** М) ДНК-маркеры 100-1000 bp (СибЭнзим); 1) генотип *AA* гена каппа-казеина кр.рог.ск (242 bp); 2) генотип *BB* гена каппа-казеина кр.рог.ск (156 bp); 3) генотип *AB* гена каппа-казеина кр.рог.ск. (242/156 bp).

Разработанный нами способ проведения аллель-специфичной ПЦР с оптимизированным протоколом 2-х стадийной ПЦР является более эффективным

способом генотипирования гена каппа-казеина, в сравнении со способами ПЦР-ПДРФ), в связи с тем, что не требует проведения обработки ПЦР-продукта эндонуклеазами рестрикции, таким образом, значительно сокращая время анализа.

### 3.6. Оценка полиморфизма локуса генов бета-лактоглобулина и каппа-казеина у крупного рогатого скота

#### 3.6.1. Полиморфизм гена бета-лактоглобулина у коров

Из 158 коров ООО «Дусым» Атнинского района РТ 25 коров имели генотип *AA* (отвечает за синтез белка *A* бета-лактоглобулина), 73 коровы – генотип *AB* (данный генотип имеет неполное доминирование, при этом синтезируется бета-лактоглобулиновый белок, характеризующийся промежуточными свойствами и сочетающий свойства вариантов *A* и *B* белков бета-лактоглобулина), 60 коров – генотип *BB* (отвечает за экспрессию белка *B* бета-лактоглобулина). Частота гомозиготного генотипа *AA* составила 15,8%, гетерозиготного генотипа *AB* – 46,2%, гомозиготного генотипа *BB* – 38,0%. Частота аллеля *A* достигла 0,39, аллеля *B* – 0,61 (табл. 1).

Таблица 1

Полиморфизм гена бета-лактоглобулина у коров

Хозяйство	n	<i>BB</i>		<i>AB</i>		<i>AA</i>		Частота аллелей		$\chi^2$
		n	%	n	%	n	%	A	B	
ООО «Дусым»	Н	60	38,0	73	46,2	25	15,8	0,39	0,61	0,11
	О	59	37,3	75	47,5	24	15,2			

Н – наблюдаемое распределение генотипов, О – ожидаемое распределение генотипов.

Таким образом, использование статистического метода Харди-Вайнберга и метода  $\chi^2$  для выявления отклонений эмпирического распределения частот генотипов у коров от теоретического позволили установить, что в популяции крупного рогатого скота ООО «Дусым» нет статистически достоверного сдвига генетического равновесия ни по одному из трех генотипов локуса гена бета-лактоглобулина. Эти данные в популяции черно-пестро х голштинских коров показывают, что в ней не проводится искусственный отбор, затрагивающий генотипы животных по локусу гена бета-лактоглобулина.

#### 3.6.2. Полиморфизм гена бета-лактоглобулина у быков-производителей

В результате исследований быков-производителей в ГУП ГПП «Элита» по локусу гена бета-лактоглобулина нами получены следующие данные, что из 70 быков-производителей 9 (12,9%) имели генотип *AA*; 26 (37,1%) – генотип *AB* и 35 (50,0%) быков – генотип *BB* (табл. 2). При этом частота аллеля *A* составила 0,31, аллеля *B* – 0,69.

Таблица 2

**Полиморфизм гена бета-лактоглобулина у быков-производителей**

Хозяйство		n	BB		AB		AA		Частота аллелей		$\chi^2$
			n	%	n	%	n	%	A	B	
ГУП ГПП «Элита»	Н	70	35	50,0	26	37,1	9	12,9	0,31	0,69	1,23
	О		33	47,6	30	42,8	7	9,6			

Н – наблюдаемое распределение генотипов, О – ожидаемое распределение генотипов.

Использование статистического метода Харди-Вайнберга метод  $\chi^2$  позволило установить, что в данной популяции быков-производителей нет сдвига генетического равновесия ни по одному из трех генотипов локуса гена бета-лактоглобулина. Таким образом, в исследованной популяции быков-производителей не проводится искусственный отбор по локусу гена бета-лактоглобулина.

**3.6.3. Полиморфизм гена каппа-казеина у быков-производителей**

В результате ДНК-диагностики по локусу гена каппа-казеина быков-производителей нами было исследовано 70 голов, из них 48 (68,6%) имели генотип AA; 18 (25,7%) – AB и лишь 4 (5,7%) – BB. При этом частота аллеля A составила 0,81, а аллеля B – 0,19 (табл. 3).

Таблица 3

**Полиморфизм гена каппа-казеина быков-производителей**

Хозяйство		n	AA		AB		BB		Частота аллелей		$\chi^2$
			n	%	n	%	n	%	A	B	
ГУП ГПП «Элита»	Н	70	48	68,6	18	25,7	4	5,7	0,81	0,19	0,85
	О		46	65,6	21	30,8	3	3,6			

Н – наблюдаемое распределение генотипов, О – ожидаемое распределение генотипов

Статистический метод Харди-Вайнберга и метод  $\chi^2$  для выявления отклонений эмпирического распределения частот генотипов каппа-казеина от теоретического показал, что в данной популяции быков-производителей не имеется статистически достоверного сдвига генетического равновесия ни по одному из трех генотипов по локусу гена каппа-казеина. Следовательно, в данной популяции быков-производителей не проводится искусственный отбор, затрагивающий генотипы животных по локусу гена каппа-казеина.

**3.7. Молочная продуктивность коров с разными генотипами бета-лактоглобулина**

Данные таблицы 4 показывают, что разница между группами по продолжительности лактации была незначительная и составила 1-2 дня. При этом коровы, имеющие в своём генотипе A аллель в большей части превосходили аналогов с генотипом BB.

**Молочная продуктивность коров с разными генотипами  
бета-лактоглобулина**

Показатели	Генотипы			Разница	
	<i>BB</i>	<i>AB</i>	<i>AA</i>	<i>BB-AB</i>	<i>BB-AA</i>
п	60	73	25	-	-
дойных дней	296±1,9	294±1,7	297±1,9	+2	-1
удой, кг	3969±83,8	4273±84,9	4325±134,0	-304*	-356*
жир, %	3,85±0,03	3,83±0,02	3,84±0,03	+0,02	+0,01
молочный жир, кг	152,8±3,14	163,7±3,33	166,1±5,33	-10,9*	-13,3*
белок, %	3,19±0,01	3,22±0,01	3,24±0,01	-0,03*	-0,05***
молочный белок, кг	126,6±2,72	137,6±2,73	140,1±4,31	-11,0**	-13,5**
интенсивность молокоотдачи, кг/мин.	1,81±0,02	1,83±0,03	1,84±0,02	-0,02	-0,03
удой на 1 день лактации, кг	13,4±0,28	14,5±0,30	14,6±0,42	-1,1**	-1,2*

\* –  $P<0,05$ ; \*\* –  $P<0,01$ ; \*\*\* –  $P<0,001$ .

В среднем удой коров за лактацию в группе животных с генотипом бета-лактоглобулина *BB* составил 3969 кг, *AB* – 4273 кг, *AA* – 4325 кг. Коровы с генотипом бета-лактоглобулина *BB* уступали сверстницам на 304-356 кг ( $P<0,05$ ) молока.

По содержанию жира в молоке коровы с гомозиготным генотипом бета-лактоглобулина *BB* незначительно превосходили аналогов, имеющих в геноме аллельный вариант *A* в гетерозиготной и гомозиготной форме на 0,01-0,02%. При этом от животных, имеющих аллель *A* бета-лактоглобулина получено в среднем за лактацию на 11,0-13,5 кг ( $P<0,05$ ) молочного жира больше, чем от коров с генотипом *BB*.

Полученные результаты также показали, что коровы с генотипом *AB* и *AA* превосходили по содержанию белка в молоке животных с гомозиготным генотипом *BB* на 0,03- 0,05% ( $P<0,05$  и 0,001). От коров, несущим в своем геноме аллель *A* в сравнении с аналогами *BB* было получено за лактацию на 11,0-13,5 кг ( $P<0,01$ ) молочного белка больше, чем от коров с гомозиготным генотипом бета-лактоглобулина *BB*. Как по содержанию белка, так и по выходу молочного белка за лактацию коровы с генотипом *AB* занимали промежуточное положение.

Животные с генотипом бета-лактоглобулина *BB* уступали животным других генотипов по удою на 1 день лактации и по интенсивности молокоотдачи, при этом разница по удою на 1 день лактации была достоверной.

Таким образом, более высокую молочную продуктивность имели коровы с генотипом бета-лактоглобулина *AB* и *AA*. При этом животные с генотипом *BB* незначительно превосходили своих сверстниц по содержанию жира в молоке.

### 3.8. Качество и технологические свойства молока коров с разными генотипами бета-лактоглобулина

#### 3.8.1. Состав молока и его физико-химические показатели у коров с разными генотипами бета-лактоглобулина

При изготовлении белкомолочных продуктов, в особенности сыра, к молоку как сырью предъявляются повышенные требования. Молоко от коров с разными генотипами бета-лактоглобулина было 100% пригодное для производства сыра, то есть по качеству I сорта, с механической загрязненностью I группы и бактериальной обсемененностью I класса. Молоко, производимое в ООО «Дусым», по качеству и содержанию основных компонентов значительно превосходило требования ГОСТа 13264-70.

Анализ физико-химического состава молока сравниваемых групп животных позволил выявить определенные различия по некоторым показателям. Из данных таблиц 5 видно, что коровы с генотипом бета-лактоглобулина *AB* и *AA* имели более высокие показатели содержания сухого вещества (СВ) в молоке (12,51 и 12,47%) и содержания СОМО (8,68% и 8,63%). При этом животные с генотипом *AB* и *AA* превосходили коров с генотипом *BB* по содержанию сухих веществ в молоке и СОМО на 0,02-0,06% и 0,03-0,08% соответственно.

Наибольшим содержанием основных компонентов в молоке характеризовались коровы, несущие в своем генотипе *A* аллель бета-лактоглобулина, при этом у таких животных содержание компонентов в молоке составило: белка (3,22-3,24%) и лактозы (4,49-4,51%). Наименьшее значение этих показателей наблюдалось у коров с генотипом *BB*, а именно белка – 3,19% и лактозы – 4,47%. Группа животных с генотипом *BB* уступала сверстницам других групп по белку - 0,03-0,05% ( $P < 0,05$  и  $0,001$ ) и по лактозе – 0,02-0,04%. Межгрупповые различия животных с разными генотипами бета-лактоглобулина по содержанию жира в молоке были незначительными. Наибольшие показатели содержания жира в молоке имели коровы с генотипом *BB* – 3,85%, а наименьшие животные с генотипом *AA* – 3,83%, тогда как животные с генотипом *AB* имели промежуточные показатели – 3,84%.

Коровы несущие в своем геноме аллельный вариант *A* гена бета-лактоглобулина имели незначительное превосходство по показателям плотности молока коров с генотипом *BB* на 0,4-0,6°А. Причем достоверная разница по плотности молока выявлена между группами животных с генотипом *BB* и *AB* – 0,6°А ( $P < 0,01$ ).

В молоке коров с гомозиготным генотипом каппа-казеина *BB* наблюдался более высокий показатель титруемой кислотности – 18,19°Т. Животные с генотипом *BB* превосходили по этому показателю аналогов с генотипом *AB* и *AA* на 0,04-0,12°Т.

**Химический состав и физико-химические показатели молока коров  
с разными генотипами бета-лактоглобулина**

Показатели	Генотипы			Разница	
	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>BB-AB</i>	<i>BB-AA</i>
n	60	73	25	-	-
сухое вещество, %	12,45±0,06	12,51±0,04	12,47±0,07	-0,06	-0,02
СОМО, %	8,60±0,04	8,68±0,04	8,63±0,06	-0,08	-0,03
содержание жира, %	3,85±0,03	3,83±0,02	3,84±0,03	+0,02	+0,01
содержание белка, %	3,19±0,01	3,22±0,01	3,24±0,01	-0,03*	-0,05***
содержание лактозы, %	4,47±0,02	4,51±0,02	4,49±0,03	-0,04	-0,02
плотность, °А	27,5±0,13	28,1±0,15	27,9±0,24	-0,6**	-0,4
титруемая кислотность, °Т	18,19±0,09	18,07±0,12	18,15±0,19	+0,12	+0,04

\* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ .

Таким образом, общий анализ качества и состава товарного молока от коров с разными генотипами по гену бета-лактоглобулина показал, что молоко из ООО «Дусым» высокого качества с содержанием основных компонентов, значительно превышающим требования ГОСТа 13264-70. При этом молоко наилучшего качества у животных несущим в своём геноме аллельный вариант *A* гена бета-лактоглобулина.

### 3.8.2. Сыропригодность молока коров с разными генотипами бета-лактоглобулина

Исследованиями установлено, что генотип коров по гену бета-лактоглобулина оказывает определенное влияние, как на состояние казеинового сгустка, так и на продолжительность свертывания молока. Во всех группах коров выявлена отрицательная зависимость технологических свойств молока от аллель *A* бета-лактоглобулина. От молока 42,5-48,0% коров с генотипом *AB* и *AA* получен казеиновый сгусток рыхлого и дряблого состояния (табл. 6).

Присутствие *B* аллеля бета-лактоглобулина в генотипе животных значительно улучшило состояние казеинового сгустка. Доля молока с плотным состоянием сгустка у гомозиготных коров *BB* составила 80,0 %, гетерозиготных (*AB*) – 57,5%.

В сыроделии наиболее желательным считается молоко, у которого время свертывания под действием сычужного фермента длится в пределах 15-40 мин. Если свертывание длится более 40 мин, это приводит к большой потере сырья и низкому выходу сыра, так как нарушаются технологические процессы его производства. Лучшими показателями по продолжительности свертывания

характеризовались коровы с генотипом бета-лактоглобулина *BB*, у них свёртывание молока происходило за наименьшее время – 27,3 мин. У животных с генотипом *AA* эти показатели оказались несколько хуже и составили 29,8 мин.

**Таблица 6**

**Технологические свойства молока в зависимости от генотипа бета-лактоглобулина**

Показатели	Состояние казеинового сгустка и продолжительность свёртывания молока	Распределение коров		В том числе с генотипом по бета-лактоглобулину					
				<i>BB</i>		<i>AB</i>		<i>AA</i>	
		n	%	n	%	n	%	n	%
n=158	плотное	103	65,2	48	80	42	57,5	13	52,0
	рыхлое	41	25,9	8	13,3	25	34,3	8	32,0
	дряблое	14	6,7	4	6,7	6	8,2	4	16,0
	время, мин	28,5±0,59		27,3±0,92		29,1±0,95		29,8±1,11	

Таким образом, исследования показали, что наилучшими сыродельческими свойствами молока обладали коровы с генотипом *BB* бета-лактоглобулина, у них наибольший выход желательного плотного сычужного сгустка и наименьшая продолжительность свёртывания молока. По этим показателям они превосходили животных с генотипом *AA*.

### 3.8.3. Термоустойчивость молока коров с разными генотипами бета-лактоглобулина

Исследованиями установлено, что молоко коров с генотипом *BB* бета-лактоглобулина характеризовалось пониженной термостабильностью – 52,7 мин, с генотипом *AA* – повышенной – 58,9 мин, а животные с генотипом *AB* имели промежуточный показатель – 57,4 мин (табл. 7).

**Таблица 7**

**Термостабильность молока коров с разными генотипами бета-лактоглобулина**

Показатели	Генотип бета-лактоглобулина		
	<i>BB</i>	<i>AB</i>	<i>AA</i>
n	60	73	25
Термостабильность молока, мин.	52,7±2,52	57,4±2,24	58,9±4,67

Таким образом, коровы, несущие в своём геноме аллельный вариант *A* гена бета-лактоглобулина превосходили аналогов с гомозиготным генотипом бета-лактоглобулина *BB* по термостабильности молока.

## ВЫВОДЫ

1. Аммиачный и комбинированный щелочной способ выделения нуклеиновых кислот, оптимизированные для экстракции ядерной ДНК из лейкоцитов и спермы крупного рогатого скота, являются эффективными приемами пробоподготовки ДНК для молекулярно-генетических исследований.

2. Оптимизированные протоколы ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по генам каппа-казеина и бета-лактоглобулина являются эффективными средствами ДНК-анализа аллельного полиморфизма. Разработанные способы проведения высокоточной и аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* гена каппа-казеина с оптимизированной техникой 2-х стадийной ПЦР являются надежными подходами эффективной наработки специфичных ампликонов, обеспечивающими экономичную по времени процедуру идентификации искомым генотипов *AA*, *AB* и *BB*.

3. Методом ПЦР-анализа в стаде коров ООО «Дусым» выявлено три генотипа по локусу гена бета-лактоглобулина – *BB*, *AB* и *AA*. Частота встречаемости аллеля *B* составила 0,61, аллеля *A* – 0,39. У быков-производителей ГУП ГПП «Элита» выявлено три генотипа по локусу гена бета-лактоглобулина – *AA*, *AB* и *BB*. Частота встречаемости аллеля *B* составила 0,69, аллеля *A* – 0,31. У быков-производителей ГУП ГПП «Элита» выявлено три генотипа по локусу гена каппа-казеина – *AA*, *AB* и *BB*. Частота встречаемости аллеля *B* составила 0,19, аллеля *A* – 0,81.

4. Молоко коров с генотипом *BB* гена бета-лактоглобулина содержало меньше белка, чем молоко коров с генотипом *AA* и *AB* на 0,05% и 0,03% ( $P < 0,001$  и 0,05), соответственно. Выход молочного жира из молока коров с генотипом *BB* гена бета-лактоглобулина был меньше, чем из молока коров с генотипами *AA* и *AB* на 10,9 кг и 13,3 кг ( $P < 0,05$ ), соответственно; молочного белка на 13,5 кг и 11,0 кг ( $P < 0,01$ ), соответственно.

5. Молоко коров несущих в своем геноме *B* аллель гена бета-лактоглобулина имело наибольший выход желательного плотного сычужного сгустка (80%) и наименьшую продолжительность коагуляции (27,3 мин). При этом наибольшей способностью выдерживать высокотемпературное воздействие (58,9 мин) обладает молоко коров, имеющих в своем геноме *A*-аллель бета-лактоглобулина.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для получения достоверной информации о генах-маркерах молочной продуктивности – бета-лактоглобулина и каппа-казеина крупного рогатого скота рекомендуется проводить процедуру генотипирования методами ДНК технологий с использованием оптимизированных технических приемов пробоподготовки нуклеиновых кислот и ПЦР-ПДРФ-анализа.

2. Для повышения экспрессивности теста рекомендуется использовать разработанные способы проведения высокоточной и аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* гена каппа-казеина с оптимизированной техникой 2-х стадийной ПЦР.

**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Ахметов, Т.М. Разработка способа высокоспецифичной ПЦР / Т.М. Ахметов, Э.Ф. Валиуллина, О.Г. Зарипов, Р.Р. Вафин // Вестник КГАУ. – 2006. – №3. – С. 33-37.
2. Ахметов, Т.М. Термоустойчивость молока коров с разными генотипами каппа-казеина / Т.М. Ахметов, С.В. Тюлькин, О.Г. Зарипов, Э.Ф. Валиуллина // Ученые записки КГАВМ. – 2008. – Т. 193. – С. 31-34.
3. Ахметов, Т.М. Белковый состав молока коров с разными генотипами каппа-казеина / Т.М. Ахметов, С.В. Тюлькин, О.Г. Зарипов // Ученые записки КГАВМ. – 2008. – Т. 193. – С. 35-40.
4. Зарипов, О.Г. Изменчивость признаков молочной продуктивности у коров с разными генотипами каппа-казеина / О.Г. Зарипов // Ученые записки КГАВМ. – 2008. – Т. 193. – С. 100-104.
5. Вафин, Р.Р. Разработка методики высокоточной ПЦР / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Р.Р. Вафин, И.Х. Бакиров, Т.М. Ахметов, О.Г. Зарипов, Э.Ф. Валиуллина // Ветеринарная практика. – 2006/2007. – Т. 35. – № 4. – С. 15-22.
6. Вафин, Р.Р. Оптимизация способов генотипирования крупного рогатого скота по гену каппа-казеина / Р.Р. Вафин, Т.М. Ахметов, Э.Ф. Валиуллина, О.Г. Зарипов, С.В. Тюлькин // Ветеринарная практика. – 2007. – Т. 37. – № 2. – С. 54-59.
7. Валиуллина, Э.Ф. Характеристика быков производителей с различными комбинациями генотипов каппа-казеина, бета-лактоглобулина по молочной продуктивности их матерей / Э.Ф. Валиуллина, О.Г. Зарипов, С.В. Тюлькин, Т.М. Ахметов, Р.Р. Вафин // Ветеринарная практика. – 2007. – Т. 39. – № 4. – С. 59-64.
8. Ахметов, Т.М. Качество и технологические свойства сыра, изготовленного из молока коров с разными генотипами каппа-казеина / Т.М. Ахметов, С.В. Тюлькин, О.Г. Зарипов, Э.Ф. Валиуллина, Р.Р. Вафин // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2009. – Т. 1. – № 1. – С. 20-23.
9. Ахметов, Т.М. Характеристика быков производителей с различными генотипами бета лактоглобулина по молочной продуктивности их матерей / Т.М. Ахметов, О.Г. Зарипов, С.В. Тюлькин, Э.Ф. Валиуллина // Материалы всероссийской научно-практической конференции «Технологические и технические аспекты развития сельского хозяйства», посвященной 85-летию КГАУ. – Казань, 2007. – Т. 74. – Ч. 3-4. – С. 7-10.
10. Вафин, Р.Р. Способ проведения аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям А и В гена каппа-казеина. Патент на изобретение РФ № 2337141 / Р.Р. Вафин, Т.М. Ахметов, Э.Ф. Валиуллина, О.Г. Зарипов, Р.Р. Вафин // Официальный бюллетень «Изобретения. Полезные модели». – опубликовано 27.10.2008. – Бюл. № 30.