

## АДАПТАЦИЯ МЕТОДИКИ ДНК-ДИАГНОСТИКИ ГЕНА БЕТА-КАЗЕИНА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА БЕЛОРУССКОЙ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ

*В.В. Николаева, 1курс*

*Е.С. Сильченко, магистр прикладной биотехнологии*

*Е.И. Приловская, ассистент*

*Научный руководитель – Н.А. Глинская, к.с.-х.н., доцент*

*Полесский государственный университет*

Скотоводство – ведущая отрасль животноводства в Беларуси, в которой важное значение имеет не только высокая молочность коров, но и качественный состав полученного молока, т.е. содержание в нём жира, белка и других фракций [1, с. 27,3 с. 47].

Достижения современной молекулярной генетики позволяют определять гены, контролируемые хозяйственно-полезные признаки. Применение ДНК-маркеров дает возможность значительно повысить генетический потенциал животных, осуществлять направленное разведение предпочтительных генотипов, ускорить процесс селекции КРС молочного направления продуктивности на повышение хозяйственно-полезных качеств [2, с. 312].

В качестве маркера молочной продуктивности был выбран ген бета-казеина (CSN2), который является одним из основных молочных белков и членом казеинового кластера.

Исследования были проведены в отраслевой лаборатории ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве на базе УО «Полесский государственный университет».

В качестве биологического материала использовали ткань (выщип уха) 100 животных белорусской черно-пестрой породы, разводимых в филиале ОАО «Лунинецкий молочный завод» Брестской области. В процессе отработки режимов использовался свежий материал.

Лабораторно адаптирована амплификация в объеме 14,5 мкл реакционной смеси, в составе: 100 нг выделенной ДНК; 3 мМ – Mg<sup>2+</sup>; 1,4 мМ – дНТФ(mix); 1X – буфер (с KCl); 20 пМ – прямой праймер; 20 пМ – обратный праймер; 2,5 е.а. – Taq-полимеразы; H<sub>2</sub>O – до 14,5 мкл.

При подборе оптимальных условий было обращено особое внимание на экстрагирование ДНК, которое проводилось перхлоратным методом с двойной очисткой.

Для успешного проведения ПЦР были подобраны праймеры так, чтобы фрагмент между ними включал в себя сайты узнавания для A1 и A2 аллельных вариантов гена бета-казеина. Были использованы следующие последовательности прямого и обратного праймеров:

прямой праймер (F): CSN2:5'–  
 GAGTCGACTGCAGATTTTCAACATCAGTGAGAGTCAGGCCCTG- 3';

обратный праймер (R): CSN2:5' –  
 CCTGCAGAATTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCG - 3'.

Выбор праймеров был обусловлен меньшим числом фрагментов, получаемых при рестрикционном анализе, а, следовательно, более удобной идентификацией генотипов. Оптимальная концентрация праймеров была подобрана в серии тестов и составила 20пМ/мкл.

Для оптимизации условий ПЦР определяющей является концентрация ионов магния. Она влияет как на специфичность, так и на выход продуктов реакции, оказывая воздействие на целый ряд процессов: диссоциацию цепей матрицы и продуктов ПЦР, отжиг праймеров, специфичность продуктов ПЦР, образование димеров праймеров, активность фермента и точность синтеза. Стандартная концентрация в 1 х буфере для ПЦР составляет 1,5 мМ. При использовании праймеров CSN2-1 и CSN2-2 реакция амплификации фрагмента гена проходила более успешно при концентрации ионов магния 3мМ.

Смесь 4-х дезоксирибонуклеотидтрифосфатов служит материалом, из которого в процессе ПЦР синтезируются цепи ДНК. Стандартной является концентрация 2 мМ (по 0,5 мМ каждого), в наших условиях оказалось достаточным 1,4 мМдНТФ (mix).

При подборе концентрации Taq-полимеразы (стандартная концентрация 1е.а. на реакцию) мы учитывали метод выделения ДНК (перхлоратный с двойной очисткой (по методу Зиновьевой)) и концентрацию фермента для каждого праймера. Для наших условий оптимальным явилось использование Taq-полимеразы в концентрации 2.5е.а. на реакцию.

Также с целью экономии реагентов мы перешли от реакционного объема 25мкл к реакционному объему 14.5мкл без ущерба для эффективности ПЦР. При этом выход амплификата не снижался.

Проведение реакции амплификации по гену бета-казеина (CSN2) проводили на автоматическом термоциклере (амплификаторе) типа Biometra используя следующую программу режима ПЦР: горячий старт – 94<sup>0</sup>С – 5 мин; денатурация – 94<sup>0</sup>С – 1 мин; отжиг – 65<sup>0</sup>С – 1 мин; синтез – 72<sup>0</sup>С – 1 мин (35 циклов); элонгация – 72<sup>0</sup>С – 10 мин.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали в 1,5%-ном агарозном геле при напряжении V=110 в течение 35 мин. Длина амплификационного фрагмента гена CSN2– 251 п.н.

Для рестрикции амплификационного участка генаCSN2 использовали, эндонуклеазу *TaqI*. Рестрикцию проводили в термостате при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 1,5 часа. Детекцию результатов рестрикции проводили в 3%-ном агарозном геле, V=130, 60 мин.

При расщеплении продуктов амплификации по гену CSN2 идентифицировались следующие генотипы: CSN2<sup>A2A2</sup> – фрагмент 251 п.н.; CSN2<sup>A1A2</sup> – фрагменты 251, 213п.н.; CSN2<sup>A1A1</sup> – фрагменты 213, 38 п.н.

В результате исследований адаптирована методика проведения ПЦР анализа для генотипирования крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы по гену CSN2.

#### **Список использованных источников**

1. Валитов Ф.Р., Давлетова Л.Ф. Полиморфизм гена бета-казеина коров плановых пород Республики Башкортостан / Ф.Р.Валитов, Л.Ф.Давлетова //Аграрная наука в инновационном развитии АПК: материалы Международнойнаучно-практической конференции в рамках XXVI Международнойспециализированной выставки. «Агрокомплекс-2016». – Ч. II. – Уфа, 2016.– С. 27–30.

2. Identification of alleles and genotypes of beta-casein with DNA sequencing analysis in Chinese Holstein cow / Dai, R. [et all] // J Dairy Res. – 2016.– Т. 83. – С. 312–316.

3. Характеристика российских молочных пород крупнорогатого скота по встречаемости генотипов аллелей в локусе бета-казеина / Марзанов Н.С. [и др.] // Ветеринария. Зоотехния. Биотехнология. – 2020. – №1. – С. 47–52.