

УДК 636.01;599.735.31;575

## НОВЫЕ СОЧЕТАНИЯ АЛЛЕЛЕЙ В ВАРИАНТАХ ГЕНОВ КАЗЕИНОВОГО КЛАСТЕРА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И РЕВИЗИЯ ИХ НОМЕНКЛАТУРЫ

© 2022 г. С. Б. Кузнецов<sup>1</sup>\*, Е. В. Солоднева<sup>1</sup>, М. Т. Семина<sup>1</sup>, С. В. Бекетов<sup>1</sup>,  
И. С. Турбина<sup>2</sup>, Ю. А. Столповский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>АО «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных»,  
Московская область, г. Подольск, п. Быково, 142143 Россия

\*e-mail: sergei\_kuznetsov@yahoo.com

Поступила в редакцию 01.03.2022 г.

После доработки 14.03.2022 г.

Принята к публикации 15.03.2022 г.

Проведен детальный анализ геномов крупного рогатого скота по четырем генам казеинового кластера, находящегося на шестой хромосоме крупного рогатого скота: *CSN1S1* – альфа-казеин S1, *CSN1S2* – альфа-казеин S2, *CSN2* – бета-казеин и *CSN3* – каппа-казеин. Исследованы генотипы 49 быков-производителей костромской, голштино-фризской пород и межпородных гибридов зебу с черно-пестрым скотом. Анализ проведен с помощью метода ПЦР в реальном времени, что позволило генотипировать образцы ДНК с предельной точностью. В процессе разработки праймеров была уточнена номенклатура всех четырех генов, которая приведена к единому принципу обозначения позиций аминокислот в белках, кодируемых вышеуказанными генами. Обнаружены новые сочетания маркеров (SNP) в общепризнанных аллелях у генов казеинов. Из всех исследованных животных нет ни одного, чей генотип полностью бы соответствовал гомозиготному или гетерозиготному вариантам общепринятой номенклатуры. В обнаруженных генотипах сочетаются аллели из более чем двух вариантов. Таким образом, данные генотипы невозможно описать как гомо- или гетерозиготные по выявленным аллельным вариантам. Обнаруженное явление вероятно не является уникальным, так как, как правило, при рутинном анализе генов казеинов тестируются несколько аллельных вариантов, связанных с сыропригодностью молока, и не учитывается в полном объеме имеющийся полиморфизм казеинового кластера, показанный в данном исследовании.

**Ключевые слова:** гены казеинового кластера, крупный рогатый скот, ПЦР в реальном времени, SNP.

**DOI:** 10.31857/S0016675822080057

Более 95% всех белков коровьего молока кодируются шестью высоко полиморфными генами, для которых описаны несинонимичные и синонимичные мутации, формирующие в итоге до 50 идентифицируемых вариантов белков. Эти варианты были использованы для генетико-селекционного анализа более 40 лет назад, что привело к выявлению кластера казеиновых генов, расположенного на шестой хромосоме крупного рогатого скота [1, 2]. Этот кластер, который называют CN-локус, состоит из четырех генов: *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* и *CSN3*, кодирующих казеины коровьего молока:  $\alpha$ 1-CN,  $\beta$ -CN,  $\alpha$ 2-CN и  $\kappa$ -CN соответственно [3]. Среди жвачных животных гены молочных казеинов и их изменчивость наиболее тщательно изучены у крупного рогатого скота и коз. Важным фактом широкого генетического разнообразия является то, что различные вариан-

ты казеинов влияют на состав молока и его сыродельные свойства [3–5].

Исследования генетической изменчивости молочных белков начались более 50 лет назад после обнаружения основных вариантов белка бета-лактоглобулина ( $\beta$ -LG) крупного рогатого скота и продолжились в последующие годы после открытия полиморфизма в других молочных белках. В процессе накопления данных обнаружены и различия между одомашненными видами рода *Bos* и породами крупного рогатого скота [6]. Выявленные генетические варианты являются следствием однонуклеотидных замен (SNP), а также инсерций и делеций различной протяженности. В 2004 г. был сделан обзор полиморфизма молочных белков, где была предложена номенклатура мутаций в генах [7]. Для рода *Bos* в ней перечислены восемь аллелей  $\alpha$ 1-CN (A, B, C, D, E, F, G,

Н), четыре аллеля  $\alpha$ s2-CN (A, B, C, D), 12 аллелей  $\beta$ -CN (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I), 11 аллелей  $\kappa$ -CN (A, B, C, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J), 11 аллелей  $\beta$ -LG (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W). Номенклатура унифицирована для четырех видов рода *Bos*, т.е. *Bos taurus* (домашняя корова), *Bos indicus* (зебу), *Bos grunniens* (як) и *Bos javanicus* (бантенг Бали). В данном обзоре рассматривается полиморфизм белков, а именно мутации в генах, изменяющие аминокислотные последовательности кодируемого белка. Однако в эти номенклатуры включены и некоторые мутации, которые не изменяют аминокислотную последовательность белков. В последующем номенклатуры, предложенные в обзоре, дополнялись и изменялись из-за открытия новых генетических вариантов в генах, кодирующих молочные белки. Так, в обзоре 2009 г. упоминаются девять аллельных вариантов для *CSN1S1* и 14 аллелей для *CSN3* [8]. Необходимо напомнить, что за каждым аллельным вариантом белка скрывается комбинация из однонуклеотидных замен или инсерций/делеций в кодирующей части гена этого белка. В гене *CSN3* описаны как значимые 14 однонуклеотидных замен, так и различные комбинации этих мутаций, которые составляют упомянутые 14 аллелей белка  $\kappa$ -казеина. Для гена *CSN1S2* описаны 10 мутаций, которые в различных сочетаниях определяют 12 аллельных вариантов белка  $\beta$ -казеина. Для остальных белков молока ситуация аналогична. Следует сказать, что большинство аллельных вариантов белков были описаны достаточно давно, и ученые, описавшие их, пользовались методами белкового анализа: электрофорез в крахмальном или полиакриламидном гелях, изоэлектрофокусирование, хроматография [9, 10]. Безусловно, методы анализа ДНК придали новый импульс исследованиям полиморфизма белков коровьего молока, что позволяет идентифицировать известные варианты белка на уровне генома различными методами, такими как ПЦР-ПДРФ для *CSN3* [11–13], непосредственное секвенирование *CSN3* [14], аллель-специфичная ПЦР для *CSN2* [15] и *CSN1S1* [16] и одноцепочечный ПЦР-конформационный полиморфизм *CSN2* [17]. Полиморфизм молочных белков, в частности казеинов, может предоставить полезную информацию для идентификации особи в официальной системе учета молока путем индивидуального молока с помощью IEF — изоэлектрофокусирования [18]. Эти мутации также можно использовать как генетические маркеры для установления проверки отцовства. Для последнего применимы методы высокопроизводительного анализа, один из которых ДНК-микрочиповая технология, которая может привести к широкомасштабному генотипированию животных по всем мутациям (SNP) в генах молочных белков [19].

Один из самых значимых эффектов полиморфизма молочных белков, связанных с экономиче-

ским интересом, — это его связь с сыродельными свойствами молока, этот эффект в основном исследовался на крупном рогатом скоте [5]. Исследования в основном сконцентрировались на влиянии вариантов каппа-казеина ( $\kappa$ -CN) на реологические свойства молока. Каппа-казеин располагает преимущественно на поверхности белковых мицелл в свежем молоке и является специфическим субстратом химозина (основного фермента сычужного комплекса ферментов), гидролитическая активность которого расщепляет  $\kappa$ -CN на нерастворимый пара- $\kappa$ -CN (аминокислоты 1–105) и растворимый казеиномакропептид (CMP) — аминокислоты 106–171. Это важный процесс для производства сыра, а также для питания телят [20]. Хорошо известно, что молоко с аллельным вариантом *CSN3-B* быстрее реагирует с сычужным ферментом и время коагуляции молока значительно короче, чем у молока с вариантом *CSN3-A*, тогда как молоко от гетерозиготных коров *CSN3-AB* показывает промежуточное время коагуляции [21]. Различия в стабильности мицелл, которые возникают между двумя генетическими вариантами *CSN3-A* и *CSN3-B*, строго связаны с размером мицелл и степени гликозилирования самого белка [5]. Однако менее распространенные аллели *CSN3* также могут влиять на реологические свойства молока. Постоянный мониторинг вариаций молочного белка у разных пород крупного рогатого скота — важная практика в молочном животноводстве, направленная на то, чтобы избежать увеличения частоты аллельных вариантов с неблагоприятным влиянием на сыродельческие свойства молока. Хотя каппа-казеин является основным белком, определяющим сыропригодность молока, варианты бета-казеина *CSN2-B* и лактоглобулина *LGB-B* оказались также более благоприятными для сычужного фермента, коагуляции и сыропригодности молока [5]. Поэтому составные генотипы молочных казеинов CN [22, 23] также считаются важными в этом смысле из-за тесной генетической связи между генами, кодирующими все молочные казеины. Например, для времени свертывания и плотности сгустка лучшими составными генотипами *CSN2–CSN3* являются те, у которых есть хотя бы один аллель *B* в обоих локусах [23]. В обзоре [24] описаны варианты альфа-казеина *CSN1S1*, которые также оказывают влияние на реологические свойства молока, увеличение плотности сгустка при производстве сыра и увеличение общего количества этого белка в молоке.

В 2009 г. Нильсен с соавт. создали карту SNP высокого разрешения казеинового кластера крупного рогатого скота для изучения ассоциаций гаплотипов с качественными характеристиками молока у красной норвежской породы КРС и предложили разделить кластер казеинов на два блока гаплотипов, один из которых состоит из *CSN1S1*, *CSN2* и *CSN1S2*, а второй из *CSN3* [25]. В первом блоке

гаплотипов CSN1S1–CSN2–CSN1S2 были обнаружены статистически значимые ассоциации как с качеством и количеством белков, так и с удоем. Напротив, значимой ассоциации с такими показателями в блоке CSN3 обнаружено не было.

Исследования казеинового кластера на хромосоме 6 крупного рогатого скота подтверждают важность учета всего гаплотипа входящих в него генов для стратегий разведения. Эффекты мутаций или SNP в кластере казеиновых генов, определенные разными авторами у разных пород, иногда противоречат друг другу [25], подобно сканированию QTL хромосомы 6 [26]. Объяснение таких противоречивых результатов может заключаться в том, что гаплотип уравнивает каким-то до сих пор неизвестным образом ограничения, налагаемые естественным и/или искусственным отбором в области ДНК, несущей четыре гена казеинов, которые необходимы как для выживания новорожденных телят, так и для целей разведения. Будущее использование геномной селекции в молочном животноводстве должно будет учитывать не только информацию об отдельных SNP, но и определенные “горячие” зоны генома животных, такие как казеиновый кластер, в которых взаимодействия между кодирующими и не кодирующими последовательностями могут сильно влиять на общую экспрессию генов.

Общепринятая практика генотипирования молочного скота по казеиновым генам ограничивается анализом только CSN2 и CSN3 генов, а в них анализируют чаще всего только маркеры, различающие А- и В-аллели, поскольку считается, что аллель В в обоих генах делает молоко более сыропригодным. В гене бета-казеина таких маркеров три, в гене каппа-казеина – два основных и один дополнительный, чтобы различить аллель В и аллель J. Остальные маркеры и состоящие из них аллели считаются редкими, по крайней мере в европейских и американских промышленных породах КРС. В настоящей работе мы проанализировали гены CSN1S1, CSN1S2, CSN2 и CSN3 по всем описанным для них однонуклеотидным заменам, для которых показано влияние на качество молока.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе мы использовали образцы ДНК от 49 быков-производителей: костромской породы – 14 образцов, голштино-фризской породы – четыре образца и смешанной группы от скрещивания четырех пород зебу, черно-пестрого скота и голштино-фризов – 31 образец. Образцы спермы быков костромской и голштино-фризской породы были получены из Акционерного общества “Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных” (АО “ГЦВ”), п. Быково Московской области; образцы крови от быков смешанного происхождения были получены из

Государственного унитарного предприятия “Научно-экспериментальное хозяйство “Снегири” Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина Российской академии наук.

### Выделение ДНК и ПЦР

Из всех образцов ДНК выделяли колоночным методом с помощью наборов от компании “Евроген”, после выделения концентрацию и качество ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., США) и выравнивали концентрацию всех образцов.

Анализировали ДНК методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе LightCycler®96 SW 1.1 (Roche) при условиях: один цикл – 3 мин при 95°C, 55 циклов: 95°C – 15 с, 55°C – 15 с, 72°C – 20 с, с последующим анализом пиков плавления полученных ампликонов. В реакционную смесь добавляли интеркалирующий краситель EvaGreen. Генотипировали образцы с помощью праймеров, подобранных к генетическим маркерам (мутациям) четырех генов, кодирующих казеины молока: CSN1S1 – ген альфа-казеина S1, CSN1S2 – ген альфа-казеина S2, CSN2 – ген бета-казеина и CSN3 – ген каппа-казеина. Образец считался гомозиготным по конкретному маркеру (SNP), если график одного из аллелей выходил не менее чем на пять циклов раньше графика второго аллеля или график второго аллеля вообще не выходил (рис. 1, в). Примеры других графиков показаны на рис. 1, а, б.

Образец считался гетерозиготным, если графики обоих аллелей выходили одновременно или с разницей в один цикл. Пример таких графиков показан на рис. 2. Все образцы были генотипированы 2 раза, а в некоторых спорных случаях 3 раза.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Ген CSN1S1

В своем обзоре Фаррелл с соавт. [7], а вслед за ними и Кароли с соавт. [8] приводят аллельные варианты гена CSN1S1, которые можно увидеть в табл. 1. В обзоре Кароли приводится номер референсной последовательности этого гена – GenBank No. X59856. Поскольку номера нуклеотидных и аминокислотных замен в ее обзоре совпадают с таковыми у Фаррелла, он, вероятно, использовал ту же последовательность. И эта последовательность для В-аллеля (варианта) этого гена. В первом столбце табл. 1 приведены номера нуклеотидов полной последовательности гена, которые изменились в разных аллелях, и ниже – номера аминокислот белковой последовательности, которые были изменены. Когда мы стали сравнивать номера аминокислот в таблице с номерами в аминокислотной последовательности (рис. 3), то ами-

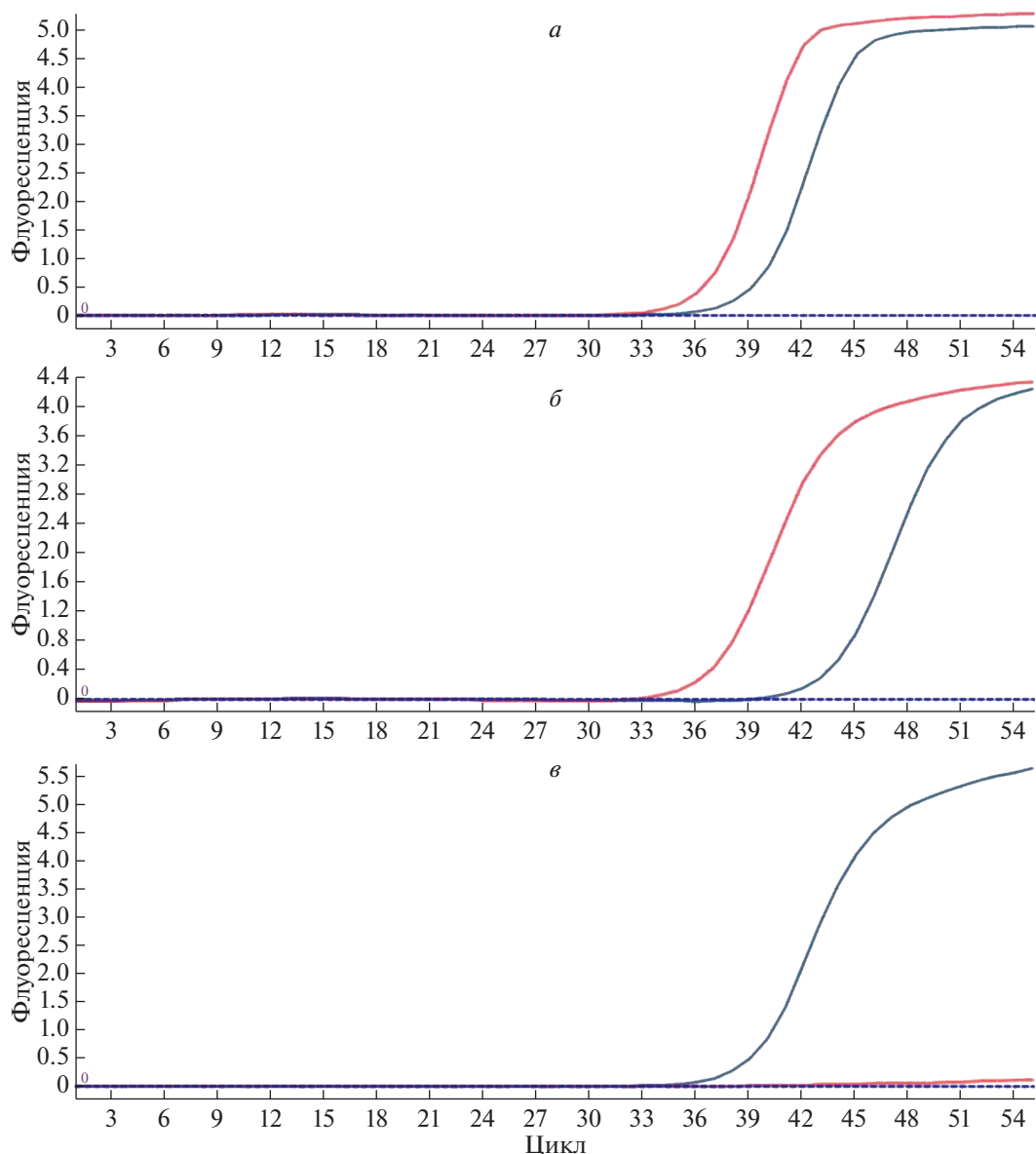


Рис. 1. Примеры графиков гомозиготных образцов ДНК по одному из маркеров. Объяснение в тексте.

нокислоты в таблице и в последовательности не совпадали, пока мы не выяснили, что авторы вели отсчет аминокислот не от метионина в 1-й позиции, а от аланина в 15-й позиции. Фаррелл и соавт. [7] в своем обзоре упоминают: “Сигнальный пептид  $\alpha$ S1-CN состоит из 15 аминокислотных остатков, составляющих преформу  $\alpha$ S1-CN 214 аминокислот в длину”, возможно поэтому они вели отсчет с 15-го аминокислотного остатка, хотя в абсолютном большинстве случаев нумерация аминокислот в современной литературе начинается от первого метионина. В своих работах по генотипированию различных признаков у КРС нам нередко приходилось сталкиваться с подобными разночтениями у разных авторов номеров аминокислот

одних и тех же белков, что вызывало определенные трудности при подборе аллель-специфичных праймеров для генотипирования. Поэтому мы приводим в таблицах с номенклатурами вариантов генов исправленные номера аминокислот.

Кроме того, и у Фаррелла, и у Кароли в таблицах аллельных вариантов гена *CSN1S1* не показана мутация для варианта G. Поле для этого аллеля осталось пустым без объяснений в тексте. Нам удалось найти оригинальную статью с описанием этого аллельного варианта. Рандо с соавт. описывают эту мутацию как инсерцию между 58-м и 59-м нуклеотидами 19-го экзона [27]. По референсной последовательности GenBank No. X59856 это нук-

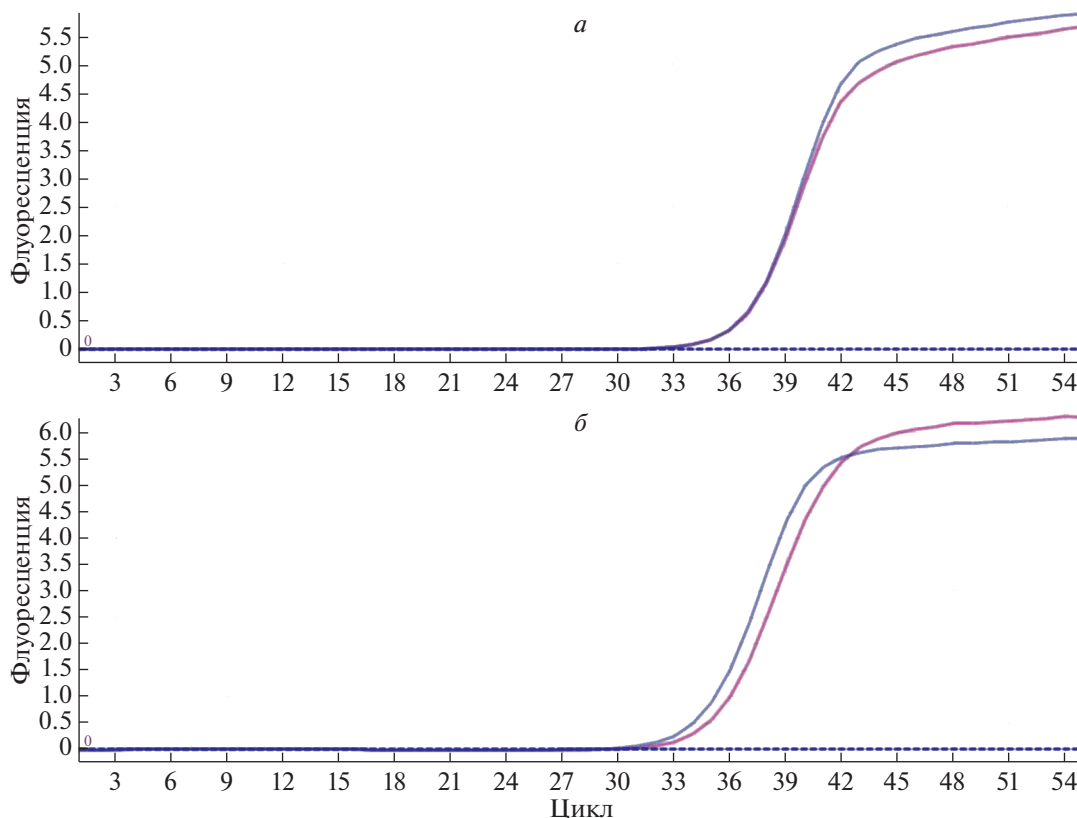


Рис. 2. Примеры графиков гетерозиготных образцов ДНК по одному из маркеров. Объяснение в тексте.

“MKLLILTCLVAVAL**A**RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFP  
 EVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESISSEEIVP  
 NSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYKVPQLEIVPNSA  
 EERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDA  
 YPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW”

Рис. 3. Пример аминокислотной последовательности белка, кодируемого геном *CSN1S1* (*Bos taurus CSN1S1* gene for alpha-S1-casein, GenBank: X59856.2). Красным выделен аланин в 15-й позиции. С другими генами казеинового кластера была аналогичная ситуация.

леотиды 27686 и 27687. Между ними выявлена инсерция в 371 нуклеотид длиной, характеризующая вариант G.

В обзоре Шевцовой с соавт. приводятся четыре однонуклеотидные замены в гене *CSN1S1*, влияющие на качество молока, три из которых не указаны в приведенной номенклатуре аллельных вариантов [24]. Одна замена — rs43703010 совпадает с мутацией в 26 181-м положении нуклеотида. Замена rs109817504 находится в промоторной зоне в положении 10331 (A>G) и влияет на параметры твердости сыра при производстве — аллель А уменьшает потенциальную твердость. Вторая замена rs110981354 находится в 15-м экзоне в поло-

жении 24287, Gln155His и связана с белково- и жирномолочностью, повышая данные показатели (аллель G). Третья замена находится в первой позиции интрона 6 (16059), где G заменяется на C. При этом инактивируется донорный сайт сплайсинга. Это приводит к потере экзона 6, кодирующего аминокислотные остатки в позициях 35–42, и негативно отражается на реологических свойствах молока, плотности творожного сгустка и выходе сыра. Мы добавили эти три однонуклеотидные замены в таблицу аллельных вариантов, однако пока не стали выделять их в отдельные варианты. Необходимо убедиться, что они не коррелируют с какими-либо аллелями в приведен-

Таблица 1. Аллельные варианты гена *CSN1S1*

Номера нуклеотидов и аминокислот	B	A	C	D	E	F	G	H	I
14891–14929									
14–26/29–41	N	Del							
17383	GCC			ACC					
53/68	Ala			Thr					
17377–17400									
51–58/66–73	N							Del	
18901	CAA				AAA				
59/74	Gln				Lys				
18923	TCG					TTG			
66/81	SerP					Leu			
19836	GAA								GAT
84/99	Glu								Asp
26181	GAA		GGA		GGA				
192/207	Glu		Gly		Gly				
Инсерция	N						ins 371		
27686–27687									
10331 A>G									
16059 G>C									
24287 G>C									
Gln155His									

Примечание. В первом столбце красным шрифтом показаны номера аминокислот от метионина в первой позиции, номера нуклеотидов приведены по геномной последовательности GenBank No. X59856.

ной номенклатуре. В табл. 2 показаны примеры генотипирования двух быков по гену *CSN1S1*. Бык под номером 14 вполне мог бы быть определен как гетерозигота ВН, однако у него присутствует аллель Т в варианте I. Его также можно определить как гетерозиготу HI, но в этом случае появляется “лишний” аллель А (аминокислота 99) в варианте В. Кроме того, он также является гетерозиготным по маркеру 10331, но вариант для второго аллеля пока еще не определен. Бык под номером 20 вполне определяется как гетерозигота AF.

#### Ген *CSN1S2*

Этот ген считается слабо влияющим на свойства молока. В обзоре Шевцовой и соавт. прямо указано: “Для гена *CSN1S2*, кодирующего  $\alpha$ S2-казеин, существенных данных о его положительной или отрицательной ассоциации с молочной продуктивностью обнаружено не было” [24]. Однако в обзорах Фаррелла и Кароли [7, 8] приведена номенклатура аллельных вариантов этого гена. Как и в случае с геном *CSN1S1* в их номенклатурах для гена *CSN1S2* номера аминокислот, в которых произошли замены, сдвинуты от первого метионина

на 15 позиций. Референсная последовательность, послужившая для этого, – GenBank: M94327.1. В табл. 3 мы приводим их обозначения, где красным цветом показываем позицию аминокислоты от первого метионина белковой последовательности.

Анализ ДНК быков трех породных групп выявил присутствие в генотипе дополнительных комбинаций маркеров, которые отсутствуют в приведенной номенклатуре аллельных вариантов. В табл. 4 показаны примеры генотипирования быков из исследованных нами выборок. Красным цветом выделены аллели, обнаруженные у конкретного животного. Так, бык под номером 4 является гомозиготой по аллелю С, а остальные представляют собой необычные сочетания аллелей в вариантах гена *CSN1S2*, иногда аллели из трех вариантов, как бык № 14, или даже четырех, как бык № 5.

#### Ген *CSN2*

Ген бета-казеина у крупного рогатого скота изучен достаточно хорошо и считается, что он оказывает значительное влияние на качество молока, особенно на его сыропригодные свойства.

**Таблица 2.** Примеры генотипов по гену *CSN1S1*

Номера аминокислот	Аллельные варианты гена																	
	бык 14 з/в									бык 20 з/в								
	B	A	C	D	E	F	G	H	I	B	A	C	D	E	F	G	H	I
14–26/ <b>29–41</b>	<b>N</b>	Del								<b>N</b>	<b>Del</b>							
53/ <b>68</b>	<b>G</b>			A						<b>G</b>			A		<b>G</b>			
51–58/ <b>66–73</b>	<b>N</b>							<b>Del</b>		<b>N</b>					<b>N</b>		Del	
59/ <b>74</b>	<b>C</b>				A					<b>C</b>			A		<b>C</b>			
66/ <b>81</b>	<b>C</b>					T				<b>C</b>					<b>T</b>			
84/ <b>99</b>	<b>A</b>								<b>T</b>	<b>A</b>					<b>A</b>			T
192/ <b>207</b>	<b>A</b>		G		G					<b>A</b>		G		G	<b>A</b>			
Инсерция в 19-м экзоне. 371 нуклеотид	<b>N</b>						ins			<b>N</b>					<b>N</b>	ins		
10331 A>G	<b>AG</b>									<b>G</b>								
16059 G>C	<b>G</b>									<b>G</b>								
24285 G>C	<b>G</b>									<b>G</b>								
Gln155His																		

Примечание. Красным цветом выделены аллели, обнаруженные у этих животных; з/в – зебувидный скот.

**Таблица 3.** Аллельные варианты гена *CSN1S2*

Номера нуклеотидов и аминокислот	A	B	C	D
6227	TCC	TTC		
8/ <b>23</b>	Ser	Phe		
7568	GAG		GGG	
33/ <b>48</b>	Glu		Gly	
8401	GCA		ACA	
47/ <b>62</b>	Ala		Thr	
8853–8879				
51–59/ <b>66–74</b>	N			Del
8879	GAG			GAT
59/ <b>74</b>	Glu			Asp
11018	ACC		ATC	
130/ <b>145</b>	Thr		Ile	

Примечание. В первом столбце красным шрифтом показаны номера аминокислот от метионина в первой позиции. Номера нуклеотидных позиций приведены по геномной последовательности гена GenBank: M94327.1.

Опять же считается, что аллельный вариант **B** положительно влияет на эти свойства, уменьшая время коагуляции и плотность сгустка, а аллель **A** является наиболее распространенным, по крайней мере в европейских и американских породах КРС. В номенклатурах Фаррелла [7] и Кароли [8] начало аминокислотной последовательности сдвинуто от первого метионина на 16 позиций. Однако в вышедшей позже брошюре для ирландских заводчиков КРС [28] номенклатура аллельных вариантов гена

*CSN2* приведена уже с традиционным отсчетом аминокислот в белке от первого метионина, хотя и ссылка на статью Кароли тоже приведена. Не обошлось без ошибок и в этой брошюре. Так, для аргинина, который меняется на цистеин, указана позиция 41, хотя эта аминокислота находится на 40-й позиции. Кроме того, в вышеуказанных номенклатурных позициях перепутаны обозначения для нуклеотидных и аминокислотных замен.

**Таблица 4.** Различные варианты аллельных сочетаний, выявленных при генотипировании быков по гену *CSN1S2*

Номера аминокислот	Аллельные варианты гена															
	бык 4, з/в				бык 5, з/в				бык 6, к/п				бык 14, г-ф			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
23	C	T	C		C	T			C	T			C	T		
48	A		G		A		G		A		G		A		G	
62	G		A		G		A		G		A		G		A	
66–74	N		N	Del	N			Del	N			Del	N			Del
74	G		G	T	G			T	G			T	G			T
145	C		T		C		T		C		T		C		T	

Примечание. В первом столбце указаны номера аминокислот от первого метионина. Аллели в варианте А указаны полностью, в остальных вариантах указаны только аллели, отличающие их от варианта А. Красным шрифтом выделены аллели, обнаруженные у конкретного животного; з/в – зебувидный скот, к/п – костромская порода, г-ф – голштино-фризская порода.

**Таблица 5.** Аллельные варианты гена *CSN2*

Номера аминокислоты и нуклеотида	A1	A2	A3	B	C	E	F	G	H1	H2	I
p.40	Arg								Cys		
c.118	C								T		
p.51	Glu				Lys						
c.151	G				A						
p.54	Glu					Lys					
c.15	G					A					
p.82	His	Pro	Pro			Pro				Pro	Pro
c.245	A	C	C			C				C	C
p.87	Gln									Glu	
c.259	C									G	
p.103	Leu								He		
c.307	C								A		
p.108	Met									Leu	Leu
c.322	A									C	C
p.121	His		Gln								
c.363	C		A								
p.137	Ser			Arg							
c.411	C			G							
p.167	Pro						Leu				
c.500	C						T				

Примечание. Для аллеля А приведен полный набор аллелей маркеров. В остальных вариантах указаны только те маркеры, где произошли изменения нуклеотидов и аминокислот. Номера нуклеотидных позиций приведены по кДНК гена.

Тем не менее мы исправили эти ошибки и приводим номенклатуру вариантов гена *CSN2* в табл. 5.

В настоящем исследовании генотипированы выборки быков по всем маркерам гена *CSN2*. При этом были выявлены новые сочетания аллелей, не описанные в приведенной номенклатуре. Не-

которые результаты такого генотипирования приведены в табл. 6. Следует упомянуть, что из 49 животных нет ни одного, чей генотип полностью соответствовал бы гомозиготному или гетерозиготному вариантам этой номенклатуры. Красным шрифтом выделены аллели, обнаруженные у кон-



Таблица 6. Примеры генотипов быков по гену *SCN2*

Номер нуклеотида	Аллельные варианты гена																					
	бык 20 з/в											бык 31 з/в										
	A1	A2	A3	B	C	E	F	G	H1	H2	I	A1	A2	A3	B	C	E	F	G	H1	H2	I
c.118	C								T	C		C									T	
c.151	G				A					G		G					C					
c.154	G					A				G		G					A					
c.245	A	C	C			C				C	C	A	C	C			C				C	C
c.259	C									G		C									G	
c.307	C							A		C		C								A		
c.322	A									C	C	A									C	C
c.363	C		A							C		C		A								
c.411	C			G						C		C				G						
c.500	C						T			C		C						T				

Примечание. Для варианта A1 показаны все аллели маркеров, для остальных вариантов показаны аллели маркеров, где произошли мутации. Красным шрифтом выделены аллели, найденные у конкретного животного; з/в – зебувидный скот.

кретного животного. Как видно из приведенных примеров, в этих генотипах сочетаются аллели из более чем двух вариантов. Кроме того, такие генотипы невозможно описать как гомо- или гетерозиготные по каким-то аллельным вариантам. Так, бык № 20 (зебувидный скот) является гомозиготным по маркерам 118, 151, 154, 245, 259, 307, 363 варианта H2, гомозиготным по маркеру 500 варианта F и гетерозиготным по маркеру 411 между вариантами B и H1. Бык 31 определен как гомозиготный по маркерам 118, 154, 307, 322, 363, 500 варианта A1, маркерам 245 и 259 варианта H2, гетерозиготным по маркеру 151 (A1/C) и маркеру 411 (A1/B). В целом генотип быка № 20 можно отнести к варианту H2 по большинству маркеров, а быка 31 к варианту A1 также по большинству маркеров. Среди проанализированных быков костромской и голштино-фризской пород также отмечено подобное явление.

### Ген *CSN3*

Ген каппа-казеина *CSN3* наиболее изучен с точки зрения его влияния на сыропригодные качества молока. Считается, что вариант B этого гена наиболее пригоден для приготовления сыров. Номенклатура вариантов гена *CSN3* пересматривалась чаще других генов этого семейства. Так, в номенклатуре гена каппа-казеина, опубликованной Кароли и соавт. [8], приводится эволюция этой номенклатуры. Необходимо упомянуть, что сотрудники лаборатории сравнительной генетики животных принимали активное участие в исследованиях этого гена и описали его новые варианты [12, 13]. В этом смысле наше исследование является продолжением традиций лаборатории.

Однако приведенные в статьях номенклатуры этого гена также указывают номера аминокислот, не совпадающие с номерами аминокислот в белковой последовательности. В брошюре [28], которая ссылается на таблицу из статьи Кароли и соавт. [8], номера аминокислот указаны уже в соответствии с приведенной последовательностью. У Фаррелла [7], а вслед за ним и у Кароли [8] указанная аминокислотная последовательность и нумерация аминокислот начинаются с 21-й аминокислоты референсной последовательности, а не от первого метионина. В сводной табл. 7 приведена номенклатура гена *CSN3*, опубликованная в этой брошюре.

Необходимо отметить, что из всего кластера казеиновых генов ген каппа-казеина единственный, в номенклатуре вариантов которого приведены мутации, не изменяющие аминокислоту. В табл. 7 аллели таких маркеров выделены красным цветом. Не совсем понятно, для чего нужно было вводить в номенклатуру новые варианты, если эти варианты не оказывают влияния на свойства белка. Тем не менее мы генотипировали наши выборки быков по всем маркерам и так же, как и в случаях с другими казеиновыми генам, обнаружили новые сочетания аллелей. Так, бык № 14 костромской породы (табл. 8), ранее типированный в другой лаборатории как BB, нами был типирован как CC с дополнительным аллелем A по маркеру 92 из варианта F2, аллелем G маркера 513 из варианта A1 и аллелем C маркера 521 из варианта B2. Второй бык № 12 костромской породы был ранее типирован, как AB, и наше типирование в целом подтвердило этот генотип. Однако он скорее A1B2 и также имеет дополнительный аллель – T по маркеру 352 из варианта G1. Если по

Таблица 7. Номенклатура аллельных вариантов гена *CSN3*

Номера аминокислоты и нуклеотида	Аллельные варианты гена												
	A	A1	B	B2	C	D	E	F1	F2	G1	H	I	J
p.31	Arg									His			
c.92	G									A			
p.114	Thr				Thr								
c.342	T				C								
p.118	Arg									Cys			
c.352	C									T			
p.118	Arg					His	His						
c.353	G					A	A						
p.125	Ser											Ala	
c.373	T											G	
p.156	Thr									Ile	Ile		
c.467	C									T	T		
p.157	Thr		Ile	Ile	Ile								Ile
c.470	C		T	T	T								
p.166	Thr								Thr				
c.498	T								G				
p.169	Asp		Ala	Ala	Ala				Val				Ala
c.506	A		C	C	C				T				C
p.171	Pro	Pro											
c.513	A	G											
p.174	Ile			Thr									
c.521	T			C									
p.176	Ser							Gly					
c.526	A							G					
p.188	Thr				Thr								
c.564	T				C								
p.189	Ala		Ala	Ala	Ala								
c.567	A		G	G	G								

Примечание. Красным цветом выделены нуклеотидные замены, не приводящие к изменению аминокислоты. Номера нуклеотидных позиций приведены по кДНК гена.

большинству маркеров он гетерозиготен, то по маркеру 564 бык № 12 оказался гомозиготен.

У быков зебувидного скота “примесей” аллелей из других вариантов заметно больше, чем у быков костромской и голштино-фризской пород. Это можно объяснить большей гомогенностью этих промышленных пород. В стадо скота, содержащееся в Научно-экспериментальном хозяйстве “Снегири” Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина Российской академии наук, в котором встречались айрширские и джерсейские помеси, в свое время приливали кровь четырех пород зебу, а позже кровь черно-пестрого и голштино-фризского скота. По всей видимости, это

является причиной такого разнообразия генетических вариантов в нашей выборке по всем казеиновым генам, а не только по гену *CSN3*. Небольшое расхождение полученных нами результатов с известными (опубликованными ранее) результатами генотипирования быков костромской и голштино-фризской пород мы склонны объяснять тем, что обычно в лабораториях, где проводят генотипирование по казеиновым генам, ограничиваются только несколькими маркерами, считающимися основными. Так, по гену *CSN3* обычно делают анализ по трем маркерам: 470, 506 и 564 (иногда 567). Поскольку варианты В, В2, С и J относят к вариантам группы В, небольшая разница

**Таблица 8.** Примеры генотипов быков костромской породы по гену *CSN3*

Номер нуклеотида	Аллельные варианты гена																								
	бык 14 к/п (предварительно ВВ)													бык 12 к/п (предварительно АВ)											
	A	A1	B	B2	C	D	E	F1	F2	G1	H	I	J	A	A1	B	B2	C	D	E	F1	F2	G1	H	I
c.92	G				G				A					G			G				A				
c.342	T			C	T									T			C								
c.352	C				C					T				C			C					T			
c.353	G				A	A								G			G	A	A						
c.373	T				T							G		T			T						G		
c.467	C				C					T	T			C			C					T	T		
c.470	C		T	T	T								T	C		T	T	T						T	
c.498	T				T			G						T			T			G					C
c.506	A		C	C	C			T					C	A		C	C	C		T					C
c.513	A	G												A	G										
c.521	T			C	T									T			C								
c.526	A				A		G							T			A			G					
c.564	T			C	T									T			C								
c.567	A		G	G	G									A		G	G	G							

Примечание. Красным цветом выделены аллели, найденные у конкретных животных; к/п – костромская порода.

в аллельном составе этих вариантов не учитывается, и часто по паре совпавших аллелей животное относят к варианту В, не проверяя остальные маркеры.

В настоящем исследовании трех пород крупного рогатого скота были обнаружены новые сочетания маркеров (SNP) в общепризнанных аллелях этих генов. С учетом полученных данных нами скорректирована номенклатура CN-локуса, а именно четырех генов: *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* и *CSN3*.

Такого детального анализа геномов крупного рогатого скота по генам казеинового кластера нам не приходилось встречать в научной литературе. Но обнаруженное явление, а именно сочетание нескольких аллельных вариантов в генотипе по казеиновым генам, явно не уникально. Комитет Американской научной ассоциации молочного животноводства по номенклатуре, классификации и методологии молочных белков публикует пересмотр номенклатуры молочных белков примерно каждые 5–10 лет, чтобы обобщить более поздние результаты и предложить изменения в номенклатуре, где это уместно. Возможно, что результаты, сходные с теми, что мы получили в нашем исследовании, появятся в других публикациях. С другой стороны, то разнообразие вариантов и те необычные сочетания аллелей, которые мы обнаружили вполне можно объяснить естественными процессами, происходящими в геноме. Кластер казеиновых генов достаточно протя-

женный и составляет около 250 тыс. пн, что допускает наличие кроссинговера в этом районе и обмен участками, приводящий к появлению новых вариантов сочетания аллелей. Возникновение мутаций *de novo* в этих генах также вносит вклад в биоразнообразии. Новые сочетания аллелей в казеиновых генах может придать молоку некие новые качества, как положительные, так и отрицательные. Это предмет будущих исследований, запланированных в нашей лаборатории. Кроме того, полученные данные по казеиновому кластеру позволяют проводить геномную селекцию с большим эффектом, что актуально не только для промышленных пород, но и для редких аборигенных пород крупного рогатого скота в целях изучения и сохранения биоразнообразия.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ГБС РАН по плановой теме № 122020800034-4.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Hayes H., Petit E., Bouniol C., Popescu C. Localisation of the alpha-S2-casein gene (CASAS2) to the homologous cattle, sheep and goat chromosome 4 by *in situ* hybridisation // Cytogenet. Cell Genet. 1993. V. 64. P. 282–285.

2. *Popescu C., Long S., Riggs P. et al.* Standardization of cattle karyotype nomenclature: Report of the committee for the standardization of the cattle karyotype // *Cytogenet. Cell Genet.* 1996. V. 74. P. 259–261.
3. *Martin P., Szymanowska M., Zwierzchowski L., Leroux C.* The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminants milks // *Reprod. Nutr. Dev.* 2002. V. 42. P. 433–459.  
<https://doi.org/10.1051/rnd:2002036>
4. *Grosclaude F.* Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait // *INRA Prod. Anim.* 1988. V. 1. P. 5–17.
5. *Di Stasio L., Mariani P.* The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production // *Zoot. Nutr. Anim.* 2000. V. 26. P. 69–90.
6. *Formaggioni P., Summer A., Malacarne M., Mariani P.* Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in *Bos* genus // *Ann. Fac. Med. Vet. Un. Parma.* 1999. V. XIX. P. 127–165.
7. *Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T. et al.* Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision // *J. Dairy Sci.* 2004. V. 87. № 6. P. 1641–1674.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
8. *Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J.* Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition // *J. Dairy Sci.* 2009. V. 92. № 11. P. 5335–5352.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2461>
9. *Erhardt G., Eggen A.* Untersuchungsmöglichkeiten der Milchproteine mittels Protein- und DNS-Analyse und deren Bedeutung bei züchterischen Fragestellungen // *Landwirtschaft Schweiz.* 1990. V. 3. P. 181–186.
10. *Erhardt G., Prinzenberg E.M., Buchberger J. et al.* Bovine  $\kappa$ -casein G detection, occurrence, molecular genetic characterization, genotyping and coagulation properties // *Proc. IDF "Milk Protein Polymorphism Seminar II."* Brussels: Intern. Dairy Federation, 1997. P. 328–329.
11. *Damiani G., Ferretti L., Rognoni G., Sgaramella V.* Restriction fragment length polymorphism analysis of the kappa-casein locus in cattle // *Anim. Genet.* 1990. V. 21. P. 107–114.
12. *Sulimova G.E., Sokolova S.S., Semikozova O.P. et al.* Analysis of DNA polymorphisms of clustered genes in cattle: Casein genes and genes of the major histocompatibility complex (BOLA) // *Tsitol. I Genetika.* 1992. V. 26. P. 18–26.
13. *Sulimova G.E., Badagueva I.N., Udina I.G.* Polymorphism of the  $\kappa$ -casein gene in subfamilies of the Bovidae // *Genetika.* 1996. V. 32. P. 1576–1582.
14. *Schlieben S., Erhardt G., Senft B.* Genotyping of bovine  $\kappa$ -casein ( $\kappa$ -CNA,  $\kappa$ -CNB,  $\kappa$ -CNC,  $\kappa$ -CNE) following DNA sequence amplification and direct sequencing of  $\kappa$ -CNE PCR product // *Anim. Genet.* 1991. V. 22. P. 333–342.
15. *Damiani G., Pilla F., Leone P., Cacciò S.* Direct sequencing and bidirectional allele specific polymerase chain reaction of the bovine beta-casein B variant // *Anim. Genet.* 1992. V. 23. P. 561–565.
16. *David V.A., Deutch A.H.* Detection of bovine  $\alpha$ s1-casein genomic variants using the allele-specific polymerase chain reaction // *Anim. Genet.* 1992. V. 23. P. 425–429.
17. *Barroso A., Dunner S., Canon J.* A multiplex PCR-SSCP test to genotype bovine beta-casein alleles A1, A2, A3, B, and C // *Anim. Genet.* 1999. V. 30. P. 322–323.
18. *Erhardt G., Senft B.* Nutzungsmöglichkeiten der genetisch bedingten Varianten der Rindermilch im Rahmen der Milchleistungsprüfung // *Performance Recording of Animals: State of the Art / Eds Gaillon P. and Chabert Y.* Pudoc: Springer Netherlands, Wageningen, 1990. P. 20–22.
19. *Chessa S., Chiatti F., Ceriotti G. et al.* Development of a SNP genotyping microarray platform for the identification of bovine milk protein genetic polymorphisms // *J. Dairy Sci.* 2007. V. 90. P. 451–464.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72647-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72647-4)
20. *Mercier J.-C., Chobert J.M., Addeo F.* Comparative analysis of the amino acid sequences of caseinomacropptides from seven species // *FEBS Lett.* 1976. V. 72. P. 208–214.
21. *Losi G., Castagnetti G.B., Grazia L. et al.* Influenza delle varianti genetiche della caseina  $\kappa$  sulla formazione e sulle caratteristiche della cagliata // *Sci. Tech. Alim.* 1973. V. 3. P. 373–374.
22. *Aleandri R., Buttazzoni L.G., Schneider J.C. et al.* The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability // *J. Dairy Sci.* 1990. V. 73. P. 241–255.
23. *Comin A., Cassandro M., Chessa S. et al.* Effects of composite  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein genotypes on milk coagulation, quality, and yield traits in Italian Holstein cows // *J. Dairy Sci.* 2008. V. 91. P. 4022–4027.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0546>
24. *Шевцова А.А., Климов Е.А., Ковальчук С.Н.* Обзор variability генов, связанных с молочной продуктивностью крупного рогатого скота // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2018. № 11. Вып. 1. С. 194–200.  
<https://doi.org/10.17513/mjpf.12475>
25. *Nilsen H., Olsen H.G., Hayes B. et al.* Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle // *Genet. Sel. Evol.* 2009. V. 41. P. 24.  
<https://doi.org/10.1186/1297-9686-41-24>
26. *Olsen H.G., Lien S., Gautier M. et al.* Mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6 // *Genetics.* 2005. V. 169. P. 275–283.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.104.031559>
27. *Rando A., Di Gregorio P., Ramunno L. et al.* Characterization of the CSN1AG allele of the bovine  $\alpha$ s1-casein locus by the insertion of a relict of a long interspersed element // *J. Dairy Sci.* 1998. V. 81. P. 1735–1742.
28. *McClure M., McClure J.* Genetic Disease and Trait Information for IDB Genotyped Animals in Ireland. Shinnagh, Bandon: Highfield House Co Publ., 2016. 89 p.

## New Combinations of Alleles in Variants of the Cattle Casein Cluster Genes and Revision of the Nomenclature of These Genes

S. B. Kuznetsov<sup>a, \*</sup>, E. V. Solodneva<sup>a</sup>, M. T. Semina<sup>a</sup>,  
S. V. Beketov<sup>a</sup>, I. S. Turbina<sup>b</sup>, and Yu. A. Stolpovsky<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

<sup>b</sup>*Joint-Stock Company "Head Center for the Reproduction of Farm Animals",  
Moscow oblast, Podolsk, Bykovo, 142143 Russia*

*\*e-mail: sergei\_kuznetsov@yahoo.com*

A detailed analysis of bovine genomes was carried out for 4 genes of the casein cluster located on the sixth chromosome of cattle: *CSNIS1* – S1 alpha-casein, *CSNIS2* – S2 alpha-casein, *CSN2* – beta-casein and *CSN3* – kappa-casein. The genotypes of 49 sires of Kostroma, Holstein-Friesian breeds and interbred hybrids of zebu with black-and-white cattle were studied. The analysis was carried out using the real-time PCR method, which made it possible to genotype DNA samples with the utmost accuracy. During the selection of primers, the nomenclature of all four genes was refined, which was brought to a single principle for designating amino acid positions in proteins encoded by the above genes. New combinations of markers (SNPs) have been found in generally recognized alleles in casein genes. Of all the animals studied, there is not one whose genotype would fully correspond to the homozygous or heterozygous variants of the generally accepted nomenclature. The discovered genotypes combine alleles from more than two variants. Thus, these genotypes cannot be described as homozygous or heterozygous for the identified allelic variants. The discovered phenomenon is probably not unique, since, as a rule, during the routine analysis of casein genes, several allelic variants associated with the cheese suitability of milk are tested, and the existing casein cluster polymorphism shown in this study is not fully taken into account.

**Keywords:** casein cluster genes, cattle, real-time PCR, SNP.