

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НУБІП України

07.01 – КМР. 1822 “С” 2022.07.12. 087 ПЗ 00

ХМЕЛЬНИЦЬКА ОЛЬГА ОЛЕКСІВНА

2023 р

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

НУБІП України

Факультет Тваринництва та водних біоресурсів

УДК 636.2.082.35:637.12.05

НУБІП України

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

тваринництва та водних біоресурсів

біології тварин

НУБІП України

Короненко Р.В.

Сахашкий М.І.

« » 2023 р.

« » 2023 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «Удосконалення методики виявлення в стадах ВРХ продуцентів А2
молока»

НУБІП України

Спеціальність 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»

(код і назва)

Світня програма Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва

НУБІП України

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

доктор с.-г.н., професор
(науковий ступінь та вчене звання)

Лихач А.В.
(ПІБ)

(підпис)

НУБІП України

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

доктор с.-г.н., с. н. с.
(науковий ступінь та вчене звання)

Кулібаба Р. О.
(ПІБ)

(підпис)

НУБІП України

Виконав
(підпис)

Хмельницька Ольга Олександрівна
(ПІБ студента)

КИЇВ – 2023

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факкультет тваринництва та водних біоресурсів

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біології тварин

д. б. н., професор

Сахацький М.І.

(науковий ступінь, вчене звання)

(підпис) (ІПБ)

2023 року

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКО КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Хмельницькій Ользі Олексіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»

(код і назва)

Освітня програма Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Удосконалення методики виявлення в стадах ВРХ продуцентів А2 молока»

затверджена наказом ректора НУБіП України від _____ 20__ р.

№ _____

Термін подання завершеної роботи на кафедру _____

(рік, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи удосконалити методику молекулярно-генетичного виявлення в стадах ВРХ продуцентів А2 молока.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Дослідити ефективність ампліфікації та специфічності двох систем алей-специфічна полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за використання методів біоінформатики;

2. Оптимізувати протокол проведення алей-специфічної ПЛР для типування алейів А¹ та А² гену бета-казеїну корів;

3. Визначити особливості генетичної структури популяції корів голштинської породи за локусом бета-казеїну;

4. Дослідити молочну продуктивність корів, що належать до різних генотипів за локусом бета-казеїну.

Перелік графічного матеріалу (за потреби): таблиці, рисунки.

Дата видачі завдання " _____ " _____ 20__ р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

Кулібаба Р. О.

(підпис)

(ІПБ)

Завдання прийняв до виконання

Хмельницька О. О.

(підпис)

(ІПБ студента)

Реферат

В останні роки, на тлі актуалізації проблеми отримання якісної та безпечної для людини продукції тваринництва, в генетиці великої рогатої худоби особливого значення набуває питання визначення різних форм бета-казеїну в молоці корів – A_1 та A_2 варіантів. На відміну від інших показників якості молочної продукції, визначення типу бета-казеїну проводять не за аналізу молока, а за типування його продуцентів. Таким чином, використання саме ДНК-технологій для ідентифікації алелів A^1 та A^2 гену бета-казеїну корів – це, практично, безальтернативний ефективний інструмент для вирішення вищезазначених питань. Відмінності у типі молока, A_1 чи A_2 обумовлені генетичними особливостями – різні форми молока розрізняються за типом бета-казеїну, що міститься в ньому. Кожний з різних типів бета-казеїну відрізняється за своїм амінокислотним складом. Різні породи корів характеризуються відмінностями у співвідношенні частот алелів A^1 та A^2 , що призводить до певних труднощів у питанні створення стад продуцентів молока певного типу. Саме тому питання, стосовно удосконалення методичних підходів до типування в стадах великої рогатої худоби особин із різними генотипами за локусом бета-казеїну, є актуальним та своєчасним.

Для вирішення поставлених питань, в якості основного методу досліджень застосували алель-специфічну полімеразну ланцюгову реакцію (AS-PCR) з наступним розділенням ампліфікованих фрагментів в агарозному гелі. В якості модельного об'єкту для проведення досліджень використовували корів голштинської породи.

За використання методів біоінформатики із залученням online інструментарію GenBank проаналізовано ефективність гібридації та специфічність праймерної системи AS-PCR 854 bp для фланкування фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну корів. За результатами досліджень встановлений високий рівень специфічності праймерної системи відносно бета-казеїну та повну її видоспецифічність геному представників *Bos Taurus*. На основі результатів біоінформаційного аналізу та лабораторних випробувань

розроблено оптимізований алгоритм типування особин великої рогатої худоби за алельними варіантами A^1 та A^2 локусу бета-казеїну за використання методу алель-специфічної ПЛР (AS-PCR). Доведено, що для ефективної ампліфікації потрібно використовували температуру відпалу праймерів на матриці ДНК у межах $61-64^\circ\text{C}$ впродовж 30 с в кожному циклі. У свою чергу, за результатами аналізу отриманих електрофореграм доведено, що для ефективного розділення продуктів ампліфікації фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну слід використовувати 1,5 %-ий агарозний гель впродовж 30 хв при напрузі у 120 V.

З урахуванням отриманих результатів на основі використання оптимізованого алгоритму типування особин великої рогатої худоби проведено індивідуальне типування представників голштинської породи за алельними варіантами локусу бета-казеїну. За результатами генетико-популяційних досліджень у дослідній групі тварин встановлено домінування за значенням частоти алелю A^2 у порівнянні з A^1 , а також генотипу A^2A^2 над A^1A^1 та A^1A^2 . Відхилення дослідної популяції від рівноважного стану за Харді-Вайнбергом не зафіксовано. Розраховані основні генетико-популяційні характеристики дослідної популяції корів за локусом бета-казеїну.

За результатами статистичного аналізу продуктивних якостей корів голштинської породи з різними генотипами за локусом бета-казеїну встановлена відсутність вірогідної різниці між особинами для двох лактацій. Виявлено тенденцію до превалювання значень показника надою для особин з генотипом A^2A^2 у порівнянні з особинами з генотипом A^1A^1 . Доведено, що алель A^2 не має контрпродуктивного ефекту (у межах дослідної популяції корів) на показник надою для двох лактацій.

НУБІП України

ЗМІСТ

НУБІП України

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ..... 7

ВСТУП 8

РОЗДІЛ 1. АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПУБЛІКАЦІЙ..... 12

1.1. А2-молоко – новий тренд в генетичній ВРХ..... 12

1.2. Вплив різних типів молока (А1 та А2) на здоров'я людини..... 14

1.3 Молекулярно-генетичні методи типування особин ВРХ за різними генотипами гену бета-казеїну..... 20

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 28

2.1 Матеріали досліджень..... 28

2.2 Методи лабораторних досліджень..... 29

2.3 Методи статистичних розрахунків..... 32

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ 35

3.1. Біоінформаційний аналіз специфічності та ефективності гібридизації системи алель-специфічної ПЛР (AS-PCR) для типування алелів А¹ та А² локусу бета-казеїну..... 35

3.2 Оптимізація протоколів проведення алель-специфічної ПЛР для типування алелів А¹ та А² гену бета-казеїну корів..... 40

3.3 Особливості генетичної структури популяції корів голштинської породи за локусом бета-казеїну..... 46

3.4 Молочна продуктивність корів з різними генотипами за локусом бета-казеїну..... 49

РОЗДІЛ IV. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ..... 53

ВИСНОВКИ..... 56

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ..... 58

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ..... 59

НУБІП України

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

НУБІП України

bp – base pair;

MAS – маркер-асоційована селекція;

PCR – полімеразна ланцюгова реакція;

НУБІП України

SNP – однуклеотидний поліморфізм;

QTL – локуси кількісних ознак;

RFLP – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів;

CSN2 – ген бета-казеїну;

НУБІП України

ACRS-PCR – (artificially created restriction site-PCR) – штучно створений сайт рестрикції ПЛР;

AS-PCR – (artificially created restriction site-PCR) – штучно створений сайт рестрикції ПЛР;

ВРХ – велика рогата худоба;

НУБІП України

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

п.н – пар нуклеотидів.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВСТУП

Актуальність теми. В останні роки, у молочному скотарстві зростає інтерес до якості продукції тваринництва, особливо в контексті використання методів маркер-асоційованої селекції (MAS). Широко використовується відбір тварин за використання різних видів ДНК-маркерів у селекційній роботі. Цей підхід дозволив суттєво підвищити параметри загальної продуктивності, використовуючи особин з бажаними генотипами для різних кількісних ознак [94]. У цьому контексті актуальним завданням є дослідження різних типів бета-

казеїну молока, що має безпосередній зв'язок з факторами здоров'я споживачів (A2 молоко). Вирішення різних молекулярно-генетичних аспектів цього питання дозволило не лише проводити окремі наукові дослідження у галузі генетики великої рогатої худоби, але також забезпечило створення необхідного фундаменту для селекційної роботи, спрямованій на отримання нового типу органічної продукції. Поступово цей тренд з'являється і в Україні [59-60-62].

Проблемою отримання молока A2 є необхідність визначення різних форм бета-казеїну. Унікальність цього продукту обумовлена генетичними особливостями продуцентів – різні форми молока, A1 і A2, розрізняються тільки за типом бета-казеїну, що міститься в ньому [86].

Існують два протилежних методичних підходи до цього аналізу продукції (молока, молочної продукції) або аналізу особини-продуцента. Найбільш широке застосування отримали молекулярно-генетичні методи, які базуються на аналізі генотипу тварин [23]. Такий підхід має декілька переваг. По-перше, визначення генотипу дозволяє використовувати тварину в селекційних програмах для отримання нащадків з бажаним генотипом (A²A²). По-друге, типування можна провести лише один раз за весь період життя тварини, оскільки генотип не змінюється протягом індивідуального розвитку організму. По-третє, типування варіантів бета-казеїну на рівні спадкового матеріалу є надзвичайно точним, чутливим та ефективним методом типування. Таким чином, використання

ДНК-технологій для ідентифікації алелів гена бета-казеїну корів є неперевершеним інструментом для розв'язування цих питань.

Мета і завдання роботи. Удосконалити методіку молекулярно-генетичного виявлення в стадах великої рогатої худоби продуцентів А2 молока.

Для досягнення мети сформульовано наступні завдання:

- дослідити ефективність ампліфікації та специфічності праймерної системи алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за використання методів біоінформатики;

- оптимізувати протокол проведення алель-специфічної ПЛР для типування алелів А¹ та А² гену бета-казеїну корів;

- визначити особливості генетичної структури популяції корів голштинської породи за локусом бета-казеїну;

- дослідити молочну продуктивність корів з різними генотипами за локусом бета-казеїну.

Предмет досліджень – генетико-популяційні параметри дослідної групи корів, частоти генотипів й алелів виявлених поліморфних локусів у популяції корів голштинської породи, параметри надою тварин за дві лактації.

Об'єкт досліджень – поліморфізм гена бета-казеїну та молочна продуктивність корів з різними генотипами за локусом бета-казеїну.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні – виділення ДНК, проведення ампліфікації, рестрикції та електрофорезу дослідних фрагментів,

генетико-популяційні – визначення частот генотипів та алелів, показників фактичної та очікуваної гетерозиготності, індексу фіксації Райта, ефективної

кількості алелів, оцінка відповідності розподілу частот генотипів стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом; зоотехнічні – визначення

показників молочної продуктивності великої рогатої худоби (стандартний надій за двома лактаціями); статистичні – загальноприйняті параметричні

(дисперсійний аналіз) і непараметричні (U-критерій Манна-Уїтні, критерій Краскела-Уоліса), методи порівняння вибірок, дескриптивна статистика.

Теоретична цінність отриманих результатів. За результатами проведених досліджень оптимізовано протокол ампліфікації фрагмента сьомого екзону гену бета-казеїну корів, визначено загальну ефективність гібридизації з ДНК-мішенню та специфічність праймерної системи для алель-специфічної

ПЛР. Визначено оптимальні параметри для електрофоретичного розділення ампліфікованих фрагментів ДНК в агарозному гелі. Доведено, що для ефективної ампліфікації потрібно використовували температуру відпалу праймерів на матриці ДНК у межах 61-64°C впродовж 30 с в кожному циклі.

Для ефективного розділення продуктів ампліфікації фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну запропоновано використання 1,5 %-ого агарозного гелю впродовж 30 хв при напрузі у 120 V.

На основі оптимізованих алгоритмів проведення індивідуального типування особин корів голштинської породи, визначено особливості генетичної структури дослідної популяції за поліморфізмом локусу бета-казеїну.

З'ясовано, що у дослідній популяції корів наявне переважання частоти алелю A^2 у порівнянні з A^1 . Частка особин з гомозиготним за алелем A^1 генотипом становила 10 %; з гомозиготним за A^2 – 67 %. Частка гетерозиготних особин склала 23 %.

Встановлено, що за співвідношенням кількості особин із різними генотипами дослідна популяція корів знаходиться у стані генетичної рівноваги, що свідчить про відсутність дії відбору за цим локусом.

Прикладна значущість. Оптимізований протокол ампліфікації фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну за використання методу алель-специфічної ПЛР можна ефективно використовувати для проведення індивідуального типування тварин.

За результатами статистичного аналізу показнику стандартного надюю за дві лактації контрпродуктивний ефект алелю A^2 не виявлений. Встановлена відсутність вірогідної різниці між особинами з різними генотипами (A^1A^1 , A^1A^2 та A^2A^2) для двох лактацій. Виявлено

тенденцію до переважання значень показнику надюю для особин з генотипом A^2A^2 у порівнянні з особинами з генотипом A^1A^1 . Відсутність контрпродуктивного ефекту від алелю A^2 дає змогу рекомендувати

використання особин з генотипом А²А² для отримання відповідної продукції (молока А2) на тлі збереження високої молочної продуктивності тварин.

Особистий внесок. Магістрантом проведено лабораторні дослідження; опановано методичні підходи; отримані результати досліджень, відібрано і проаналізовано літературні джерела; сформульовані висновки і пропозиції виробництву.

Структура та обсяг роботи. Магістерська робота складається із перелік умовних позначень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результати дослідження, висновки, списку використаних літературних джерел

та пропозицій виробництву. Магістерську роботу викладено на 69 сторінках комп'ютерного тексту, що містить 9 рисунки та 9 таблиць. Список використаної літератури налічує 95 джерел, у тому числі 77 латиницею.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 1

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПУБЛІКАЦІЙ

1.1. А2-молоко – новий тренд в генетиці ВРХ

НУБІП України

В розвинутих країнах світу останнім часом зростає число повідомлень з питань підвищення якості продукції молочного скотарства, особливо в контексті використання сучасних методичних підходів геномної та маркер-асоційованої селекції. Поряд з іншими актуальними питаннями, у генетики великої рогатої худоби особливого значення набуває проблема визначення різних форм бета-казеїну в молоці корів – А1 та А2 варіантів, що має суттєве значення для здоров'я людини [10].

НУБІП України

А2 молоко – це звичайне коров'яче молоко, яке має всі характерні якості, але відрізняється відсутністю бета-казеїну А1. Воно має декілька переваг у порівнянні зі звичайним молоком [10].

НУБІП України

Бета-казеїн – це білок, що складається з 224 амінокислот і становить приблизно 30% всіх молочних білків. У молоці зазвичай міститься 3,3% білків, з них 2-4% припадають на казеїн. Інші білки, такі як молочний альбумін і молочний глобулін, присутні в менших кількостях [38]. Білки, які містяться у молоці, складаються з до 20 різних амінокислот, включаючи всі незамінні амінокислоти. Всі групи казеїну містять фосфор, і це є характерною рисою, яка відрізняє їх від сироваткових білків. Зокрема, група аs-казеїнів має найвищу електрофоретичну рухливість серед усіх фракцій казеїну [15]. Молоко є суттєвим джерелом харчування для багатьох людей. Це рідина, яка містить воду, лактозу, тригліцериди, високоякісні білки, різноманітні мінерали і вітаміни. У великої рогатої худоби молочні білки можна розділити на три категорії: казеїни, сироваткові білки і білки мембран жирових кульок [43, 3]. Молоко з високим вмістом бета-казеїну А2 зазвичай знаходиться у породах, які виникли на Нормандських островах і південній Франції, таких як гернсейські,

джерсійські, шаролецькі та лімузенські коров [44, 29, 23, 39, 71, 70]. Молоко А2 відрізняється від звичайного молока тим, що не містить бета-казеїну А1, що робить його більш корисним. Оскільки молоко А2 не виділяє опіюїдних пептид ВСМ-7 під час перетравлення, воно може мати позитивний вплив на хвороби, пов'язані з психічними розладами [35].

За допомогою аналізу ДНК, отриманої з зразків волосся чи крові, можна визначити, чи виробляють тварини молоко з білком А2. Також проводиться перевірка молока після виробництва, щоб переконатися, що воно не містить білка А1. Вживання молока А2 може мати позитивний вплив на захворювання,

пов'язані з психічними розладами. Дослідження підтверджують, що відсутність опіюїдного пептиду ВСМ-7 сприяє полегшенню симптомів різних захворювань і позитивно впливає на загальний настрій [50]. Молоко складається переважно з

води, а також містить жир, білок, лактозу (молочний цукор) і мінерали. Казеїн і альбумін, які є молочним білком, становлять близько 3,8% молока. При дослідженні білків методом електрофорезу виділяються фракції казеїну: альфа-, бета- та каппа-казеїн [76, 53].

Молоко А1 в молекулі бета-казеїну у положенні 67 містить гістидин, в той час як молоко А2 – пролін. Ця заміна амінокислоти призводить до утворення в шлунково-кишковому тракті пептиду, відомого як бета-казеоморфін, який може активувати морфінові рецептори в організмі людини. Проте слід зазначити, що цей пептид не утворюється з молока А2 [83]. У 250 мл

молока, крім води та всіх твердих компонентів, міститься приблизно 6-8 г казеїну і 2-3 г бета-казеїну. У результаті процесу у кишківнику виникає бета-казеоморфін, який потім входить в організм людини та активує рецептори по всьому організму, включаючи кишковий тракт, печінку, серце, матку, м'язи та головний мозок. Це може призводити до відчуття задоволення і покращення якості сну [22]. Фермери у всьому світі шукають бичків з генетичним варіантом

А2 для розведення корів з таким самим генетичним варіантом і отримання телят з цим генотипом. Це дозволяє їм відокремлювати молоко від корів з генотипом А2А2, маркувати його і продавати за підвищеною ціною [54]. В

Україні виробництво молока A2 значно залежить від переробників і маркетингу, які повинні підвищити його значення, щоб виробники молока почули потребу у ньому і почали його виробляти [17].

Крім того, оскільки молоко A2 не має негативного впливу на здоров'я, його популярність може зростати завдяки змінам у смаках і вподобаннях споживачів. Сучасне покоління активно шукає нові продукти, і молоко A2 може стати новим трендом у молочній індустрії [2].

1.2. Вплив різних типів молока (A1 та A2) на здоров'я людини

Казеїн це білок, який не міститься в крові і молочній залозі, а синтезується з амінокислот крові. Він також руйнується при термічній обробці, але він достатньо стійкий до дії високих температур. Для його згортання потрібна температура 130°C [12].

Казеїн, одна з основних складових фракцій молочних білків, поділяється на три основні групи: альфа (CSN1), бета (CSN2) і капа (CSN3). Бета-казеїн становить приблизно 24-28% загальної кількості білка в молоці [68].

Використання молока з генетичним варіантом A2 може бути корисним для осіб, які мають запалення кишківника. Молоко типу A2 містить менше бета-казеїну A1 (або зовсім не містить його), який може спричиняти запалення кишківника. Тому споживання молока типу A2 може сприяти запобіганню або зменшенню ризику запалення кишківника [18]. Варто відзначити, що

механізми, які призводять до запалення кишківника, ще не вивчені в повній мірі. Лікування цього захворювання часто включає в себе поєднання дієти, контролю стресу і застосування лікарської терапії [7]. Вживання молока типу A2 може приносити користь і для осіб з запаленням кишківника. Молоко з

генетичним варіантом A2 містить менше бета-казеїну A1 (у випадку з гетерозиготним генотипом), який може спричиняти запалення кишківника. Отже, споживання молока з генетичним варіантом A2 може сприяти запобіганню або зменшенню ризику запалення кишківника [25]. У всьому світі

коров'яче молоко є одним з головних джерел білка у раціоні людини. Зазвичай в одному літрі коров'ячого молока міститься приблизно 30 г білка, і близько 80% цього білка становлять казеїни. Останнім часом з'явилося все більше

наукових доказів, що білки казеїну, зокрема бета-казеїни, можуть мати зв'язок із різними захворюваннями [95]. БКМ-7, який утворюється внаслідок

пограпання бета-казеїну типу А1 в організм людини може бути асоційованим з розвитком деяких захворювань. У випадку бета-казеїну А2, гістидин замінений проліном у позиції 67, що перешкоджає утворенню БКМ-7. Тому, споживання

молока з високим вмістом бета-казеїну А2 може бути корисним для запобігання

або зниження ризику запалення кишківника [28]. Раніше було встановлено зв'язок між споживанням бета-казеїну А1 і деякими захворюваннями, такими як діабет І типу, ішемічна хвороба серця та неврологічні порушення [19]. У

контексті цього винаходу пропонується використання композиції молочних

продуктів для запобігання та зниження ризику запалення кишечника, в якій

бета-казеїн містить щонайменше 50% бета-казеїну А2 за масою. Кількість бета-казеїну А2 може бути будь-якою в діапазоні від 50% до 100% від маси бета-казеїну, наприклад, щонайменше 90%, 99% або навіть 100% [47].

Наукові дослідження підтверджують, що харчування грає ключову роль у

підтримці нормального балансу організму людини. Молоко та молочні продукти є суттєвою частиною західної дієти, але для осіб із підвищеною чутливістю споживання цих продуктів може мати негативний вплив на

здоров'я. Сучасні наукові дослідження ставлять під сумнів різні біологічно

активні складові молочних продуктів, такі як лактат, сироватковий білок і білок

бета-казеїн [91, 20]. Є перегляд поточного розуміння 2 основних підваріантів

бета-казеїну та їх впливу на різні системи органів, що може мати вплив на

здоров'я людини. Вплив білка бета-казеїну на шлунково-кишкову систему,

ендокринну систему, нервову систему та серцево-судинну систему, а також

його роль у антиоксидантах і метилюванні [36]. Вживання молока з вмістом А1

білка було пов'язане зі збільшенням запальних показників. Також було

повідомлено про наявність реакції, схожої на опіoidну, яка може викликати

клінічні симптоми неврологічних розладів, таких як розлад спектру аутизму. З іншого боку, споживання молока з A2 білком мало корисні ефекти та краще засвоювалося людьми з чутливою реакцією. Для більш глибокого розуміння короткострокових та довгострокових наслідків споживання A1 бета-казеїну порівняно з молоком, яке містить A2 бета-казеїн, подальші дослідження є важливими [57].

Молоко, яке включає в себе A2 B-казеїн, викликає менше симптомів непереносимості лактози (LI) у порівнянні з молоком, де присутні обидва варіанти білка, A1 та A2 бета-казеїн. Для оцінки терпимості шлунково-кишкової системи до молока з різними концентраціями білків бета-казеїну A1 і A2 проводили досліді з визначення ефекту від одноразового прийому їжі [74]. Учасники дослідження отримували чотири різних типи молока: молоко з вмістом тільки білка A2 бета-казеїну, звичайне молоко і молоко без лактози.

Через 6 годин після споживання кожного з цих видів молока, симптоми, пов'язані зі шлунково-кишковою непереносимістю, та концентрацію водню у видихах аналізували. Загальна оцінка симптомів болю в животі була менш вираженою після вживання молока, що містило лише A2 бета-казеїн, в порівнянні зі звичайним молоком [65].

Аналіз із застосуванням лактози виявив статистичне значуще покращення оцінки симптомів і нижче виробництво водню після споживання молока, що містить лише A2 бета-казеїн, порівняно із звичайним молоком. Споживання молока, що містить лише A2 бета-казеїн, пов'язане з меншою кількістю шлунково-кишкових симптомів, ніж споживання звичайного молока з лактозою [78, 88].

Білкова фракція бета-казеїну може відіграти ключову роль у прояві нової хвороби: непереносимості молочного білка. Ця ситуація спричинила появу нових товарів на ринку, таких як "молоко A2" або "молочні продукти без A1".

У цьому контексті, для аналізу досліджень щодо бета-казеїну A2, ми використовували бібліометричний підхід з використанням бази даних Web of Science (WOS). Основною метою цього дослідження було надати огляд сучасного стану в галузі бета-казеїну A2, аналізуючи кількість публікацій на

рік, тенденції в тематичному змісті, найбільш поширені терміни та виділяючи основні установи та країни, які активно досліджують цю тему. Результати цього бібліометричного дослідження підкреслили необхідність подальших досліджень, щоб ретельно вивчити можливі наслідки цих нових продуктів для здоров'я людини та питань розвитку світового ринку А2м [52].

Молоко від корів протягом тривалого часу було джерелом високоякісного білка та окремих поживних мікроелементів, таких як кальцій для більшості населення. Популяції, які споживають молоко, що містить високий рівень варіанту бета-казеїну А2, мають нижчу захворюваність на серцево-судинні

захворювання та діабет 1 типу. Крім того, споживання молока з варіантом А2 може бути пов'язаний з менш вираженими симптомами аутизму та шизофренії [4, 6, 5]. Механізм дії сконцентрований основним чином на бета-казеїні А1 та

подібних йому формах, які можуть утворювати біоактивний опіоїдний пептид бета-казоморфін під час процесу травлення. Поки не відомо, чи є конкретна користь для здоров'я в споживанні молока з генетичним варіантом А2, і це питання вимагає подальших досліджень [21].

Були відкриті нові варіанти генетичних поліморфізмів у гені коров'ячого бета-казеїну, проведений аналіз їх асоціації з показниками продуктивності

молока і складом молочного білка. Проведений генетичний скринінг гена бета-казеїну у 72 корів голштино-фризької породи, за результатами якого виявлено 19 нових поліморфізмів [16]. Дослідження асоціації між варіантами білка бета-

казеїна та складом молока проводилося на 1857 коровах першої лактації голштино-фризької породи. Результати вказують на значні відмінності в

асоціаціях між варіантами білка А2 та А1 з кількома продуктивними характеристиками. Варіант І білка бета-казеїну особливо пов'язаний із вмістом білка у молоці, виходом білка, а також з аs1-казеїном (аs1-CN), аs2-казеїном (аs2-CN), К-казеїном (К-CN), альфа-лактальбуміном (а-LA), бета-лактоглобуліном (В-LG), індексом казеїну та виходом казеїну [93].

Генотипи бета-казеїну були встановлені шляхом аналізу однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена CSN2 з використанням ПЛР та

секвенування. В популяції великої рогатої худоби частота бажаного варіанту бета-казеїну A2 складала 0,70, тоді як частота небажаного варіанту A1 становила 0,30. Частота зустрічальності алелю A2 була вищою, ніж

очікувалося для цієї породи, що означає, що генетичний відбір для варіанту A2 у цих корів може бути успішно проведений за короткий час, використовуючи гомозиготних корів A2 [85].

Зростання споживання молока A2 останнім часом привернуло увагу і споживачів, і виробників, завдяки його потенційним користям для здоров'я,

таким як полегшене травлення і покращене засвоєння. В цьому контексті була

розроблена нова методика НІР у реальному часі, яка використовує комбінацію конюгованих зондів з блокованою модифікованою нуклеїновою кислотою (LNA) для генотипування особин за алелями A1 і A2 гена бета-казеїну (CSN2).

Межі виявлення для кожного зонда (A1 і A2) оцінювалися за допомогою серійних розведень [45]. Проведено тестування на чутливість виявлення алеля

A1 у зразках з алелем A2. Межі виявлення алеля A1 та A2 складали 6 копій, а виявлення алеля A1 у зразках з алелем A2 було можливим при 7,5 копіях (1%).

Метод, що використовує LNA-зонд, проявив себе як швидкий, надійний, високочутливий і економічно ефективний, і може бути використаний як

скринінговий тест для сертифікації молочних продуктів A2 [46].

Незважаючи на тенденцію зростання споживання молока у світі, в окремих географічних областях споживання молока стабільно зменшується

протягом останніх десятиліть. Ця ситуація, разом із зростанням цін на молоко,

призвела до серйозної кризи в галузі молока та молочних продуктів. Для

вирішення цього питання було запропоновано деякі можливі рішення, включаючи зусилля з переконання тих, хто вже не вживає молоко, почати його

споживати, або виходити на ринок з молоком та молочними продуктами вищого рівня доданої вартості [42].

Заміна звичайного молока, яке містить тільки A2 бета-казеїн, призвела до зменшення пlynкково-кишкових симптомів, що часто виникають при

непереносимості молока у дошкільних дітей в Китаї, і сприяла покращенню аспектів когнітивної діяльності [89].

Генетичні різноманітності гена бета-казеїну мають важливе значення через їх вірогідний вплив на здоров'я людини. При порівняльному аналізі послідовності гена бета-казеїну в місцевих індійських породах, схрещених і екзотичних породах в Індії було виявлено 15 одиночних нуклеотидних поліморфізмів (SNP) і 4 вставки/вилучення (Indel), що відповідають 14 гаплотипам. Гаплотип типу A2 мав найвищу частоту в індійських місцевих породах, становячи 0,941. З 15 варіантів, виявлених у локальних породах,

тільки три (A1, A2 і B) були присутні в аналізованих популяціях. Алельний профіль бета-казеїну A1 та A2 виявив переважання алеля A2 (0,95) серед великої рогатої худоби в Індії [72]. Великий вміст алеля A2 свідчить, що місцева велика рогата худоба Індії є найбільш підходящою для виробництва молока A2 у всьому світі. Однак вищий процент гетерозиготних генотипів (A1 та A2) у корів вимагає перевірки походження, щоб вести селекційну роботу у стаді у напрямку досягнення максимальної частоти генотипу A2 [75].

Останнім часом «молоко A2» набуло популярності в молочному секторі через його потенційний вплив на здоров'я людини, що призвело до значного підвищення кількості A2 гомозиготних тварин в багатьох країнах [58]. Отже, проведені дослідження спрямовані на оцінку впливу поліморфізму бета-казеїну типу A1 та A2 на детальний склад білків та процес виробництва сиру в молоці.

Результати показали, що відновлення поживних речовин було більш ефективним, коли більше 75% було складом бета-казеїну типу A2. Однак не спостерігалось значущих відмінностей у кінцевому складі сиру, отриманому з різних варіантів бета-казеїну [92].

Оскільки коров'яче молоко, що містить бета-казеїн A1, може спричиняти розлади та біль у животі у деяких людей, пов'язаних з перетравленням цього білка, молоко A2 стало альтернативою, оскільки воно містить лише бета-казеїн A2, який не викликає такі ускладнення [40]. Проведено аналіз генотипу 283 корів породи Гусерат з 10 стад. Встановлено, що частота генотипу A2 складала

0,80, а частота алеля А2 була 0,90. Хоча ці частоти трохи нижчі, результати вважаються задовільними. Гузерат, як порода великої рогатої худоби, демонструє потенціал для виробництва молока А2. Крім того, швидким впровадженням селекції та маркерів можливо збільшити частоту генотипу А2 без шкоди для генетичної різноманітності [90].

1.3 Молекулярно-генетичні методи типування особин ВРХ за різними генотипами гену бета-казеїну

На сьогоднішній день молоко типу А2 отримує все більше світової популярності і використовується як альтернатива звичайному коров'ячому молоку. Ця продукція має більш благотворні характеристики для здоров'я і може бути корисною для осіб із проблемами у шлунково-кишковому тракті або для тих, хто шукає продукти з покращеними корисними властивостями [14].

Головна особливість молока типу А2 полягає в тому, що воно продукується лише коровами, які мають обидві копії генів А2 у своєму геномі. У кожній тварини є дві копії генів - одну успадковану від батька та іншу від матері. Для отримання тварини з генотипом А2А2 потрібно схрестити бика, який має хоча б одну копію гена А2, і корову, яка також має хоча б одну копію гена А2. Таким чином, лише при такому схрещуванні можна з високою вірогідністю отримати корову, яка буде видавати молоко типу А2. Тільки корови із генотипом А2А2 можуть бути джерелом молока типу А2, тому схрещування тварин із цим генотипом гарантує отримання нащадків із таким же генотипом [87].

Голштинська порода корів відзначилася ведучим позиціонуванням у глобальному виробництві молока типу А2 та покаже найвищі темпи зростання. Голштинські корови славляться найвищим показником надійності молока у світі. Порода джерсі також займає значну частку світового ринку молока типу А2. У свою чергу, Україна має обмежену кількість фермерських господарств, які виробляють молоко типу А2 [1].

Проводяться дослідження з аналізу впливу А2-казеїну на взаємодію з генотипами аs-казеїну та к-казеїну з точки зору технологічних аспектів при виробництві молока типу А2. Проведено дослідження, щоб визначити вплив цих варіантів казеїну на технологічні характеристики молочних продуктів.

Однак на основі результатів досліджень можна зробити висновок, що виробництво молочних продуктів з молока типу А2 можливе, оскільки ці продукти не суттєво відрізняються від продуктів, отриманих з традиційного молока [34].

Вплив молока типу А2 на поліпшення кишкової толерантності досліджується в клінічних випробуваннях *in vivo*. Проте механізм молекулярних змін після мутації гена CSN2 та інші можливі корисні впливи на здоров'я, пов'язані з молоком А2, залишаються невідомими. Ми провели аналіз метаболоміки та ліпідоміки, щоб розглянути важливі метаболічні шляхи, такі як

метаболізм гліцерофосфоліпідів, метаболізм сфінголіпідів, метаболізм гліцероліпідів, сигнальна система фосфатидилінозитолу та біосинтез, які пов'язані з мутацією гена CSN2. В результаті було встановлено відповідний молекулярний механізм. Після мутації гена CSN2 вміст лактози, триацїлгліцерину та більшості полярних ліпідів значно знизився, і були

спостережені регулювання незамінних жирних кислот, таких як α -ліноленова кислота. Ці результати можуть розкрити нові можливості для розуміння харчової цінності та користі для здоров'я молока типу А2 [51].

Для прямої ідентифікації алелей А1 і А2 гена бета-казеїну (CSN2) у молоці було розроблено два методи: плавлення з високою роздільною здатністю (HRM) та генотипування за SNP. В ході дослідження були використані зразки ДНК з молока 45 тварин, і додатково проведено секвенування 10 зразків для підтвердження точності аналізу. Аналітичну

чутливість обох стратегій для виявлення алеля А1 оцінювали, тестуючи зразки з різними розведеннями копій ДНК алеля А1 (від 500 до 5 копій) у зразку з алелем А2. Межі виявлення для алеля А1 у зразках з алелем А2 становили 10% (100 копій) для HRM і 2% (10 копій) для SNP відповідно. Обидва методи були

специфічними і можуть відрізнати алелі A1 від A2. Проте рекомендується використовувати метод генотипування за конкретним SNP через його підвищену чутливість саме до алеля A1 [79].

Бета-казеїн є основною складовою молочних казеїнів і існують кілька різних генетичних варіантів цього білка. Результати дослідження показали, що молоко з фенотипом бета-казеїн A2A2 має вищий вміст вільного кальцію, поліпшує утворення піни та потребує більше часу для твердіння гелю. Модуль зберігання після закінчення бродіння значно нижчий у молочного гелю з бета-казеїн A2A2 у порівнянні з гелем з β -CN A1A1. Молочний гель бета-казеїну

A2A2 має більш пористу структуру та тонкі білкові нитки, що призводить до меншої міцності гелю у порівнянні з молочним гелем бета-казеїн A1A1. Ці відкриття надають новий інсайт в тонкі різниці у фізичних властивостях молока з фенотипами бета-казеїн A2A2 та A1A1. Це може бути корисним для виробників молочних продуктів у розробці нових продуктів з різними функціональними характеристиками [73].

Генетичні варіанти бета-казеїну A1 та A2 були визначені за допомогою швидкої катіонообмінної рідкісної хроматографії білка. Масовий зразок казеїну з стада був розділений на трійку піків. Зразки казеїну від окремих корів, які мали відомі комбінації бета-казеїну A1 та A2, були використані для підтвердження того, що ці три піки представляли собою генетичні варіанти бета-казеїну. Кислотний гель PAGE також підтвердив ідентичність піків, які виділялися з колонки [49].

У кожному білку молока існує численні індивідуальні варіанти, і залежно від генетичних різноманітностей кожного білка, можуть виникати помітні зміни в функціонуванні молока. Бета-казеїн відіграє роль не лише у формуванні міцелі казеїну, але й у створенні самої міцелі, а також функціонує як молекулярний "шаперон", щоб запобігти агрегації різноманітних білків, включаючи інші казеїни. Варіант A2 бета-казеїну формує менші міцелі, ніж A1 бета-казеїн, і рівновага між мономером та міцелою A2 бета-казеїну відмінна від A1 бета-казеїну. Ця різниця, ймовірно, пояснюється структурними

відмінностями між ними двома варіантами бета-казеїну, які пов'язані з більшою кількістю поліпроліну-II у A2 бета-казеїні. Ймовірно, ця різниця призводить до збільшеної активності "шаперона" в A2 бета-казеїні в порівнянні з A1 бета-казеїном. Відмінності в утворенні міцел та, отже, в активності "шаперона" можуть пояснити відмінності в функціональності молока у гомозиготних стад корів A1 і A2 [80].

У вивчених стадах української чорно-рябій молочної, лебединської та симентальської порід проводились дослідження, спрямовані на аналіз генетичного різноманіття гена бета-казеїну та його впливу на якість молока

корів. Було проведено генотипування 200 голів великої рогатої худоби цих порід. У популяції корів лебединської породи була висока частота алелі A2 (0,706), в той час як симентальська порода мала найнижчу частоту (0,620).

Українська чорно-ряба молочна порода мала найвищу частоту алелі A1 (0,380), і найнижча частота була помічена у корів лебединської породи (0,294). Тварини української чорно-рябій молочної та симентальської порід мали найвищу частоту генотипу A1A1 (20%). Найвища частота алелі A2 спостерігалася у корів лебединської породи, тоді як найнижча частота була у симентальської породи.

Корови української чорно-рябій молочної породи з генотипом A1A1 мали більший вміст жиру в молоці, тоді як тварини лебединської породи з генотипом A2A2 виділялися за всіма показниками якості молока. Тварини симентальської породи з генотипом A2A2 мали менший вміст жиру порівняно з іншими генотипами [8].

Дослідження підтверджує, що білкові компоненти молока мають важливий вплив на процеси згортання, утворення сирної маси та виділення сироватки. Це свідчить про те, що молоко, яке містить більше корисних білків, наприклад, молоко типу A2, може мати позитивний вплив на здоров'я людини.

Це може пояснити готовність споживачів платити більше за молоко A2, оскільки вони розуміють його переваги для свого здоров'я [56].

В результаті аналізу локальної популяції ВРХ, яка розводиться у Словаччині, було виявлено три генотипи: AA (69,52%), AB (27,62%) і BB

(2,86%). Частота алеля А складала 83,33%, а алеля В – 16,67%. Велика рогата худоба голштинської породи, яка тримається у Словачкій Республіці, характеризується високим рівнем гомозиготності (0,7222), низьким інформаційним вмістом поліморфізму (0,2392), ефективною кількістю алелей (1,3847) та можливістю реалізації змінності на рівні 27,91% [67].

У коров'ячому молоці зустрічаються кілька варіантів бета-казеїну, зокрема А1 і А2, які є найпоширенішими. Кевні варіанти, такі як А1, В і С, вважаються факторами ризику для здоров'я людей, які споживають молоко.

Імовірно, ці варіанти пов'язані з непереносимістю молока та деякими

хворобами людини через утворення біоактивного пептиду з опіодними властивостями під час травлення, відомого як β -казоморфін 7 (BCM-7) [77].

Навпаки, варіант А2 не бере участі у патогенетичних процесах, і його наявність

у молоці є бажаним. Для відбору молочних корів на основі наявності варіанту

β -казеїну А2 були оцінені частоти алельних варіантів гена CSN2 в італійських

молочних корів, які вирощуються в центральній Італії. Результати цього дослідження можуть допомогти у відборі тварин із генетичним варіантом бета-казеїну А2 для отримання молока, яке містить лише цей варіант і краще

засвоюється [69]. Перетравлення варіанту бета-казеїну А1 призводить до

утворення біоактивного пептиду, відомого як бета-казоморфін 7 (BCM-7), який, як вважають, може бути потенційною причиною різних хвороб людини та пов'язаний із поганою засвоюваністю молока. Окремі варіанти бета-казеїну

були визначені шляхом аналізу наявності одиночних нуклеотидних

поліморфізмів (SNP) у гені CSN2 з використанням методів ПЛР та

секвенування. Виявлено, що в досліджуваній популяції великої рогатої худоби

частота бажаного варіанту бета-казеїну А2 становила 0,61, в той час як частота небажаного варіанту А1 дорівнювала 0,39. Частота алелю А2 була вищою, ніж

очікувалося для цієї породи, і це свідчить про можливість генетичного відбору

на користь варіанту А2 у цих тварин, що може бути досягнуто у короткий термін за допомогою гомозиготних биків з алеллю А2 [66].

Варіант А1 сприяє поліпшенню текстури сиру, процесу згортання молока та формуванню міцел, але при цьому знижує рівень засвоєння молока у порівнянні з варіантом А2 [24]. Наукові підтвердження вказують на те, що ВСМ-7 має виражену опіюїдну активність, яка супроводжується окислювальним впливом, і може взаємодіяти з природними опіюїдними системами в стінці шлунково-кишкового тракту як у немовлят, так і у дорослих [55]. Згідно з даними Deth et al, вживання молока з варіантом А2 сприяє природному утворенню глутатіону (GSH) – потужного антиоксиданту, який відомий своїми корисними властивостями для здоров'я. Дослідження вказує на те, що споживання молока з варіантом А2 значно подвоює рівень GSH у крові порівняно з молоком, яке містить як варіанти β-казеїну А1, так і А2 [37]. Деякі дослідження вказують на зв'язок між вживанням молока з β-казеїном А1 та ризиком захворювань серця, синдрому раптової дитячої смерті, агравацією симптомів, пов'язаних із шизофренією, аутизмом, цукровим діабетом 1 типу та непереносимістю молока [31, 27, 82, 32, 81].

Європейське агентство з безпеки харчових продуктів (EFSA) у 2009 році у своєму звіті прийшло до висновку, що немає причинно-наслідкового зв'язку між споживанням молока з варіантом А1 та розвитком цих захворювань, але потребується подальші дослідження [41]. У науковому звіті недавно було зазначено, що немає науково обґрунтованих доказів про негативний вплив споживання варіанту бета-казеїну А1 на здоров'я людини порівняно з варіантом бета-казеїну А2 [61].

Молоко, що містить лише бета-казеїн варіанту А2, можна отримати шляхом штучного осіменіння корів-носіїв А2/А2. Зразки крові були зібрані від голштинно-фризьких корів з Італії. Генотип ДНК була екстрагована та використана для аналізу за допомогою специфічних праймерів, що були модифіковані для покращення ефективності аналізу. Коров'яче молоко А2 є доступним у деяких країнах і рекомендується людям з непереносимістю молока. Формула для новонароджених, яка містить варіант бета-казеїну А2, продається в Китаї та Австралії і рекламується як менш обтяжлива для

Молоко, що містить лише бета-казеїн варіанту А2, можна отримати шляхом штучного осіменіння корів-носіїв А2/А2. Зразки крові були зібрані від голштинно-фризьких корів з Італії. Генотип ДНК була екстрагована та використана для аналізу за допомогою специфічних праймерів, що були модифіковані для покращення ефективності аналізу. Коров'яче молоко А2 є доступним у деяких країнах і рекомендується людям з непереносимістю молока. Формула для новонароджених, яка містить варіант бета-казеїну А2, продається в Китаї та Австралії і рекламується як менш обтяжлива для

Молоко, що містить лише бета-казеїн варіанту А2, можна отримати шляхом штучного осіменіння корів-носіїв А2/А2. Зразки крові були зібрані від голштинно-фризьких корів з Італії. Генотип ДНК була екстрагована та використана для аналізу за допомогою специфічних праймерів, що були модифіковані для покращення ефективності аналізу. Коров'яче молоко А2 є доступним у деяких країнах і рекомендується людям з непереносимістю молока. Формула для новонароджених, яка містить варіант бета-казеїну А2, продається в Китаї та Австралії і рекламується як менш обтяжлива для

Молоко, що містить лише бета-казеїн варіанту А2, можна отримати шляхом штучного осіменіння корів-носіїв А2/А2. Зразки крові були зібрані від голштинно-фризьких корів з Італії. Генотип ДНК була екстрагована та використана для аналізу за допомогою специфічних праймерів, що були модифіковані для покращення ефективності аналізу. Коров'яче молоко А2 є доступним у деяких країнах і рекомендується людям з непереносимістю молока. Формула для новонароджених, яка містить варіант бета-казеїну А2, продається в Китаї та Австралії і рекламується як менш обтяжлива для

Молоко, що містить лише бета-казеїн варіанту А2, можна отримати шляхом штучного осіменіння корів-носіїв А2/А2. Зразки крові були зібрані від голштинно-фризьких корів з Італії. Генотип ДНК була екстрагована та використана для аналізу за допомогою специфічних праймерів, що були модифіковані для покращення ефективності аналізу. Коров'яче молоко А2 є доступним у деяких країнах і рекомендується людям з непереносимістю молока. Формула для новонароджених, яка містить варіант бета-казеїну А2, продається в Китаї та Австралії і рекламується як менш обтяжлива для

Молоко, що містить лише бета-казеїн варіанту А2, можна отримати шляхом штучного осіменіння корів-носіїв А2/А2. Зразки крові були зібрані від голштинно-фризьких корів з Італії. Генотип ДНК була екстрагована та використана для аналізу за допомогою специфічних праймерів, що були модифіковані для покращення ефективності аналізу. Коров'яче молоко А2 є доступним у деяких країнах і рекомендується людям з непереносимістю молока. Формула для новонароджених, яка містить варіант бета-казеїну А2, продається в Китаї та Австралії і рекламується як менш обтяжлива для

шлунково-кишкової системи дитини [30]. Для отримання молока, яке містить тільки бета-казеїн варіант А2, необхідно використовувати биків А2/А2 для штучного осіменіння корів-носіїв А2. Зразки цільної крові були зібрані від італійських голштино-фризьких корів з 17 ферм у центральній Італії. Геномна ДНК була екстрагована за допомогою High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche/Life Science, Мангейм, Німеччина) згідно з інструкціями виробника. Специфічні праймери для частин екзону 6 і 7 гена CSN2 були обрані з літератури та модифіковані за допомогою програмного забезпечення Primer Express® v3.0.1 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) для покращення ефективності аналізу [26].

Щоб змінити склад стада з метою виробництва молока, яке містить тільки β-казеїн варіант А2, необхідно використовувати биків А2/А2 для штучного осіменіння корів-носіїв А2. Італійська порода голштинська фризька забезпечує потрібний генетичний фон для збільшення частоти цього корисного алеля шляхом відповідного розведення [84].

У світі, голштинські тварини мають частоту бажаного алеля в діапазоні 0,5-0,6, а частота бажаного генотипу становить 35-40%. У швейцарських тварин ці показники значно вищі - частота бажаного алеля А2 складає 0,70-0,75, а генотипу А2А2 - приблизно 70%. Африканські та азіатські породи великої рогатої худоби мають дуже високу частоту алелі А2 та генотипу А2А2, яка становить 0,90-0,98. В деяких країнах сьогодні створюють молочні стада з гомозиготними тваринами А2А2 [63].

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є експериментальним методом молекулярної біології, який дозволяє значно збільшити малий обсяг бажаних фрагментів ДНК у біологічному матеріалі. Сучасні молекулярно-генетичні дослідження базуються на використанні ПЛР [11]. Для перевірки автентичності дорогих молочних продуктів під маркуванням "Молоко А2", рекомендується провести генотипування всіх молочних корів на фермі, щоб підтвердити, що всі вони мають гомозиготний генотип бета-казеїну А2А2. Також слід екранігувати комерційні молочні продукти на ринку, щоб переконатися в

відсутності варіантів бета-казеїну A1, B і C у продуктах під маркуванням "Молоко A2". Це необхідно для захисту споживачів від можливого шахрайства [64]. Цей метод дозволяє визначити, чи мають всі молочні корови на фермі гомозиготний генотип бета-казеїну A2A2. Також слід провести скринінг комерційних молочних продуктів на ринку, щоб переконатися, що вони не містять варіантів β -казеїну A1, B і C.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали досліджень

Дослідження проведені в лабораторії молекулярно-генетичних досліджень кафедри біології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України (НУБІП України).

Проведені комплексні дослідження з питань удосконалення методики виявлення в стадах великої рогатої худоби продуцентів А2 молока.

В якості об'єкту досліджень використовували корів голштинської породи (молочний напрямок продуктивності).

В якості основного методичного підходу використовували методи полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для електрофоретичного розподілу ампліфікованих фрагментів використовували електрофорез в агарозному гелі.

Для виконання досліджень використовували наступне обладнання:

1. Програмований термоциклер MiniAmp (Applied Biosystems);
2. Твердотільний термостат;
3. Настільна мікроцентрифуга;
4. Мікроцентрифуга типу вортекс;
5. Автоматичні піпет-дозатори змінного об'єму;
6. Блок живлення для камери для горизонтального електрофорезу Cleaver Scientific;
7. Камера для горизонтального електрофорезу Cleaver Scientific;
8. УФ-транспарювач;
9. Цифрова дзеркальна фотокамера DSLR Sony α330.

Експериментальна частина роботи складається з молекулярно-генетичного типування особин ВРХ та статистичному аналізі показнику молочної продуктивності (надій за дві лактації). Науково-господарський дослід був проведений на коровах голштинської породи (30 голів). Схема дослідження представлена на рис. 2.1.

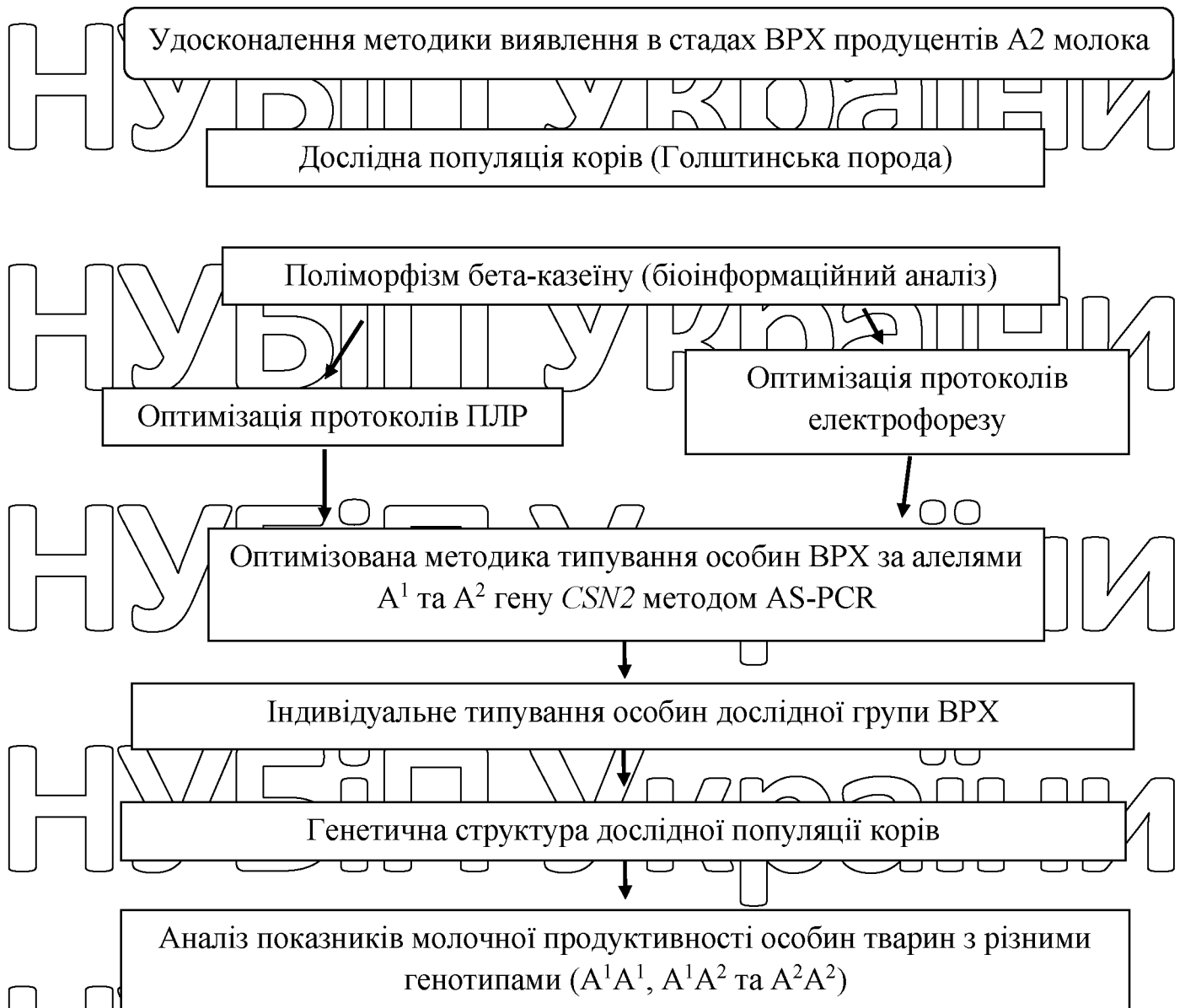


Рис. 2.1. Загальна схема досліджень

2.2 Методи лабораторних досліджень

У якості джерела ДНК використовували біологічний матеріал – цільну кров. Біологічний матеріал від кожної особини окремо пакували та маркували.

Кров отримували з господарства. Взяття біологічного матеріалу проводилося за використання вакуумної системи взятті крові BD Vacutainer в об'ємі 4 мл (рис. 2.2).



Рис. 2.2. Вакуумна система Emplab для взяття щільної (K3 EDTA) крові тварин

Виділення ДНК проводили з використанням комерційного набору реагентів ДНК-Сорб-В (AmpliSens) згідно з відповідним протоколом виробника (<https://interlabservice.ru/upload/iblock/318/DNA-sorb-B%20221217.pdf>).

Ефективність виділення ДНК визначали шляхом електрофорезу у 0,7 % агарозному гелі. Проби візуалізували за використання бромистого етидію в ультрафіолетовому спектрі.

Для ампліфікації дослідного фрагменту гену бета-казеїну (сировий екзон гену) використовували відповідні бігонуклеотиди (праїмери) (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Нуклеотидні послідовності олігонуклеотидів

Локус	Нуклеотидна послідовність
CSN2	(854 F) gccagatgagagaagtgagg; (854 A ¹) gatgttttggggaggctgttat;
	(854 A ²) gatgttttggggaggctgttag [59]

ПЛР здійснювали за відповідною програмою: 1 цикл: денатурація 94 °С 5 хв; 35 циклів: денатурація 94 °С 45 с, відпал/45 с 52-68 °С, елонгація 72 °С 45 с; 1 цикл – фінальна елонгація 72 °С 10 хв. Об'єм кінцевої суміші становив 20 μ Л, концентрація праймерів – 0,2 μ М у кожному випадку.

Для визначення найбільш ефективного протоколу ПЛР для визначення різних алельних варіантів бета-казеїну використовували наступні варіативні параметри різних етапів загальної ампліфікації (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Схема дослідів з оптимізації протоколів ампліфікації сьомого

екзону гену бета-казеїну

Протокол, №	Первинна денатурація	35 циклів			Фінальна елонгація
		Денатурація	Відпал	Елонгація	
1 серія дослідів					
1	94°C 5 хв	94°C 1 хв	55°C 1 хв	72°C 1 хв	72°C 5 хв
2	94°C 5 хв	94°C 1 хв	58°C 1 хв	72°C 1 хв	72°C 5 хв
3	94°C 5 хв	94°C 1 хв	61°C 1 хв	72°C 1 хв	72°C 5 хв
4	94°C 5 хв	94°C 1 хв	64°C 1 хв	72°C 1 хв	72°C 5 хв
5	94°C 5 хв	94°C 1 хв	67°C 1 хв	72°C 1 хв	72°C 5 хв
2 серія дослідів					
6	94°C 5 хв	94°C 45 с	55°C 45 с	72°C 45 с	72°C 5 хв
7	94°C 5 хв	94°C 45 с	58°C 45 с	72°C 45 с	72°C 5 хв
8	94°C 5 хв	94°C 45 с	61°C 45 с	72°C 45 с	72°C 5 хв
9	94°C 5 хв	94°C 45 с	64°C 45 с	72°C 45 с	72°C 5 хв
10	94°C 5 хв	94°C 45 с	67°C 45 с	72°C 45 с	72°C 5 хв
3 серія дослідів					
11	94°C 5 хв	94°C 30 с	55°C 30 с	72°C 30 с	72°C 5 хв
12	94°C 5 хв	94°C 30 с	58°C 30 с	72°C 30 с	72°C 5 хв
13	94°C 5 хв	94°C 30 с	61°C 30 с	72°C 30 с	72°C 5 хв
14	94°C 5 хв	94°C 30 с	64°C 30 с	72°C 30 с	72°C 5 хв
15	94°C 5 хв	94°C 30 с	67°C 30 с	72°C 30 с	72°C 5 хв

Продукти ампліфікації розділяли в агарозних гелях з різними концентраціями (від 1,5 до 3,5 %). Схему дослідів з оптимізації проведення гелів електрофорезу наведено в табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Схема дослідів з оптимізації параметрів електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації сьомого екзону гену бета-казеїну

Концентрація агарозного гелю	Параметри електрофорезу	
	Час	Напруга
1,5%	30 хв	120 V
	45 хв	150 V
2,0 %	30 хв	120 V
	45 хв	150 V
2,5%	30 хв	120 V
	45 хв	150 V
3,0 %	30 хв	120 V
	45 хв	150 V
3,5%	30 хв	120 V
	45 хв	150 V

Фарбування гелів здійснювали за використання бромистого етидію. Розмір ампліфікованих фрагментів ДНК визначали за використання маркеру молекулярних мас GeneRuler 50 bp (Thermo Fisher Scientific).

Генотипування проводили за аналізом отриманих електрофореграм.

2.3 Методи статистичних розрахунків

Частоти генотипів визначали за формулою 2.1.

Частота генотипу: $p_{AA} = \frac{n_{AA}}{N}$ (2.1)

p_{AA} – частота генотипу; n_{AA} – кількість особин з відповідним генотипом; N – загальна кількість особин (об'єм вибірки).

Частоти алелів визначали за формулами максимальної правдоподібності (2.2)

$$p_A = \frac{2n_{AA} + n_{AB}}{2N}$$

Частоти алелів визначали за формулами максимальної правдоподібності (2.3)

$$p_B = \frac{2n_{BB} + n_{AB}}{2N}$$

p_A, p_B – частоти відповідних алелів; n_{AA}, n_{BB} – кількість гомозиготних особин; n_{AB} – кількість гетерозиготних особин; $2N$ – кількість алелів (подвоєна кількість особин у дослідній групі) [9]

Генетичну рівновагу встановлювали за Харді-Вайнбергом: (2.4)

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p і q – частоти відповідних алелів.

Відповідність рівноважного стану популяції визначали з використанням критерію χ^2 за формулою:

$$\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E$$
 (2.5)

O – фактично виявлена кількість особин відповідного генотипу; E – очікувана кількість особин відповідного генотипу.

Рівень очікуваної гетерозиготності (H_e) виявляли за формулою: (2.6)

$$H_e = 2pq$$

Коефіцієнт інбридингу особин (індекс фіксації) визначали за формулою:

$$F_{is} = \frac{H_s - H_i}{H_s} \quad (2.7)$$

F_{is} – коефіцієнт інбридингу особин у субпопуляції; H_i – фактична гетерозиготність у субпопуляціях; H_s – очікувана гетерозиготність.

Аналіз популяційних параметрів проводили в середовище Microsoft Excel за використання GenAlEx 6.5 (<https://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html>) [48].

Аналіз показників продуктивності корів із різними генотипами за локусом бета-казеїну проводили за використання однофакторного дисперсійного аналізу. Розрахунки проводили у Microsoft Excel з використанням Real Statistics Resource Pack (<http://www.real-statistics.com/free-download/real-statistics-resource-pack/>). Перевірку розподілу на нормальність проводили за критерієм Шапіро-Уїлка [13]. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Для аналізу параметрів молочної продуктивності тварин визначали надій за 305 днів лактації (кг). Всього аналізували дані за двома лактаціями.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Біоінформаційний аналіз специфічності та ефективності гібридизації системи алель-специфічної Ц.ПР (AS-PCR) для типування алелів A¹ та A² локусу бета-казеїну

Біоінформатика – це інтегративний науковий напрямок, що об'єднує біологію, інформатику та статистику для аналізу та тлумачення біологічних даних. У сучасному світі біоінформатика відіграє важливу роль у дослідженнях геномів тварин, надаючи дослідникам потужні інструменти для аналізу нуклеотидних послідовностей. Геном є повною нуклеотидною послідовністю організму, і його декодування розкриває перед дослідниками численні таємниці та відкриває нові можливості в галузі біотехнології в цілому та тваринництва зокрема.

Один із ключових аспектів аналізу геномів тварин – це визначення генів та їх функцій. Біоінформатичні методи допомагають ідентифікувати гени та передбачати їх функції, використовуючи зіставлення з вже відомими генами інших видів. Це важливо для розуміння біологічних процесів і для пошуку генів, пов'язаних з різними захворюваннями та фенотипами.

Зовсім інший аспект аналізу нуклеотидних послідовностей геномів тварин – це дослідження еволюції. Порівняльний аналіз геномів різних видів дозволяє виявити зміни в генах та регуляторних ділянках, які могли сприяти адаптації до навколишнього середовища. Це допомагає зрозуміти, які гени відіграють ключову роль в еволюції різних видів та які адаптації були важливими для їхнього виживання.

Крім того, біоінформатика має велике значення для медицини та ветеринарії. Аналіз геномів тварин може допомогти в дослідженні захворювань, як у людей, так і у тварин. Це відкриває можливість розробки нових методів

діагностики та лікування. Крім того, дослідження геномів тварин сприяє збереженню біорізноманіття та аналізу особливостей генотипних популяцій різних видів.

Сучасні біоінформаційні інструменти дають можливість дослідникам працювати з величезними обсягами даних, отриманих під час секвенування геномів тварин. Однак цей аналіз не завжди є простим і вимагає фундаментальних знань в галузі молекулярної біології, систематики та статистики. Останнім часом, біоінформатика стає все більш популярною галуззю і у тваринництві, де вона є безпосереднім інструментом у загальному арсеналі молекулярно-генетичних досліджень.

У контексті досліджень магістерської роботи методи біоінформаційного аналізу ми використовували для аналізу ефективності гібридизації праймерів та специфічності фланкування фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну корів.

Для визначення параметрів (локалізація праймерів на дослідному фрагменті гену, специфічність реакції, результати аналізу значень температури відпаду праймерів за використання стандартних алгоритмів, які прописані в програмі) використовували online-інструментарій GenBank та програму Pick Primers.

Всі розрахунки здійснено на відповідній сторінці порталу NCBI (National Center for Biotechnology Information - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). В якості бази для проведення аналізу використовували персональний комп'ютер з операційною системою Windows 11 Pro.

Для аналізу дослідних параметрів використовували відповідні праймери, нуклеотидну структуру яких наведено у розділі «МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ» (табл. 2.1). Пошук ділянок гібридизації праймерів з геномною ДНК великої рогатої худоби проводили за використання референтної послідовності X14711.1 – Bovine beta-casein gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/X14711.1>).

Результати проведення аналізу за використання Pick Primers наведено на рис. 3.1

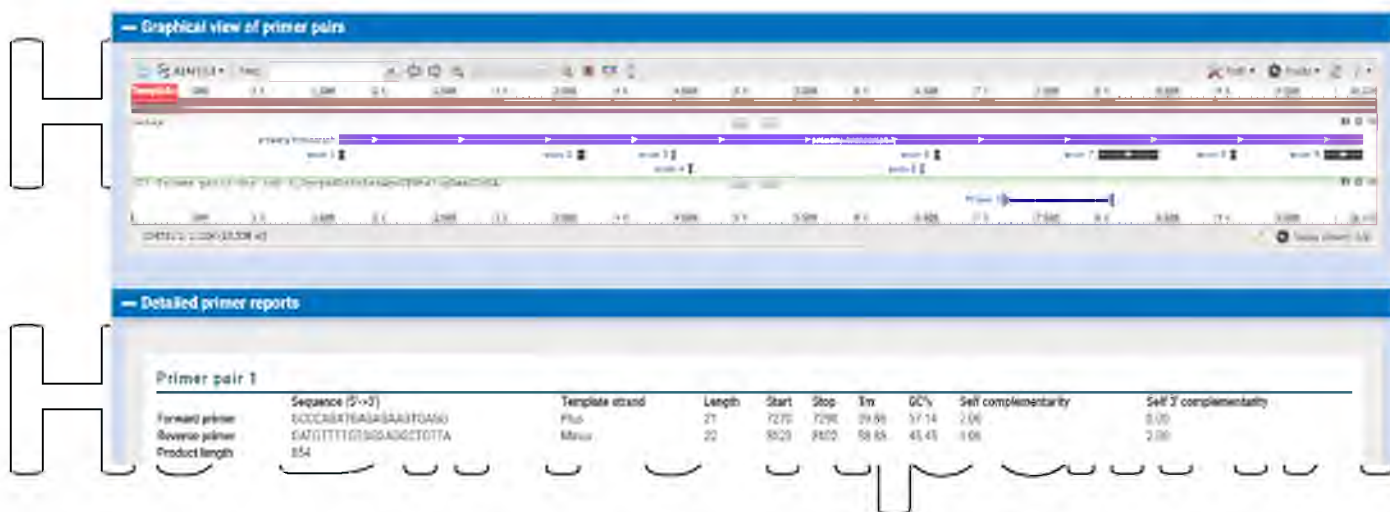


Рис. 3.1. Результати online підбору праймерів за використання

Pick Primers

За результатами використання методичних біоінформаційних підходів

встановлено, що запропонована праймерна система дає змогу з високим

ступенем точності фланкувати сьомий екзон гену бета-казеїну з утворенням фрагменту, розміром 854 пари нуклеотидів.

Слід відзначити, що оптимальна температура відпалу праймерів для кожного з олігонуклеотидів знаходиться у дуже близьких значеннях – 59,86 та

58,85°C відповідно. Близькі значення температур відпалу для прямого та зворотнього праймеру є дуже позитивною характеристикою обраної праймерної

системи та розкриває можливості підбору оптимальних параметрів алгоритмів ПЛР.

У свою чергу, результати аналізу гібридизації кожного з праймерів у

програмі Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) дають змогу відповідно встановити повну

відповідність обраної мішені (Bovine beta-casein gene), що вказує на їх високу

специфічність та можливість подальшого індивідуального типування особин великої рогатої худоби за обраним поліморфізмом.

За результатами аналізу специфічності обраної праймерної системи встановлено, що є, по меншій мірі, п'ять варіантів неспецифічної гібридизації (рис. 3.2 та рис. 3.3).

Products on potentially unintended templates

>XM_059882632.1 PREDICTED: Bos taurus zinc finger protein 248 (ZNF248), transcript variant X2, mRNA

```
product length = 3357
Forward primer  1      GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG  21
Template        6446  .GGG..G..-.....  6427

Reverse primer  1      GATGTTTTGTGGGAGGCTGTTA  22
Template        3090  T.....G.....T.T...  3111
```

>XM_005226261.5 PREDICTED: Bos taurus zinc finger protein 248 (ZNF248), transcript variant X1, mRNA

```
product length = 3357
Forward primer  1      GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG  21
Template        7293  .GGG..G..-.....  7274

Reverse primer  1      GATGTTTTGTGGGAGGCTGTTA  22
Template        3937  T.....G.....T.T...  3958
```

Рис. 3.2. Результати аналізу специфічності праймерів за використання Pick Primers (частина перша)

У всіх випадках праймери фланкують різні частини геному *Bos taurus*, що безпосередньо свідчить про максимальне значення відоспецифічності обраної системи.

Так, наприклад, на рис. 3.2 наведено результати фланкування з боку праймерів, що аналізуються, фрагментів гену, який кодує білкові модулі «цинкові пальці» (*Bos taurus*).

У свою чергу, на рис. 3.3 наведено результати з фланкування інших об'єктів, таких як фрагмент гену ліпооксигенази тощо.

Слід зазначити, що за всіма випадками неспецифічного фланкування фрагментів геному *Bos Taurus* ефективність гібридизації кожного з праймерів була не на рівні 100%, як у випадку з фрагментом свого екзону гену бета-

казеїну, що наведено на рис. 3.1. Кількість неспецифічних взаємодій варіювала залежно від об'єкту та від праймеру (прямий чи зворотний) та становила, в середньому, п'ять нуклеотидів.

>XM_024976762.2 PREDICTED: Bos taurus pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G5 (PLEKHG5), transcript variant X6, mRNA

product length = 1283
 Forward primer 1 GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG 21
 Template 1414 .GGAG..G..... 1434
 Forward primer 1 GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG 21
 Template 2696 TT.....GA..C..... 2676

>XM_059881070.1 PREDICTED: Bos taurus lipoxygenase homology PLAT domains 1 (LOXHD1), mRNA

product length = 1006
 Forward primer 1 GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG 21
 Template 7481 A....GG..T.....G.. 7501
 Forward primer 1 GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG 21
 Template 8486 TAA.....A..C..... 8466

>XM_059877394.1 PREDICTED: Bos taurus zinc finger protein 469 (ZNF469), transcript variant X3, mRNA

product length = 743
 Forward primer 1 GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG 21
 Template 67C.AG..C.A.... 87
 Forward primer 1 GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG 21
 Template 809 C.A.....GA..C..... 789

Рис. 3.3. Результати аналізу специфічності праймерів за використання

Prick Primers (частина друга)

Також, до додаткового позитивного моменту можна віднести той факт, що потенційні фланковані ділянки неспецифічних фрагментів геному відрізняються за розміром від цільового фрагменту гену бета-казеїну (854 п.н. проти 8357, 1283, 1006 та 743 п.н.), що створює передумови для їх ефективного диференціювання на електрофорезі.

Висновок до підрозділу 3.1. Встановлено, що використання праймерної системи AS-PCR 854 bp (GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG, CATGTTTGTGGGAGGCTGTTAT та GATGTTTGTGGGAGCCTGTTAG) дає змогу ефективно фланкувати фрагмент свого екзону гену бета-казеїну великої рогатої худоби, розміром у 854 п.н. Ефективна температура відпалу

праймерів (теоретично розрахована) складає 58,5 °С. Доведено високу специфічність праймерної системи, що аналізується, відносно бета-казеїну та повну її видоспецифічність відносно геному представників *Bos Taurus*.

3.2 Оптимізація протоколів проведення алей-специфічної ПЛР для типування алелів A¹ та A² гену бета-казеїну корів

За результатами аналітичних розрахунків переходимо до лабораторних випробувань з оптимізації протоколів ампліфікації фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну корів.

Для аналізу ефективності ампліфікації дослідного фрагменту проводили порівняльний аналіз інтенсивності флуоресценції ДНК у гелі за використання броміду етидію в якості інтеркалятора. Серію експериментів проводили за використання алгоритму, який наведено у табл. 2.2 розділу «Матеріали і методи дослідження».

За результатами проведених досліджень встановлено, що оптимальну картинку розподілу фрагментів ампліфікованої ДНК на електрофореграмі можна отримати за умови використання протоколів № 13 та № 14.

Використання інших протоколів дає картину, яку не можна безпомилково інтерпретувати (в наявності фрагменти ДНК для алелів, яких немає у використаних пробах).

Приклади електрофореграм наведено на рис. 3.4 та рис. 3.5.

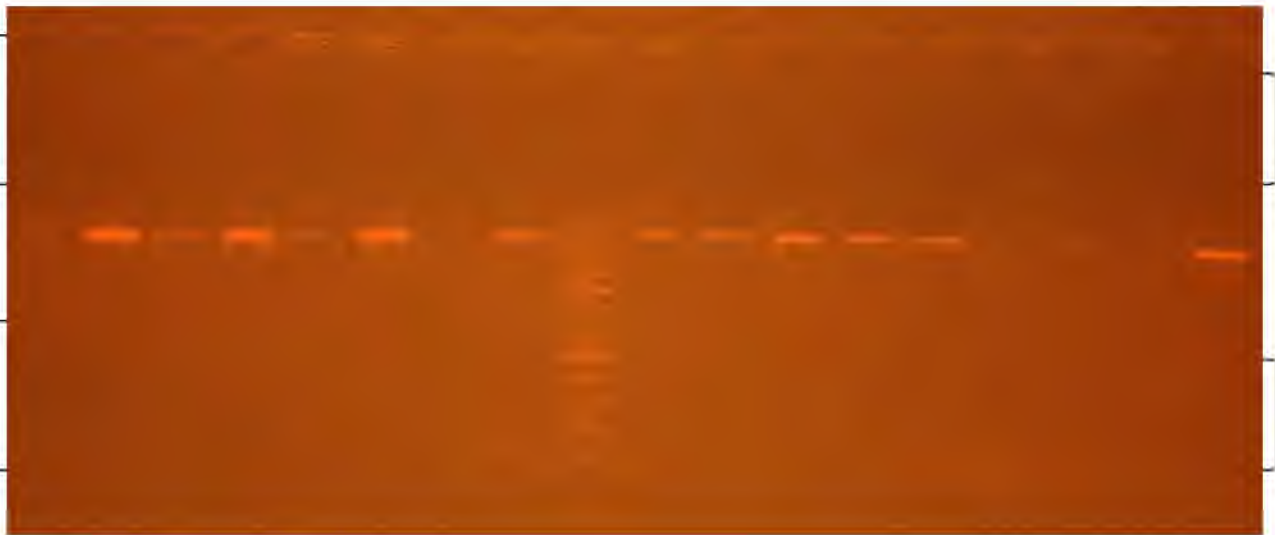


Рис. 3.4. Приклад електрофореграми ампліфікації сьомого екзону гену бета-казеїну корів (протокол №6 згідно таблиці 2.2)



Рис. 3.5. Приклад електрофореграми ампліфікації сьомого екзону гену бета-казеїну корів (протокол № 9 згідно таблиці 2.2)

У свою чергу, оптимальним протоколом є протокол 13 та 14 (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Оптимізований алгоритм проведення ампліфікації для детекції алелів A^1 та A^2 локусу бета-казеїну корів

Протокол, №	Первинна денатурація	Етапи ПЛР			
		Денатурація	Відпал	Елонгація	Фінальна елонгація
13	94°C 5 хв	94°C 30 с	61°C 30 с	72°C 30 с	72°C 5 хв
14	94°C 5 хв	94°C 30 с	64°C 30 с	72°C 30 с	72°C 5 хв

Саме використання вищевведених протоколів ПЛР дало змогу ефективно ампліфікувати дослідний фрагмент гену бета-казеїну та успішно встановити генотип кожної особини, які були проаналізовані.

Як ми бачимо в таблиці 3.1 для обох протоколів є характерним достатньо високі значення температур відпалу праймерів, які перевищують теоретично розраховані за використання програми *Pick Primer* майже на 2 та 6°C відповідно. Подальше збільшення температури відпалу не має сенсу, так як призводить до різкого падіння ефективності ампліфікації, що, у свою чергу, відображається майже у повній відсутності ампліфікованих фрагментів ДНК для обох алелів A^1 та A^2 .

За використання менших за значенням температур відпалу праймерів ніж у протоколі 13 приводить до ампліфікації обох типів алелів незалежно від генотипу особини, що аналізується. На цьому прикладі ми можемо побачити фактично класичний опис зменшення специфічності праймерної системи за рахунок зниження температури відпалу, що повністю відповідає стандартним уявленням про кінетику ПЛР.

На рис. 3.6 наведено електрофореграму продуктів рестрикції фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну за використання протоколу № 13.

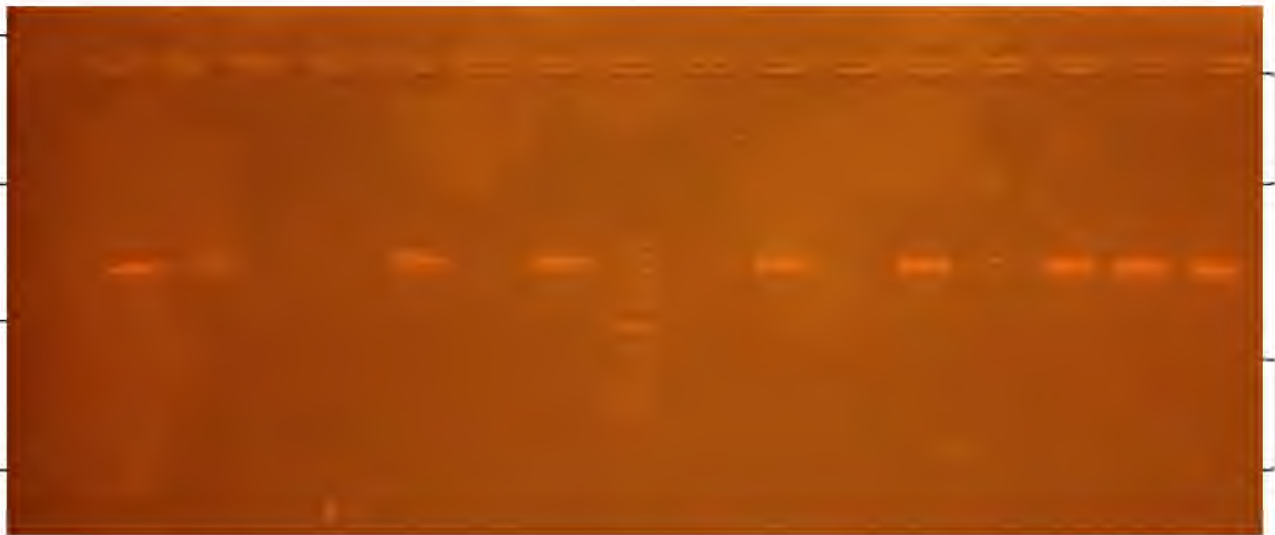


Рис. 3.6. Приклад електрофореграми ампліфікації сьомого екзону гену бета-казеїну корів (протокол № 13 згідно таблиці 2.2)

Як можна побачити на наведеної електрофореграмі, результати є інваріантними (тобто такими, що не мають альтернативного варіанту інтерпретації). Також слід відмітити високий рівень повторюваності результатів за умови використання однакових зразків та протоколу проведення ампліфікації результати ПЛР повністю співпадають один з одним.

Загалом, питання оптимізації протоколів ПЛР, після проведення відповідного біоінформаційного аналізу дослідних фрагментів геному, є дуже важливим у практичній роботі молекулярно-генетичній лабораторії. Деяко спрощуючи, можна стверджувати, що загальна ефективність ПЛР повністю залежить від оптимізації її параметрів. Проведені нами дослідження з оптимізації протоколів дали змогу підвищити загальну ефективність типування за рахунок наступних декількох факторів.

1. Збільшення специфічності ампліфікації:

Оптимізація ПЛР вдосконалює специфічність реакції. Це необхідно, оскільки навіть невеликі зміни у температурних умовах чи концентраціях реагентів можуть спричинити неспецифічну ампліфікацію. Наявність

неспецифічних продуктів ампліфікацію може викривити результати генотипування та ускладнити їх інтерпретацію.

2. Підвищення чутливості:

Оптимізація протоколів сприяє підвищенню чутливості ПЛР. Це означає, що можна виявити та ампліфікувати цільові фрагменти ДНК, навіть якщо їх концентрація у зразку дуже низька.

3. Покращення надійності результатів:

Оптимізація ПЛР також підвищує й надійність результатів. Це через те, що оптимальні умови реакції знижують ймовірність виникнення помилок. В генотипуванні надійність результатів грає важливу роль, оскільки вони можуть використовуватися в практиці комерційних аналізів.

4. Економія часу та ресурсів:

Оптимізація параметрів ПЛР також допомагає зекономити час та ресурси, що є особливо важливим як при проведенні досліджень у межах науково-дослідних робіт, так і при виконанні досліджень на замовлення (до одного з яких і відноситься генотипування особин великої рогатої худоби за локусом бета-казеїну).

На наступному етапі, в якості фінальної стадії процесу генотипування особин ВРХ проводили оптимізацію параметрів електрофорезу для розділення продуктів ампліфікації та, відповідно, для фінального визначення алельного стану бета-казеїну в окремих випадках.

В якості загальної схеми використовували дані таблиці 2.3 розділу «Матеріали і методи досліджень».

За результатами проведених експериментів визначено оптимальні параметри агарозного гель-електрофорезу за використання обраної праймерної системи. Результати досліджень у вигляді оптимізованих протоколів наведено у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Оптимізований алгоритм проведення електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації фрагмента гену бета-казеїну корів

Концентрація агарозного гелю	Параметри електрофорезу	
	Час	Напруга
1,5 %	30 хв	120 V
	45 хв	150 V

Як можна побачити з наведеної таблиці, для ефективного диференціювання окремих алельних варіантів цілком достатньо використання 1,5 %-ого агарозного гелю за умови проведення електрофорезу впродовж 30 хв

при напрузі в 120 V. Застосування саме цього алгоритму і було зафіксовано на рис. 3.6.

Слід зазначити, що використання вищеприписаного алгоритму може бути за умови наявності загальної мети з генотипування особин великої рогатої худоби.

Якщо, мета завдання включає до себе необхідність більш точного визначення розміру ампліфікованих алелів, то, у такому випадку, слід використовувати другий алгоритм, в якому час проведення електрофорезу складає 45 хв при напрузі в 150 V. Застосування такого підходу дасть змогу отримати більш деталізовану картинку та більш ретельно аналізувати особливості розмірів фрагментів алелів A^1 та A^2 , що має особливе значення у контексті проведення досліджень з порівняння ефективності використання різних праймерних систем для типування особин ВРХ.

Висновок до підрозділу 3.2. За результатами досліджень розроблено оптимізований алгоритм типування особин великої рогатої худоби за алельними варіантами A^1 та A^2 локусу бета-казеїну за використання методу алель-специфічної ПЛР (AS-PCR). Доведено, що для ефективною ампліфікації потрібно використовували температуру відпалу праймерів на матриці ДНК у межах 61-64°C впродовж 30 с в кожному циклі. Для ефективного розділення продуктів ампліфікації фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну запропоновано використання 1,5 %-ого агарозного гелю впродовж 30 хв при напрузі у 120 V.

3.3 Особливості генетичної структури популяції корів голштинської породи за локусом бета-казеїну

За використання оптимізованих алгоритмів ампліфікації проведено індивідуальне типування особин великої рогатої худоби голштинської породи за алельними варіантами A^1 та A^2 локусу бета-казеїну. Результати індивідуального типування наведено у табл. 3.3.

Приклад електрофореграми із результатами типування наведений на рис.

3.6 попереднього підрозділу.

Як слідує з результатів досліджень, у дослідній популяції корів в наявності особини зі всіма можливими генотипами – A^1A^1 , A^1A^2 та A^2A^2 відповідно (табл. 3.3).

Слід відмітити, що кількість особин з генотипом A^1A^1 значно менша за кількість особин з генотипами A^1A^2 та A^2A^2 . В цілому, картина виглядає наступним чином – особин з генотипом A^1A^1 виявлено 3 голови, з гетерозиготним генотипом A^1A^2 – 7 голів; з генотипом A^2A^2 – 8 голів. Тобто, особини з генотипом A^2A^2 є домінуючими за чисельністю у дослідній популяції корів.

Результати індивідуального типування особин великої рогатої худоби за локусом бета-казеїну

№	Генотип (за	№	Генотип (за локусом
1	A^2A^2	16	A^2A^2
2	A^2A^2	17	A^1A^2
3	A^2A^2	18	A^2A^2
4	A^2A^2	19	A^1A^2
5	A^1A^1	20	A^2A^2

6	A^2A^2	21	A^2A^2
7	A^1A^2	22	A^2A^2
8	A^2A^2	23	A^1A^2
9	A^2A^2	24	A^1A^2
10	A^2A^2	25	A^2A^2
11	A^2A^2	26	A^2A^2
12	A^2A^2	27	A^1A^1
13	A^2A^2	28	A^1A^2
14	A^2A^2	29	A^2A^2
15	A^1A^2	30	A^1A^1

У таблиці 3.4 наведено дані стосовно особливостей генетичної структури, а також показані результати аналізу на відповідність розподілу частот генотипів за дослідним локусом стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, що дає змогу оцінити загальний стан групи корів, що аналізується.

Результати аналізу генетичної структури популяції повністю підтверджують результати загального типування особин, що наведені у табл.

3.3. За отриманими даними можна зробити висновок, що дослідна популяція корів голштинської породи знаходиться в стані генетичної рівноваги, що, у свою чергу, свідчить про відсутність дії спрямованого відбору за локусом бета-казеїну.

Таблиця 3.4

Відповідність розподілу частот генотипів за локусом бета-казеїну стану генетичної рівноваги у дослідній популяції корів

Генотип	O	E	$(O-E)^2/E$	χ^2
A^1A^1	3	1,452	1,650	2,88
A^1A^2	7	10,296	1,055	

A^2A^2	20	18,252	0,167
----------	----	--------	-------

Примітка: O – фактична кількість особин тварин певного генотипу; E – очікувана кількість особин тварин певного генотипу

На рис. 3.7 наведено дані стосовно частот генотипів та алелів у дослідній популяції корів.

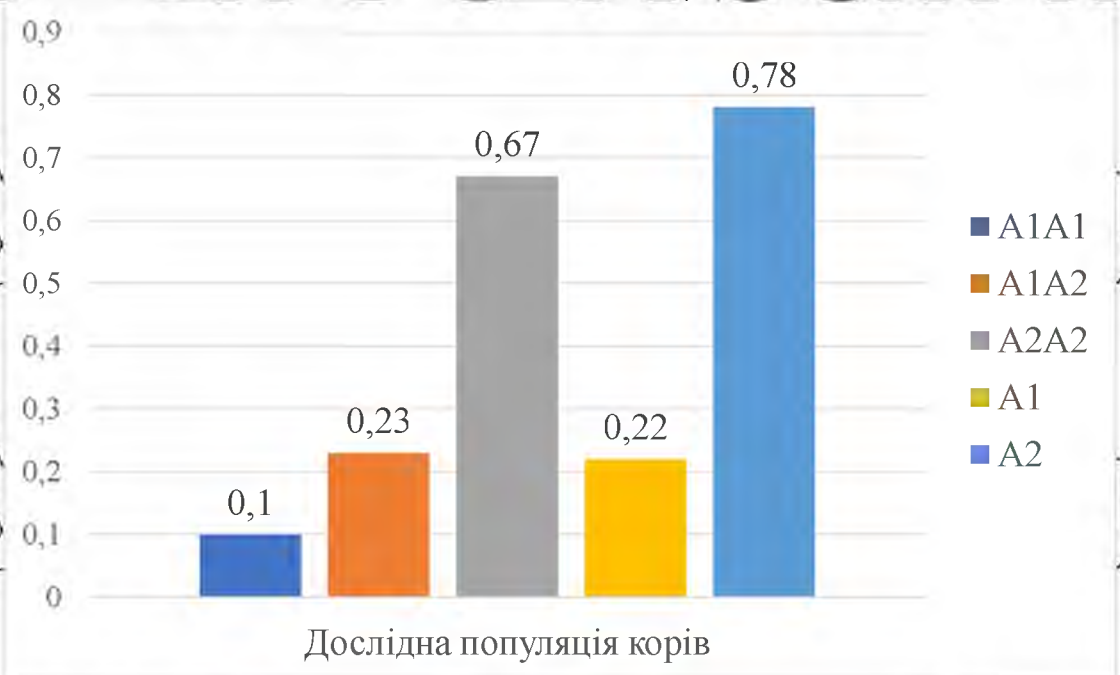


Рис. 3.7. Частоти генотипів та алелів за локусом бета-казеїну у дослідній популяції корів

Як слідує з наведеної діаграми, у дослідній популяції встановлено значне переваження частоти алеля A^2 у порівнянні з A^1 (0,78 проти 0,22). При цьому, домінування частоти алелю A^2 викликано, в першу чергу, саме значною відносною кількістю гомозиготних особин A^2A^2 .

Слід зазначити, що виявлені характеристики повністю підтверджуються результатами генетико-популяційного аналізу дослідній групи корів, які наведено у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Порода корів	C_a	n_e	H_o	H_e	F_{is}
--------------	-------	-------	-------	-------	----------

Голштинська порода	0,66	1,52	0,23	0,34	0,32
--------------------	------	------	------	------	------

Основні генетико-популяційні характеристики дослідної популяції корів за локусом бета-казеїну

Примітка: S_a – рівень гомозиготності; n_e – ефективна кількість алелів; H_o – фактична гетерозиготність; H_e – очікувана гетерозиготність; F_{is} – індекс фіксації Райта.

Згідно даних у таблиці, дослідна популяція тварин характеризується значним ексцесом гомозиготних особин (індекс фіксації Райта дорівнює 0,32; відповідно значення коефіцієнту інбридингу складає 32 %). При цьому, слід підкреслити, популяція знаходиться у стані генетичної рівноваги (табл. 3-4), що вказує на відсутність потенційних формуючих процесів за локусом бета-казеїну. Такий висновок підтверджується і значенням індексу поліморфності локусу (n_e – ефективна кількість алелів), який займає проміжне положення для класичних систем, які складаються з двох алелів на локус (мінімальне значення дорівнює 1,0; максимальне – 2,0).

Висновок до підрозділу 3.3. За результатами проведених досліджень виявлено особливості генетичної структури популяції корів голштинської породи за алельними варіантами локусу бета-казеїну. Встановлено домінування за значенням частоти алелю A^2 у порівнянні з A^1 , а також генотипу A^2A^2 над A^1A^1 та A^1A^2 . Відхилення дослідної популяції від рівноважного стану за Харді-Вайнбергом не зафіксовано. Розраховані основні генетико-популяційні характеристики дослідної популяції корів за локусом бета-казеїну.

3.4 Молочна продуктивність корів з різними генотипами за локусом бета-казеїну

На наступному етапі досліджень, з урахуванням результатів, які були отримані раніше (підрозділи 3.1, 3.2, 3.3), проводили аналіз показників молочної продуктивності корів із різними генотипами за локусом бета-казеїну.

Для аналізу продуктивності корів використовували показник стандартного надою для двох лактацій. Дані стосовно надою були отримані нами безпосередньо з господарства.

Для порівняння використовували особин великої рогатої худоби голштинської породи із різними генотипами за локусом бета-казеїну: A^1A^1 , A^1A^2 та A^2A^2 . Індивідуальне типування особин проводили раніше за схемою, яка описана у підрозділі 3.3.

Показники середнього надою корів із різними генотипами по групах наведено у табл. 3.6.

Таблиця 3.6
Показники середнього надою тварин з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами ($M \pm SE$)

Локус	Генотип		
	A^1A^1	A^1A^2	A^2A^2
CSN2	Перша лактація		
	$6811,0 \pm 342,01^a$	$8450,5 \pm 153,71^a$	$8314,2 \pm 354,03^a$
CSN2	Друга лактація		
	$9200,0 \pm 1240,59^a$	$9562,9 \pm 364,79^a$	$9895,3 \pm 486,72^a$

Примітка: різні індекси (a, b) вказують на відмінності різниці, збіг індексів вказує на відсутність вірогідної різниці

Кількість особин із різними генотипами по групах відповідала мінімальній, яка необхідна для проведення коректного статистичного аналізу.

Загальна кількість протипованих особин склала 30 голів. Для проведення статистичної обробки результатів перевіряли вибірку (окремо для кожної групи) на відповідність нормальному розподілу за використання тесту Шапіро-Уїлка.

За результатами аналізу встановлено, що для всіх дослідних підгруп (з підгрупи згідно кількості генотипів, що аналізуються – A^1A^1 , A^1A^2 та A^2A^2) розподіл значень відповідає нормальному, що, у свою чергу, дало нам змогу використовувати параметричні методи для проведення подальших досліджень.

В якості основного використовували однофакторний дисперсійний аналіз

(ANOVA). За результатами використання теста Левене виявлено однорідність дисперсії по групах, що є необхідною умовою для можливості використання дисперсійного аналізу. В якості post-hoc тесту використовували метод Тьюкі-Крамеру.

За результатами проведених досліджень з'ясовано, що незважаючи на наявні відмінності у показниках надою для особин зі всіма можливими генотипами, вірогідної різниці між ними відсутні. Так, для першої лактації, максимальні значення показнику надою були характерними для гетерозиготних особин A^1A^2 , найнижчі – для гомозигот A^1A^1 . Гомозиготні за алелем A^2

особини займають проміжне положення (табл. 3.6). Незважаючи на те, що різниця за значеннями надою між особинами з генотипом A^1A^1 та A^1A^2 досягає ~ 1500 кг відмінності не є вірогідними.

Стосовно другої лактації ситуація дещо змінюється. Максимальне значення параметру надою відмічене для особин з генотипом A^2A^2 , в той час як мінімальне – для особин з генотипом A^1A^1 . Гетерозиготні особини займають проміжне положення. Вірогідних відмінностей між значеннями надою для особин із різними генотипами не виявлено.

На нашу думку, відсутність вірогідних відмінностей у значеннях показнику виникає внаслідок незначної кількості особин з генотипом A^1A^1 ($n = 3$). Тому, цілком зрозуміло, що збільшення вибірки може призвести до декілька іншої картини (до наявності вірогідної різниці). Але, у будь-якому випадку, тенденція до підвищених значень показника надою для особин з генотипом A^2A^2 є, безумовно, позитивним фактором у контексті загального тренду сучасного молочного скотарства – використанню інструментарію маркер-асоційованої селекції для отримання нового типу органічної продукції – молока $A2$. Також до позитивних результатів відноситься факт відсутності контрпродуктивного ефекту від алелю A^2 , що дає змогу використовувати особин із відповідним генотипом для проведення роботи зі створення експериментальних стад корів-продукентів $A2$ молока.

Висновок до підрозділу 3.4. За результатами проведених досліджень з аналізу продуктивних якостей корів голштинської породи з різними генотипами за локусом бета-казеїну встановлена відсутність вірогідної різниці між особинами для двох лактацій. Виявлено тенденцію до превалювання значень показнику надою для особин з генотипом A^2A^2 у порівнянні з особинами з генотипом A^1A^1 . Доведено, що алель A^2 не має контрпродуктивного ефекту на показник надою для двох лактацій.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ IV

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Ефективне типування особин великої рогатої худоби за алельними варіантами локусу бета-казеїну залежить від цілої низки факторів, до яких відносяться наступні: ефективність гібридизації праймерів на матриці ДНК; відповідність стандарту високої специфічності гібридизації (специфічність гібридизації праймерів повинна складати 100 % для обраної мішені, а також не давати додаткових продуктів ампліфікації в межах розміру цільового фрагменту); відповідність стандарту видової специфічності (гібридизація праймерів повинна відбуватися лише з комплексом нуклеотидних послідовностей у відповідній базі даних представників одного виду); оптимальне значення температури відпалу праймерів, теоретичне значення якої повинно бути доповнено позитивними результатами лабораторної роботи. Саме для досягнення максимальної ефективності типування тварин у цьому контексті нами проведено дослідження із застосування методів біоінформатики зі застосуванням міжнародної бази даних Gen Bank, а також відповідного online-інструментарію (Pick Primers, Blast тощо). Дослідження з біоінформатики проведені у руслі сучасних трендів в галузі молекулярної біології та діагностики. За результатами проведених досліджень оцінено ефективність використання праймерної системи для алель-специфічної ПЦР (AS-PCR 854 bp: GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG, GATGTTTTGTGGGAGGCTGTTAT та GATGTTTTGTGGGAGGCTGTTAG). Встановлено, що її використання дає змогу ефективно фланкувати фрагмент сьомого екзону гену бета-казеїну великої рогатої худоби, розміром у 854 п.н. При цьому, відмічено мінімальну кількість потенційних неспецифічних продуктів, наявність яких не заважає ефективності типування особин внаслідок виражених відмінностей у розмірах цільового та неспецифічних ампліфкованих продуктів. Також, що є дуже важливим, встановлено максимальна видоспецифічність запропонованої системи відносно представників виду *Bos Taurus*. Ефективна температура

відпалу праймерів (теоретично розрахована) склала $58,5^{\circ}\text{C}$, що повністю підтверджується результатами лабораторних випробувань. Результати високої ефективності системи AS-PCR 854 bp підтверджуються низкою авторів Keating et al, 2008; Kulibaba et al, 2023 [59].

Оптимізований алгоритм дає змогу ефективно виявляти особин з різними генотипами A^1A^1 , A^1A^2 та A^2A^2 . За результатами використання алгоритму протиповано дослідну популяцію корів голштинської породи. За результатами типування показано значне переваження частоти алеля A^2 у порівнянні з A^1 (0,78 проти 0,22). При цьому, домінування частоти алелю A^2 викликано, в першу чергу, саме значною відносною кількістю гомозиготних особин A^2A^2 . Слід зазначити, що результати досліджень відповідають результатам, отриманим іншими авторами на породах великої рогатої худоби української селекції [4, 5, 7, 8]. Результати проведених досліджень вказують на залежність наявної генетичної структури за локусом бета-казеїну з направленням та інтенсивністю селекційної роботи, яка проводиться з дослідною популяцією корів.

Додатково до всього вищезазначеного, результати статистичної обробки показнику стандартного надою за дві лактації для особин із різними генотипами за локусом бета-казеїну свідчать про відсутність контрпродуктивного ефекту відносно молочної продуктивності з боку алелю A^2 . Більш того, значення надою у особин з гомозиготним генотипом A^2A^2 перевищували значенням показнику для особин з генотипом A^1A^1 . Слід зазначити, що вірогідної різниці не відмічено, що, на нашу думку, пов'язано з незначною кількістю особин з генотипом A^1A^1 (незначна кількість особин призводить до суттєвого збільшення значення стандартної похибки). Незважаючи на відсутність вірогідності різниці, в цілому зафіксовано тенденцію до переважання особин за значенням надою для обох лактацій. У будь-якому разі, результати досліджень підкреслюють перспективність проведення подальших експериментів із аналізу продуктивних якостей особин із різними генотипами за умови суттєвого збільшення вибірки.

Отримані результати досліджень безпосередньо вказують на ефективність проведення селекційної роботи зі створення стад корів-продуцентів А2 молока за рахунок відбору особин з гомозиготним генотипом А²А². За відсутності контрпродуктивного ефекту з боку алеля А² ризику отримання експериментальної групи тварин, які є продуцентами А2 молока на тлі низьких значень загальної молочної продуктивності, фактично, зведено до мінімуму (щонайменше для дослідної популяції корів голштинської породи). Але, потенційний коригуючий ефект генного оточення призводить до необхідності проведення подальших досліджень в напрямку аналізу комплексних генотипів.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВИСНОВКИ

НУБІП України

1. За результатами проведених комплексних досліджень розроблено оптимізований алгоритм типування особин великої рогатої худоби за алельними варіантами A^1 та A^2 локусу бета-казеїну за використання праймерної системи AS-PCR 854 bp, виявлено особливості генетичної структури популяції корів голштинської породи, проаналізовано показники стандартного надою за дві лактації для особин із різними генотипами.

НУБІП України

2. Встановлено, що використання праймерної системи AS-PCR 854 bp (GCCCAGATGACAGAGAAGTGAGG, GATGTTTTGTGGGAGGGCTGTTAT та GATGTTTTGTGGGAGGGCTGTTAG) дає змогу ефективно фланкувати фрагмент сьомого екзону гену бета-казеїну великої рогатої худоби, розміром у 854 п.н. Ефективна температура відпалу праймерів (теоретично розрахована) складає 58,5 °C. Доведено високу специфічність праймерної системи, що аналізується, відносно бета-казеїну та повну її видоспецифічність відносно геному представників *Bos Taurus*.

НУБІП України

3. За результатами досліджень розроблено оптимізований алгоритм типування особин великої рогатої худоби за алельними варіантами A^1 та A^2 локусу бета-казеїну за використання методу алель-специфічної ДЛП (AS-PCR). Доведено, що для ефективної ампліфікації потрібно використовувати температуру відпалу праймерів на матриці ДНК у межах 61-64 °C впродовж 30 с в кожному циклі. Для ефективного розділення продуктів ампліфікації фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну запропоновано використання 1,5 %-ого агарозного гелю впродовж 30 хв при напрузі у 120 V.

НУБІП України

4. Виявлено особливості генетичної структури популяції корів голштинської породи за алельними варіантами локусу бета-казеїну. Встановлено домінування за значенням частоти алелю A^2 у порівнянні з A^1 , а також генотипу A^2A^2 над A^1A^1 та A^1A^2 . Відхилення дослідній популяції від рівноважного стану за Харді-Вайнбергом не зафіксовано. Розраховані основні

НУБІП України

5. Висновки досліджень, проведених у рамках проекту, свідчать про те, що розроблений алгоритм типування особин великої рогатої худоби за алельними варіантами A^1 та A^2 локусу бета-казеїну за використання праймерної системи AS-PCR 854 bp є ефективним та специфічним. Доведено високу специфічність праймерної системи, що аналізується, відносно бета-казеїну та повну її видоспецифічність відносно геному представників *Bos Taurus*. Для ефективного розділення продуктів ампліфікації фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну запропоновано використання 1,5 %-ого агарозного гелю впродовж 30 хв при напрузі у 120 V.

НУБІП України

6. Виявлено особливості генетичної структури популяції корів голштинської породи за алельними варіантами локусу бета-казеїну. Встановлено домінування за значенням частоти алелю A^2 у порівнянні з A^1 , а також генотипу A^2A^2 над A^1A^1 та A^1A^2 . Відхилення дослідній популяції від рівноважного стану за Харді-Вайнбергом не зафіксовано. Розраховані основні

НУБІП України

7. Висновки досліджень, проведених у рамках проекту, свідчать про те, що розроблений алгоритм типування особин великої рогатої худоби за алельними варіантами A^1 та A^2 локусу бета-казеїну за використання праймерної системи AS-PCR 854 bp є ефективним та специфічним. Доведено високу специфічність праймерної системи, що аналізується, відносно бета-казеїну та повну її видоспецифічність відносно геному представників *Bos Taurus*. Для ефективного розділення продуктів ампліфікації фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну запропоновано використання 1,5 %-ого агарозного гелю впродовж 30 хв при напрузі у 120 V.

генетико-популяційні характеристики дослідної популяції корів за локусом бета-казеїну.

НУБІП України

5. За результатами проведених досліджень з аналізу продуктивних якостей корів голштинської породи з різними генотипами за локусом бета-казеїну встановлена відсутність вірогідної різниці між особинами для двох лактацій. Виявлено тенденцію до превалювання значень показнику надою для особин з генотипом A^2A^2 у порівнянні з особинами з генотипом A^1A^1 . Доведено, що алель A^2 не має контрпродуктивного ефекту на показник надою для двох лактацій.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

НУБІП України

З метою проведення типування особин великої рогатої худоби за алельними варіантами A¹ та A² локусу бета-казеїну за використання методу

НУБІП України

алель-специфічної ПЛР (AS-PCR) рекомендується застосовувати оптимізований алгоритм та праймерну систему AS-PCR-854 bp. Для ефективної ампліфікації використовувати температуру відпалу праймерів на матриці ДНК у межах 61-64°C впродовж 30 с в кожному циклі. Для ефективного розділення продуктів

НУБІП України

напрузі у 120 V

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Анастасія Кириєнко. «Ідеальний молочний продукт: в Україні почали

виробляти

молоко

A2.»

URL:

<https://www.google.com.ua/url?sa=t&rc=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2a>

[h_KEwiM55K2oq2AAxUyIMMKHf2IAj0QFnoECSBwQAO&url=https%3A%2F%2F](https://www.fagroportal.ua/%2Fru%2Fpublishing%2Flichnyi-vzglvad%2Fidealnyi-molochnyi-)

[Fagroportal.ua/%2Fru%2Fpublishing%2Flichnyi-vzglvad%2Fidealnyi-molochnyi-](https://www.fagroportal.ua/%2Fru%2Fpublishing%2Flichnyi-vzglvad%2Fidealnyi-molochnyi-produkt-v-ukraine-nachali-proizvodit-moloko-)

[a2&usg=AOvVaw38R50vnWyblWsbTIx1bC7S&opi=89978449](https://www.fagroportal.ua/%2Fru%2Fpublishing%2Flichnyi-vzglvad%2Fidealnyi-molochnyi-produkt-v-ukraine-nachali-proizvodit-moloko-a2&usg=AOvVaw38R50vnWyblWsbTIx1bC7S&opi=89978449) Дата звернення:

20.11.2020.

2. Віктор Досенко, професор, доктор медичних наук, завідувач відділу загальної та молекулярної фізіології імені Богомольця, під час XIII

Міжнародного Молочного конгресу. URL: <http://milkua.info/uk/post/moloko-a2->

[najbils-bezpecne-dla-organizmu-ludini-za-sucasnimi-uavlennami-viktor-dosenko](http://milkua.info/uk/post/moloko-a2-najbils-bezpecne-dla-organizmu-ludini-za-sucasnimi-uavlennami-viktor-dosenko)».

Дата звернення- 13.04.2020.

3. Гончаренко І. В. Генетичні аспекти системної оцінки молочних корів племінного стада. – К.: Аграрна наука. 2004. С. 56.

4. Кулібаба Р.О., Сахацький М.І., Ляшенко Ю.В. Аналіз розподілу частот гаплотипів за локусами CSN2 та CSN3 у популяції корів української чорно-рябої молочної породи. *Науково-технічний бюлетень ІТ НААН*. 2022. №128. С. 94–104. doi:10.32900/2312-8402-2022-128-94-104

5. Кулібаба Р. О., Ляшенко Ю. В., Сахацький М. І. Використання результатів генетико-популяційних досліджень для оцінки селекційної роботи у популяціях корів молочних порід. *Науково-технічний бюлетень ІТ НААН*. 2023. №129. С. 103–114

6. Кононова Л.В., Сычова О.В., Омарова Р.С. Необыкновенное коровье молоко. *Молочная река*. 2016. No 3 (63). С.62–64.

7. Ладика В.І. Молоко А2 як альтернатива козиному у виробництві йогуртів. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Харчові технології*, 2020, т.22, No 94. С. 18-22.

8. Ладика В.І., Павленко Ю.М., Древицька Т.І., Досенко В.Є., Склярєнко Ю.І. Дослідження поліморфізму гена бета-казеїну та його зв'язок зі складом молока у корів. Збірник наукових праць «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва», 2021. № 27 С. 92-100.

9. Меркурьева Е. К. Генетические основы селекции в скотоводстве. Москва: Колос, 1997. 240 с.

10. Огляд заходів. «Всеукраїнський молочний форум (UDE) – 2020». [file:///C:/Users/Администратор/Downloads/Oglyad_zachodiv_Molochnyj_forum_2020%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Администратор/Downloads/Oglyad_zachodiv_Molochnyj_forum_2020%20(2).pdf).

11. Олещук, О. М., Мудра, А. Є., & Зозуляк, Н. Б. (2015). ПЛР-діагностика: принципи, досягнення та перспективи. *Медична хімія*, 16(3).

12. Осинцев А. М. Теоретические и экспериментальные исследования коагуляции молока [Текст] // Диссертация на соискание ученой степени д.т. н.-К., 2005-324 с.

13. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: «МедиаСфера», 2002. 312с.

14. Звягинцева Т.Д. Синдром раздраженного кишечника: современные аспекты диагностики и лечения // Здоров'я України. — 2007 — No 7/1. — С. 3—5.

15. Тепел Альфред. Химия и физика молока / А. Тепел, ред. С. А.Фильчакова. : [пер. с нем]. – СПб. : Профессия, 2012. – 832 с.

16. Шемов А. В. Поліморфізм мікросателітних локусів ДНК у різних видів сільськогосподарських тварин. *Розведення і генетика тварин*. 2015. Вип. 50. С. 183-190.

17. Шумейко В.М. Особливості стратегічних пріоритетів маркетингового менеджменту переробних підприємств / В.М. Шумейко // Маркетинг інновацій в маркетингу: Зб. тез доповідей Міжнародної наук.-практ. конф., 27-29 верес. 2012 р.-Суми:Папірус,2012.-С. 295-297.

18. Эндрю Джон Кларк, Малав Сучин Триведи «Бета-казеин А2 и предотвращение воспаления кишечника». URL: <https://patents.google.com/patent/RU2669553C2/ru>

19. Carotid Intima-Media Thickness: An Index for Subclinical Atherosclerosis in Type 1 Diabetes / S. Abdelghaffar et al. *Journal of Tropical Pediatrics*. 2005. Vol. 52, no. 1. P. 39-45. URL: <https://doi.org/10.1093/tropej/fmi071>

20. Adamski MG, Borratynska A, Krupa M, Wloch-Kopec D, Turaj W, Wolkow P, Wnuk M, Urbanik A, Moskala M, Szczudlik A, Slowik A. A1/A2 polymorphism of GpIIIa gene and a risk of aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 May 29;383(2):228-30. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.156. Epub 2009 Apr 5. PMID: 19345676.

21. Bell SJ, Grochoski GT, Clarke AJ. Health implications of milk containing beta-casein with the A2 genetic variant. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006;46(1):93-100. doi: 10.1080/10408390591001144. PMID: 16403684

22. Berkey CS, Colditz GA, Rockett HRH, Frazier AL, Willett WC. Dairy consumption and femal height growth: prospective cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2009;18:1881-7.

23. Bonfatti V., Degano L., Menegoz A., Carnier P. Mid-infrared spectroscopy prediction of fine milk composition and technological properties in Italian Simmental. *J. Dairy Sci*. 2016;99:8216-8221. doi: 10.3168/jds.2016-10953.

24. Brooke-Taylor S., Dwyer K., Woodford K., Kost N. Systematic Review of the Gastrointestinal Effects of A1 Compared with A2 β -Casein. *Adv. Nutr*. 2017;15:739-748. doi: 10.3945/an.116.013953

25. Caffarelli C, Baldi F, Bendandi B, Calzone L, Marani M, Pasquinelli P. Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. *Ital J pediatr* 2010.

26. Canavesi F. Selezionare per produrre latte A2. *Professione Allevatore*. 2016;16:52-54.

27. Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J. Invited review: Milk protein polymorphism in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J. Dairy Sci.* 2009;92:5335-5352. doi: 10.3168/jds.2009-2461.

28. Cattaneo S, Masotti F, Stuknytė M, De Noni I. Impact of in vitro static digestion method on the release of β -casomorphin-7 from bovine milk and cheeses with A1 or A2 β -casein phenotypes. *Food Chem.* 2023 Mar 15;404(Pt A):134617. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134617. Epub 2022 Oct 17. PMID: 36444023.

29. Cecchinato A, Bobbo T, Ruegg PL, Gallo L, Bittante G, Pegolo S. Genetic variation in serum protein pattern and blood β -hydroxybutyrate and their relationships with udder health traits, protein profile, and cheese-making properties in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 2018 Dec;101(12):11108-11119. doi: 10.3168/jds.2018-14907. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30316608.

30. Chessa S., Chiatti F., Ceriotti G., Caroli A., Consolandi C., Pagnacco G., Castiglioni B. Development of a Single Nucleotide Polymorphism genotyping microarray platform for the identification of bovine milk protein genetic polymorphisms. *J. Dairy Sci.* 2007;90:451-464. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)72647-4.

31. Chia JSJ, McRae JL, Kukuljan S, Woodford K, Elliott RB, Swinburn B, Dwyer KM. A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes. *Nutr Diabetes.* 2017 May 15;7(5):e274. doi: 10.1038/nutd.2017.16. PMID: 28504710; PMCID: PMC5518798.

32. Cieslinska A., Sienkiewicz-Szlapka E., Wasilewska J., Fiedorowicz E., Chwała B., Moszyńska-Dumara M., Kostyra E. Influence of candidate polymorphisms on the dipeptidyl peptidase IV and μ -opioid receptor genes expression in aspect of the β -casomorphin-7 modulation functions in autism. *Peptides.* 2015;65:6-11. doi: 10.1016/j.peptides.2014.11.012.

33. Dai R., Fang Y., Zhao W, Liu S., Ding J., Xu K., Yang L., He C., Ding F., Meng H. Identification of alleles and genotypes of beta casein with DNA sequencing analysis in Chinese Holstein cow. *J. Dairy Res.* 2016. Vol.8(3). P. 312-316.

34. Dantas A, Kumar H, Prudencio ES, de Avila LB Junior, Orellana-Palma P, Dosoky NS, Nepovimova E, Kuča K, Cruz-Martins N, Verma R, Manickam S, Valko M, Kumar D. An approach on detection, quantification, technological properties, and trends market of A2 cow milk. *Food Res Int*. 2023 May;167:112690. doi: 10.1016/j.foodres.2023.112690. Epub 2023 Mar 14. PMID: 37087212.

35. De Noni, R.J., FitzGerald, H.J.T., Korhonen, Y., Le Roux, C.T. Scientific Report of EFSA prepared by a DATEX Working Group on the potential health impact of casomorphins and related peptides. *EFSA Sci. Rep.* 2009. P 231, 1–107.

36. de Vasconcelos ML, Oliveira LMFS, Hill JP, Vidal AMC. Difficulties in Establishing the Adverse Effects of β -Casomorphin-7 Released from β -Casein Variants-A Review. *Foods*. 2023 Aug 22;12(17):3151. doi: 10.3390/foods12173151. PMID: 37685085; PMCID: PMC10486734.

37. Deth R., Andrew Clarke A., Jiayi N.J., Trivedi M. Clinical evaluation of glutathione concentrations after consumption of milk containing different subtypes of β -casein: Results from a randomized, cross-over clinical trial. *Nutr. J* 2016;15:82–87. doi: 10.1186/s12937-016-0201-x.

38. Du Z, Xu N, Yang Y, Li G, Tai Z, Li N, Sun Y. Study on internal structure of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *Int J Biol Macromol*. 2023 Jan 1;224:437-452. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.135. Epub 2022 Oct 21. PMID: 36273550.

39. Effects of β -k-casein (CSN2-CSN3) haplo types and β -lactoglobulin (BLG) genotypes on milk production traits and detailed protein composition of individual milk of Simmental cows / Bonfatti V., et al. *Journal of Dairy Science*. 2010. Vol. 93. No. 8. P. 83797–3808. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2778/>

40. Elliott R. B., Harris D. P., Hill J. P. Type I insulin dependent diabetes mellitus and cow milk: Casein variant consumption. *Diabetologia*. 1999. Vol. 42, No 3. P. 292– 296.

41. European Food Safety Authority Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. *EFSA Sci. Rep.* 2009;231:1–107.

42. Fernández-Rico S, Mondragón ADC, López-Santamarina A, Cardelle-Cobas A, Regal P, Lamas A, Ibarra JS, Cepeda A, Miranda JM. A2 Milk: New Perspectives for Food Technology and Human Health. *Foods*. 2022 Aug 9;11(16):2387. doi: 10.3390/foods11162387. PMID: 36010390; PMCID: PMC9407547.

43. Frank O, Nuttall. Body Mass Index, Obesity, BMI, and Health: A Critical Review. Published online 2015.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4890841/>

44. Genetic Polymorphism of β -Casein Gene in Polish Red Cattle-Preliminary Study of A₁ and A₂ Frequency in Genetic Conservation / Cieslinska A., et al. *Herd Animals*. 2019. No 9.77 p. Doi:<https://doi.org/10.3390/ani9060377>.

45. Giglioti R, Gutmanis G, Katiki LM, Okino CH, de Sena Oliveira MC, Vercesi Filho AE. New high-sensitive rhAmp method for A₁ allele detection in A₂ milk samples. *Food Chem*. 2020 May 30;313:126167. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126167. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31951885.

46. Giglioti R, Hiromi Okino C, Tainá Azevedo B, Gutmanis G, Morita Katiki L, Cristina de Sena Oliveira M, Eugênio Vercesi Filho A. Novel LNA probe-based assay for the A₁ and A₂ identification of β -casein gene in milk samples. *Food Chem (Oxf)*. 2021 Nov 28;351:100055. doi:

47. Guantario, B., Giribaldi, M., Devirgilis, C., Finamore, A., Colombino, E., Capuechio, M., Evangelista, R., Motta, V., Zinno, P., Cirrincione, S., Antoniazzi, S., Cavallarin, L., Roselli, M. (2020). A Comprehensive Evaluation of the Impact of Bovine Milk Containing Different Beta-Casein Profiles on Gut Health of Ageing Mice. *Nutrients*. Vol. 12(7), pp. 2–19. DOI:10.3390/nu1207214.

48. Hamilton M.B. *Population genetics*. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009. 424p.

49. Hollar CM, Law AJ, Dalgleish DG, Medrano JF, Brown RJ. Separation of beta-casein A₁, A₂, and B using cation-exchange fast protein liquid chromatography. *J Dairy Sci*. 1991 Oct;74(10):3308-13. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)7851742. PMID: 1744261.

50. Ivano De Noni, Richard J. FitzGerald, Hannu J. T. Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA, 2009.

51. Jia W, Du A, Fan Z, Shi L. Novel top-down high-resolution mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics reveal molecular change mechanism in A2 milk after CSN2 gene mutation. Food Chem. 2022 Oct 15;391:133270. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133270. Epub 2022 May 21. PMID: 35640340.

52. Jiménez-Montenegro L, Alfonso L, Mendizabal JA, Urrutia O. Worldwide Research Trends on Milk Containing Only A2 β -Casein: A Bibliometric Study. Animals (Basel). 2022 Jul 27;12(15):1909. doi: 10.3390/ani12151909. PMID: 35953898; PMCID: PMC9367265.

53. Jose A. L. Calbet, Editor. Food Composition of the Diet in Relation to Changes in Waist Circumference Adjusted for Body Mass Index. Published online 2011, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3157378/>

54. Kamiński S, Cieslińska A, Kostyra E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. J Appl Genet. 2007;48(3):189-98. doi: 10.1007/BF03195213. PMID: 17666771.

55. Kamiński, S., Cieslińska, A., Kostyra, Oleński Milk from cows of different β -casein genotypes as a source of β -casomorphin-7. Int J Food Sci Nutr. 2012 Jun;63(4):426-30. doi: 10.3109/09637486.2011.634785. Epub 2011 Nov 14. PMID: 22080615.

56. Kaskous S. A1- and A2-Milk and Their Effect on Human Health. Journal of Food Engineering and Technology. 2020. Vol. 9(1). P. 15–21. DOI:10.32732/jfet.2020.9.1.15.

57. Kay SS, Delgado S, Mittal J, Eshraghi RS, Mittal R, Eshraghi AA. Beneficial Effects of Milk Having A2 β -Casein Protein: Myth or Reality? J Nutr. 2021 May 11;151(5):1061-1072. doi: 10.1093/jn/nxaa454. PMID: 33693747.

58. Khan R, De S, Dewangan R, Tamboli R, Gupta R. Potential status of A1 and A2 variants of bovine beta-casein gene in milk samples of Indian cattle breeds.

Anim Biotechnol. 2023 Apr 18;1:1-7. doi: 10.1080/10495398.2023.2200502. Epub ahead of print. PMID: 37071545.

59. Kulibaba R, Sakhatskyi M, Liashenko Y. Comparative analysis of A1 and A2 allele detection efficiency for bovine CSN2 gene by AS-PCR methods. *Acta Biochimica Polonica*. 2023. Vol. 70(1). P. 205-209. DOI: 10.18388/abp.2020_6530

60. Kulibaba R, Sakhatskyi M, & Liashenko Yu. (2023). Analysis of genotyping features of bovine cattle individuals at the CSN2 locus using ACS-PCR methods. *Animal Science and Food Technology*, 14(2), 44-56. doi: 10.31548/animal.2.2023.44.

61. Kullenberg de Gaudry D., Lohner S., Schmucker C., Kapp P., Motschall E., Horrlein S., Roger C., Meerpohl J.J. Milk A1 b-casein and health-related outcomes in humans: A systematic review. *Nutr. Rev.* 2019;77:278-306. doi: 10.1093/nutrit/nuy063.

62. Ladyka V, Pavlenko Y, Sklyarenko Y (2021) β -casein gene polymorphism use in terms of brown dairy cattle preservation. *Arch. Zootec.* 70(269): 88-94.

63. Le Guillou S, Leduc A, Laubier J, Barbey S, Rossignol MN, Lefebvre R, Marthey S, Laloë D, Le Provost F. Characterization of Holstein and Normande whole milk miRNomes highlights breed specificities. *Sci Rep*. 2019 Dec 30;9(1):20345. doi: 10.1038/s41598-019-56690-7. PMID: 31889100; PMCID: PMC6937266.

64. Luo D, Huang X, Mao Y, Chen C, Li F, Xu H, Xiong Y. Two-step large-volume magnetic separation combined with PCR assay for sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *J Dairy Sci*. 2017 Oct;100(10):7883-7890. doi: 10.3168/jds.2017-13140. Epub 2017 Aug 10. PMID: 28803008.

65. Martínez Vázquez SE, Nogueira de Rojas JR, Remes Troche JM, Coss Adame E, Rivas Ruíz R, Uscanga Domínguez LF. The importance of lactose intolerance in individuals with gastrointestinal symptoms. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed)*. 2020 Jul-Sep;85(3):321-331. English, Spanish.

doi:10.1016/j.rgmx.2020.03.002. Epub 2020 May 29. PMID: 32482516.

66. Massella E, Piva S, Giacometti F, Liuzzo G, Zambrini AV, Serraino A. Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in

northern Italy. *Ital J Food Saf.* 2017 Sep 29;6(3):6904. doi: 10.4081/ijfs.2017.6904. PMID: 29071248; PMCID: PMC5641661.

67. Milk protein fractions strongly affect the patterns of coagulation, curd firming, and syneresis/ N. Amalfitano et al. *J. Dairy Sci.* 2018. Vol. 102. P. 2903–2917. DOI:10.3168/jds.2018-15524.

68. Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh / Kučerová J., et al. *Czech Journal Animals Science.* 2006. Vol. 51(6). P. 241–247. URL: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/52288.pdf>

69. Miluchová M, Gábor M, Candrák J, Trakovická A, Candráková K. Association of HindIII-polymorphism in kappa-casein gene with milk, fat and protein yield in holstein cattle. *Acta Biochim Pol.* 2018;65(3):403-407. doi:10.18388/abp.2017_2313. Epub 2018 Sep 15. PMID: 30212591.

70. Mishra B., Mukesh M., Prakash B., Sodhi M., Kapila R., Kishore A., Kataria R., Joshi B., Bhasin V., Rasool T. Status of milk protein, β -casein variants among Indian milch animals. *Indian J Anim Sci.* 2009. Vol. 79, P. 722–725.

71. Mota LFM, Pegolo S, Baba T, Morota G, Peñagaricano F, Bittante G, Cecchinato A. Comparison of Single-Breed and Multi-Breed Training Populations for Infrared Predictions of Novel Phenotypes in Holstein Cows. *Animals (Basel).* 2021 Jul 2;11(7):1993. doi: 10.3390/ani11071993. PMID: 34359121; PMCID: PMC8300349.

72. Mukesh M, Swami S, Bhakhri G, Chaudhary V, Sharma V, Goyal N, Vivek P, Dalal V, Mohanty AK, Kataria RS, Kumari P, Niranjana SK, Sodhi M. Demographic pattern of A1/A2 beta casein variants indicates conservation of A2 type haplotype across native cattle breeds (*Bos indicus*) of India. *3 Biotech.* 2022 Aug;12(8):167. doi: 10.1007/s13205-022-03232-0. Epub 2022 Jul 11. PMID: 35845115; PMCID: PMC9276908.

73. Nguyen HPH, Schwendel N, Harland D, Day L. Differences in the yoghurt gel microstructure and physicochemical properties of bovine milk containing A1A1 and A2A2 β -casein phenotypes. *Food Res Int.* 2018 Oct;112:217-224.

74. Pal S, Woodford K, Kukuljan S, Ho S. Milk Intolerance, Beta-Casein and Lactose. *Nutrients*. 2015 Aug 31;7(9):7285-97. doi: 10.3390/nu7095339. PMID: 26404362; PMCID: PMC4586534.

75. Parashar A., Saini R. A1 milk and its controversy-a re- view. *International Journal of Bioassays*. 2015. Vol. 4.12. P. 4611–4619. Doi:<https://doi.org/10.21746/ijbio.2015.12.007>.

76. Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R.J., O'Brien, N.M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int. Dairy J.* 2009. P. 643–654.

77. RaiesulHaq M., Kapila R., Shandilya U. K. & Kapila S. Impact of Milk Derived β - Casomorphins on Physiological Functions and Trends in Research. A Review. *International Journal of Food Properties*. 2014. Vol. 17, No 8, P. 1726–1741.

78. Ramakrishnan M, Eaton TK, Sermet OM, Savaiano DA. Milk Containing A2 β -Casein ONLY, as a Single Meal, Causes Fewer Symptoms of Lactose Intolerance than Milk Containing A1 and A2 β -Caseins in Subjects with Lactose Maldigestion and Intolerance: A Randomized, Double-Blind, Crossover Trial. *Nutrients*. 2020 Dec 17;12(12):3855. doi: 10.3390/nu12123855. PMID: 33348621; PMCID: PMC7766938.

79. Raschia MA, Caffaro ME, Rossi UA, Poli MA. Modification of a previously patented method to unequivocally score A2-like and A1-like bovine β -casein variants. *MethodsX*. 2023 Apr 14;10:102183. doi: 10.1016/j.mex.2023.102183. PMID: 37424753; PMCID: PMC10326427.

80. Raynes JK, Day L, Augustin MA, Carver JA. Structural differences between bovine A(1) and A(2) β -casein alter micelle self-assembly and influence molecular chaperone activity. *J Dairy Sci*. 2015 Apr;98(4):2172-82. doi: 10.3168/jds.2014-8800. Epub 2015 Jan 31. PMID: 25648798.

81. Reichelt K.L., Tveiten Bioengineer D., Knivsberg A.M., Brønstad G. Peptides' role in autism with emphasis on exorphins. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2012;23:18958. doi: 10.3402/mehd.v23i0.18958

82. Rosado JL. Intolerancia a la lactosa [Lactose intolerance]. *Gac Med Mex.* 2016 Sep;152 Suppl 1:67-73. Spanish. PMID: 27603891.

83. Şahin Ö., Boztepe S., Aytakin I. A1 and A2 Bovine Milk, the Risk of Beta-casomorphin-7 and Its Possible Effects on Human Health:(I) A1 and A2 Milk and the Risk of Beta-casomorphin-7. *Selcuk J. Agr Food Sci.* 2018. Vol. 32. No 3. P. 632–639. DOI: org/10.15316/SJAIFS.2018.147.

84. Samoré AB, Román-Ponce SI, Vacirca F, Frigo E, Canavesi F, Bagnato A, Maltecca C. Bimodality and the genetics of milk flow traits in the Italian Holstein-Friesian breed. *J Dairy Sci.* 2011 Aug;94(8):4081-9. doi: 10.3168/jds.2010-3611. PMID: 21787943.

85. Sebastiani C, Arcangeli C, Ciullo M, Torricelli M, Cinti G, Fisichella S, Biagetti M. Frequencies Evaluation of β -Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy. *Animals (Basel).* 2020 Feb 5;10(2):252. doi: 10.3390/ani10020252. PMID: 32033348; PMCID: PMC7070732.

86. Sebastiani C., Arcangeli C., Torricelli M., Ciullo M., D'Avino N., Cinti G., Fisichella S., Biagetti M. Marker-assisted selection of dairy cows for β -casein gene A2 variant. *Italian Journal of Food Science.* 2022. Vol. 34(2). P. 21–27.

87. Sebely Pal, Keith Woodford, Sonja Kukuljan, Suleen Ho. Milk Intolerance, Beta-Casein and Lactose. *Review. Nutrients* 2015.

88. Sharma V., Sharma N., Jawed B., Nautiyal S.C. High resolution-melt curve analysis for the detection of A1, A2 beta-casein variants in Indian cows. *J Microbiol.and Biotechnology Research.* 2013. Vol. 3. P. 11-148.

89. Sheng X, Li Z, Ni J, Yelland G. Effects of Conventional Milk Versus Milk Containing Only A2 β -Casein on Digestion in Chinese Children: A Randomized Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2019 Sep;69(3):375-382. doi: 10.1097/MPG.0000000000002437. PMID: 31305326; PMCID: PMC6727941.

90. Teixeira DP, Costa RB, de Camargo GMF. Guzarat indicine cattle and A2 milk production. *Anim Biotechnol.* 2023 Apr;34(2):467-469. doi: 10.1080/10495398.2021.1962336. Epub 2021 Aug 9. PMID: 34370616.

91. Thakur K, Anand A. Milk metabolites and neurodegeneration: Is there crosstalk? Ann Neurosci. 2015 Oct;22(4):239-43. doi: 10.5214/ans.0972.7531.220410. PMID: 26526864; PMCID: PMC4627205.

92. Vigolo V, Visentin E, Ballancin E, Lopez-Villalobos N, Penasa M, De Marchi M. β -Casein A1 and A2: Effects of polymorphism on the cheese-making process. J Dairy Sci. 2023 Aug;106(8):5276-5287. doi: 10.3168/jds.2022-23072. Epub 2023 Jun 7. PMID: 37291039.

93. Visker MH, Dibbits BW, Kinders SM, van Valenberg HJ, van Arendonk JA, Bovenhuis H. Association of bovine β -casein protein variant I with milk production and milk protein composition. Anim Genet. 2011 Apr;42(2):212-8. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02106.x. Epub 2010 Sep 29. PMID: 24725229.

94. Wakchaure R., Ganguly S., Praveen P.K., Kumar A., Sharma S., Mahajan T. Marker Assisted Selection (MAS) in Animal Breeding: A Review. J. Drug Metab. Toxicol. 2015. Vol. 6(5): e127

95. Young W. Park, Ph.D.. Bioactive Components in Milk and Dairy Products. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 2009.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України