

## Набор diaGene для определения аллельных вариантов гена каппа-казеина (CSN3) крупного рогатого скота.

### Состав набора

Кат. №	Кол-во определений*	Экстра-микс HS-Taq (2x)	Смесь праймеров CSN3	Буфер для нанесения на гель
3363.0050	50	1.25 мл	125 мкл	100 мкл
3363.0100	100	2 x 1.25 мл	250 мкл	200 мкл
3363.0200	200	4 x 1.25 мл	2 x 250 мкл	400 мкл

\*Из расчёта 50 мкл ПЦР-смеси

### Описание продукта

В состав набора входят:

- 2-кратная реакционная смесь (**экстра-микс**), содержащая все компоненты, необходимые для проведения ПЦР (исключая ДНК-матрицу и праймеры) - высокопроцессивную рекомбинантную HS-Taq ДНК-полимеразу с «горячим» стартом, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, ПЦР-буфер с  $Mg^{2+}$  и краситель;
- смесь прямого и обратного праймеров для специфической амплификации фрагмента гена CSN3;
- буфер для нанесения проб на гель.

### Условия хранения

Все компоненты набора хранить при  $-20^{\circ}C$

### Методика определения аллельных вариантов гена CSN3

Набор предназначен для определения аллелей А и В гена каппа-казеина крупного рогатого скота. Эти аллели являются маркерами молочной продуктивности коров и отличаются нуклеотидами, кодирующими аминокислотные остатки в 136 и 148 положениях в последовательности каппа-казеина, что влияет, в свою очередь, на термостабильность этого белка. Вариант А несёт треонин в 136 положении и аспарагиновую кислоту в 148 положении, вариант В - изолейцин и аланин, соответственно. Молоко, полученное от носителей аллеля В, характеризуется более высоким содержанием белка, способностью образовывать мицеллы меньшего размера, повышенной термостабильностью и считается более подходящим сырьём для производства творога и сыра.

Определение аллельного полиморфизма гена каппа-казеина производится методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP) - расщепления специфических ПЦР-продуктов эндонуклеазами рестрикции с последующим электрофоретическим разделением фрагментов, полученных в ходе рестрикции. В качестве матрицы для ПЦР используется геномная ДНК крупного рогатого скота.

Оптимальный материал для получения геномной ДНК - цельная кровь, взятая в пробирку с антикоагулянтом (например, Becton Dickinson # 367844). Можно также брать кровь в стерильные пробирки, в которые предварительно добавлен 0.5М раствор динатриевой соли ЭДТА (Трилона Б) из расчёта 20-40 мкл на 4-5 мл крови (конечная концентрация ЭДТА - 2.5-5 мМ). Нежелательно использовать в качестве антикоагулянта гепарин, так как он может ингибировать реакцию амплификации.

Образцы крови могут храниться до 12 часов при комнатной температуре, для более длительного хранения рекомендуется температура  $-20^{\circ}C$  или  $-86^{\circ}C$ . Перед выделением ДНК образцы должны иметь

комнатную температуру. Следует избегать размораживания и повторного замораживания образцов крови, так как это снижает выход ДНК.

Для выделения геномной ДНК из цельной крови рекомендуется воспользоваться коммерческими наборами, например, #3361.0050 (Диаэм).

Также для выделения ДНК можно использовать другие биологические материалы - слюну, сперму, эпителий слизистых оболочек, корни волос и др. Для работы с каждым биологическим материалом рекомендуется использовать соответствующую методику для выделения геномной ДНК.

После выделения ДНК рекомендуется проанализировать концентрацию ДНК и степень её чистоты с помощью спектрофотометра. Большинство современных наноспектрофотометров типа NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) или UV5 Nano (Mettler Toledo) комплектуются ПО, позволяющим оценить степень чистоты и концентрацию ДНК. Основные параметры, характеризующие чистоту ДНК - соотношение оптических плотностей при 260 и 280 нм (D260/280) и при 260 и 230 нм (D260/230). ДНК считается чистой, если  $D260/280 > 1.8$ , а  $D260/230 > 2$ . Но для данного метода определения аллельного полиморфизма D260/230 не является строгим критерием, поэтому его допустимое значение может быть ниже 2.0 (но не более 1.0), если концентрация ДНК выше 5 нг/мкл. В противном случае рекомендуется высадить ДНК спиртом или очистить её от примесей с помощью набора для очистки ДНК из реакционных смесей (например, #3325.0050, Диаэм).

Выделенную ДНК можно использовать немедленно или хранить при -20 и использовать в течение месяца. В случае более длительного хранения рекомендуется поместить ДНК на -86°C или высадить её спиртом.

#### **Протокол выполнения амплификации**

1. Разморозьте реакционную смесь «Экстра-микс HS-Taq», тщательно перемешайте. Не рекомендуется перемешивать смесь на Вортексе.

2. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавьте следующие компоненты (из расчета объема одной реакции 50 мкл):

<b>Компонент</b>	<b>Объем</b>	<b>Конечная концентрация</b>
<b>Экстра-микс HS-Taq</b>	25 мкл	1x
<b>Смесь праймеров CSN-3</b>	2.5 мкл	0.25 мкМ
<b>ДНК-матрица</b>	переменный	0.2 - 1 нг/мкл (10 - 50 нг)
<b>Стерильная вода</b>	до 50 мкл	

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу. В случае использования амплификатора без греющейся крышки добавьте в каждую пробирку каплю (25-35 мкл) минерального масла.

4. Проведите ПЦР, используя рекомендованный режим:

<b>Шаг</b>	<b>Температура, °C</b>	<b>Время инкубации</b>	<b>Количество циклов</b>
<b>Предварительная денатурация</b>	95	5 мин	1
<b>Денатурация</b>	95	15 сек	40
<b>Отжиг</b>	55	30 сек	
<b>Элонгация</b>	72	45 сек	
<b>Финальная элонгация</b>	72	5 мин	1

## Эндонуклеазное расщепление продуктов ПЦР

При правильной постановке ПЦР концентрация продуктов амплификации достаточна для того, чтобы брать в реакцию эндонуклеазного расщепления (рестрикции) минимальный объем ПЦР-смеси (5 мкл на 30 мкл рестриктазной реакционной смеси). При этом компоненты ПЦР-буфера не ингибируют рестриктазную активность. Если концентрация продуктов амплификации низкая, то рекомендуется предварительно очистить ПЦР-смесь с помощью набора для очистки ДНК из реакционных смесей, например, #3325.0050 (Диаэм).

Для рестриктазного расщепления ПЦР-продуктов можно воспользоваться рестриктазами HindIII и HinfI или TaqI и HinfI (см. раздел III). Данный набор был протестирован на рестриктазах производства «Сибэнзим», «New England Biolabs» (рестриктазы серии HF) и «Thermo Fisher Scientific» (рестриктазы серии «FastDigest»)

1. Приготовьте реакционную смесь следующего состава:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
ПЦР-смесь	5 мкл	-
Рестриктазный буфер*	3 мкл	0.25 мкМ
Рестриктаза	0.2 мкл**	2-4 ед.акт.***
Стерильная вода	до 30 мкл	

\* Все коммерческие рестриктазы поставляются в комплекте с соответствующим буфером.

\*\* Как правило, концентрация рестриктаз составляет 10-20 ед. активности на мкл. В случае рестриктаз с высокой концентрацией (более 10 ед/мкл) можно воспользоваться буфером для разведения, рекомендованным производителем.

\*\*\* Некоторые рестриктазы в случае высокой концентрации фермента в реакционной смеси и/или длительной инкубации могут проявлять неспецифическую активность (см. рекомендации производителя рестриктазы).

Некоторые производители также рекомендуют добавлять в реакционную смесь с рестриктазой TaqI раствор БСА до 0.1 мкг/мкл (см. инструкцию производителя рестриктазы).

2. Инкубируйте реакционную смесь при температуре, рекомендованной производителем, в течение 1-2 часов. Рестриктазы HindIII и HinfI вышеупомянутых производителей активны при +37°C, а TaqI - при +65°C.

3. Остановите реакцию путём инкубации при +80°C в течение 10 минут. Это не обязательно, но рекомендуется при длительном хранении реакционных смесей.

4. Проанализируйте результаты рестриктазного расщепления методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле.

### Анализ длины рестрикционных фрагментов с помощью электрофореза.

Для анализа длины фрагментов, образовавшихся в результате рестриктазного расщепления ПЦР-продуктов, рекомендуется использовать метод электрофореза.

#### Электрофорез в агарозном геле

Проводится в 1.8% ТАЕ-агарозе, электродный буфер - 1-кратный ТАЕ (см. приложение). Рекомендуемый объем наносимого на гель образца - 5 мкл (для лунки шириной 5 мм). Если ПЦР-проба разводилась более чем в 2 раза, то к образцам рекомендуется добавить 1 мкл буфера для нанесения на гель (Диаэм #3012 или #3013); если проба разводилась в 2 раза и менее, то буфер для нанесения на гель добавлять не обязательно.

#### Электрофорез в полиакриламидном геле

Проводится в 8% полиакриламидном геле с ТВЕ-буфером. Рекомендуемый объем наносимого на гель образца - 5 мкл (для лунки шириной 5 мм). Если ПЦР-проба разводилась более чем в 2 раза, то к образцам рекомендуется добавить 1 мкл буфера для нанесения на гель (Диаэм #3012 или #3013); если проба разводилась в 2 раза и менее, то буфер для нанесения на гель добавлять не обязательно.

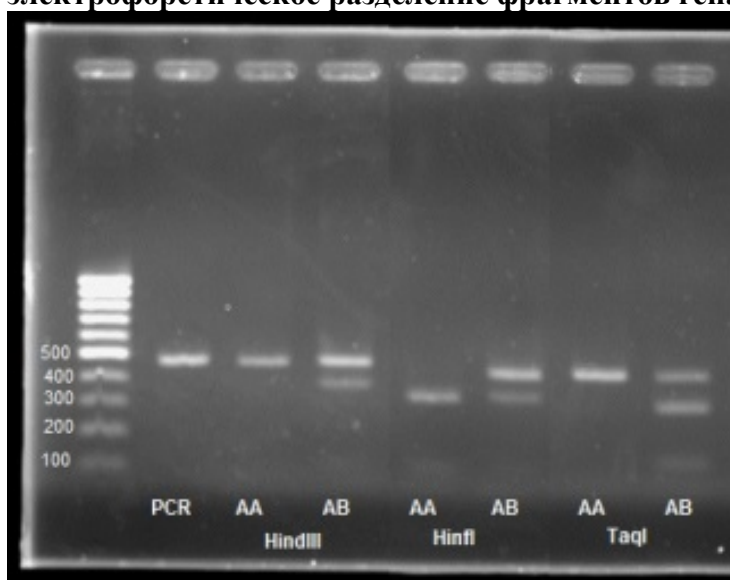
По окончании электрофореза для визуализации фрагментов рекомендуется окрашивание в растворе интеркалирующего красителя, например, бромистого этидия.

Длины фрагментов, соответствующих разным генотипам гена CSN3 и образующихся в результате рестриктазного расщепления, приведены в таблице.

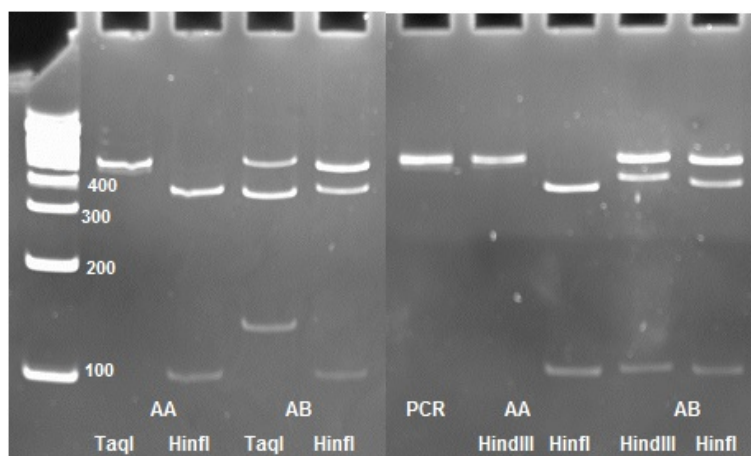
генотип	длины фрагментов			
	без рестрикции	HindIII	TaqI	HinfI
AA (Thr136-Asp148)	453	453	453	27 + 100 + 326
BB (Ile136-Ala148)	453	102 + 351	135 + 318	27 + 426
AB (Ile/Thr136-Asp/Ala148)	453	102+351 + 453	135 + 318 + 453	27 + 100 + 326 + 453

\* Фрагмент длиной 27 п.н. движется быстрее, чем маркерные красители и обычно не виден.

**Примеры гелей, окрашенных бромистым этидием, в которых проводилось электрофоретическое разделение фрагментов гена CSN3 после рестрикции**



1.8% TAE-агарозный гель, генотипы AA и AB



8% TBE-полиакриламидный гель, генотипы AA и AB