

**Т. А. ПУПОЛОВ, С. М. НИКОЛАЕВИЧ**

## **ИЗУЧЕНИЕ ГЕННЫХ ЧАСТОТ ЛАКТОПРОТЕИНОВ МОЛОКА ОВЕЦ ЦИГАЙСКОЙ ПОРОДЫ**

*Введение.* На современном этапе в странах с развитым животноводством в разведении сельскохозяйственных животных перспективным является маркерная селекция с применением молекулярно-генетических методов по определению локусов полиморфных признаков [1].

Информация о породных генетических особенностях аллелофонда по полиморфным системам крови позволяет более обосновано подойти к проблеме комплектования генофондных хозяйств типичными для породы животными с целью поддержания характерной генетической структуры и достаточно высокого уровня гетерозиготности [2].

Генетический полиморфизм белков молока имеет огромный интерес в животноводстве, т.к. взаимосвязан с производственными свойствами, составом и качеством молока. Особый интерес в оптимизации производства высокосортных сыров представляет белок – казеин. Известно, что различные генетические варианты в локусе гена казеина характеризуют технологические свойства молока, отбор которых позволит получить животных с наиболее выгодными генотипами.

Mroczkowski S. [3] доказал, что овцы с генотипом CC по  $\alpha$ S1-казеину имеют существенное преимущество по жирности молока и содержанию сухого вещества, чем овцы с генотипом AC, а молоко овец с генотипом AA по  $\beta$ -CN обладает более качественным белком, чем молоко овец с генотипом AB. Однако такие показатели, как продолжительность доения и удой молока для овец с генотипом AB – выше. Аллель D  $\alpha$ -S1-казеина связана с более низким содержанием жиров и белка в молоке овец породы Sarda [4].

В исследованиях Chianese и др. [5] на овцах пород Sarda и Comisana были получены результаты, указывающие, что уровень производства

молока уменьшается у генотипов для  $\alpha$ 1-казеина в следующем порядке: BC > CC > CD.

Есть исследования утверждающие, что для производства сыра лучшим молоком является то, в сыворотке которого присутствует k-казеин типа B [6]. Также есть сведения показывающие, что ген k Cn<sup>A</sup> связан с высокой продуктивностью, но одновременно происходит снижение жирности молока [7].

Выявление генетического полиморфизма белков молока дает возможность использовать эти белки в качестве маркеров для оценки продуктивности животных, в связи с чем тематика исследования является актуальной.

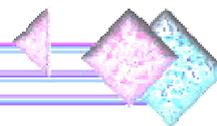
**Цель работы** – изучение генных частот в локусах  $\beta$ Cn,  $\alpha$ S<sub>1</sub>Cn, kCn и  $\beta$ Lg.

**Материал и методика исследования.** Исследование проводилось на популяции овец цыгайской породы (n = 51) овцеводческой фермы НПО «Tevit», Республика Молдова. Наследственно обусловленный тип белка – бета-казеин ( $\beta$ Cn), альфа-S<sub>1</sub>-казеин ( $\alpha$ S<sub>1</sub>Cn), каппа-казеин (kCn), бета-лактоглобулин ( $\beta$ Lg) определяли методом горизонтального электрофореза [3], [4].

Приготовленный гель состоял из частично гидролизованного крахмала и трис-цитратного буфера с мочевиной, в 1000 мл которого содержалось 8,67 г трис-(оксиметил)-аминометана (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N), 1,5 г лимонной кислоты и 396,0 г мочевины. На один литр такого раствора добавляется 190 мл электролитного буфера и 1 мл 2-меркаптоэтанола (концентрация 2-меркаптоэтанола 95%).

Частично гидролизованный крахмал готовился по представленной ниже схеме.

В трёхлитровую колбу отвесили 900 г крахмала, а в двухлитровую колбу налили 1800 мл ацетона. После этого колбы поместили в термостат на 5 часов при температуре +38,5° С. По истечении указанного времени из термостата извлекли ацетон и крахмал. В колбу с ацетоном долили 27 мл



HCl (плотность 1,18), перемешали и перелили в колбу с крахмалом. После тщательного смешивания ставили обратно в термостат на определённый срок. Оптимальное время гидролиза было установлено опытным путём.

При концентрации 10–15 г гидролизованного крахмала в 100 мл буфера гель был умеренно эластичным, прочным и разламывался под давлением. Если гидролиз происходил короткий период времени, то гель получался липким, а при увеличении длительности гидролиза выше оптимального гель плохо застывал. По истечении необходимого времени в гидролизат вливали 450 мл ацетата натрия (136 г уксуснокислого натрия на 1 л H<sub>2</sub>O), перемешивали и проводили отмывку через воронку Бюхнера, заранее вставив в неё двухслойный фильтр из фильтровальной бумаги.

Для ускорения процесса отмывки воронка Бюхнера соединялась с вакуумным насосом. После этой операции гидролизат заливали водой на 16 часов. По истечении этого времени воду сливали и обезвоживали ацетоном, который отсасывался через воронку Бюхнера вакуумным насосом.

Сушку проводили при температуре 45–50° С.

В качестве электролитного буфера служил раствор, содержащий в 1000 мл 11,8 г борной кислоты и 2,1 г гидрата окиси лития.

Образцы молока перед электрофорезом были обезжирены центрифугированием при 2500 оборотах в течение 10 минут. При необходимости длительного хранения обезжиренные пробы консервировали мертиолатом в концентрации 1:15 000 или помещали в полиэтиленовых ампулах в холодильные камеры при температуре –15° С. При отсутствии таких ампул можно воспользоваться пенициллиновыми.

Для исследования был заготовлен гель, состоящий из 14,5-процентной взвеси крахмала в трис-цитратном буфере. Заваривали крахмал в колбе с широким горлом до закипания на открытом пламени газовой горелки. С помощью вакуум-насоса, создающего разрежение в колбе до 0,9 атм.,



из горячего геля удаляли пузырьки воздуха. Откачивание повторяли 2–3 раза с интервалом в 1 минуту.

Формирование пластины геля и электрофорез проводили в плексигласовой ванночке размером 130 x 200 x 6 мм. Между съёмными анодным и катодным бортиками и ванночкой закреплялись из фильтровальной бумаги пятислойные фитили. Два из них имели размер 225 x 140 мм, а внутри находился фитиль размером 225 x 70 мм. Съёмные анодные и катодные бортики крепились к плексигласовой ванночке при помощи пружинки или резинки.

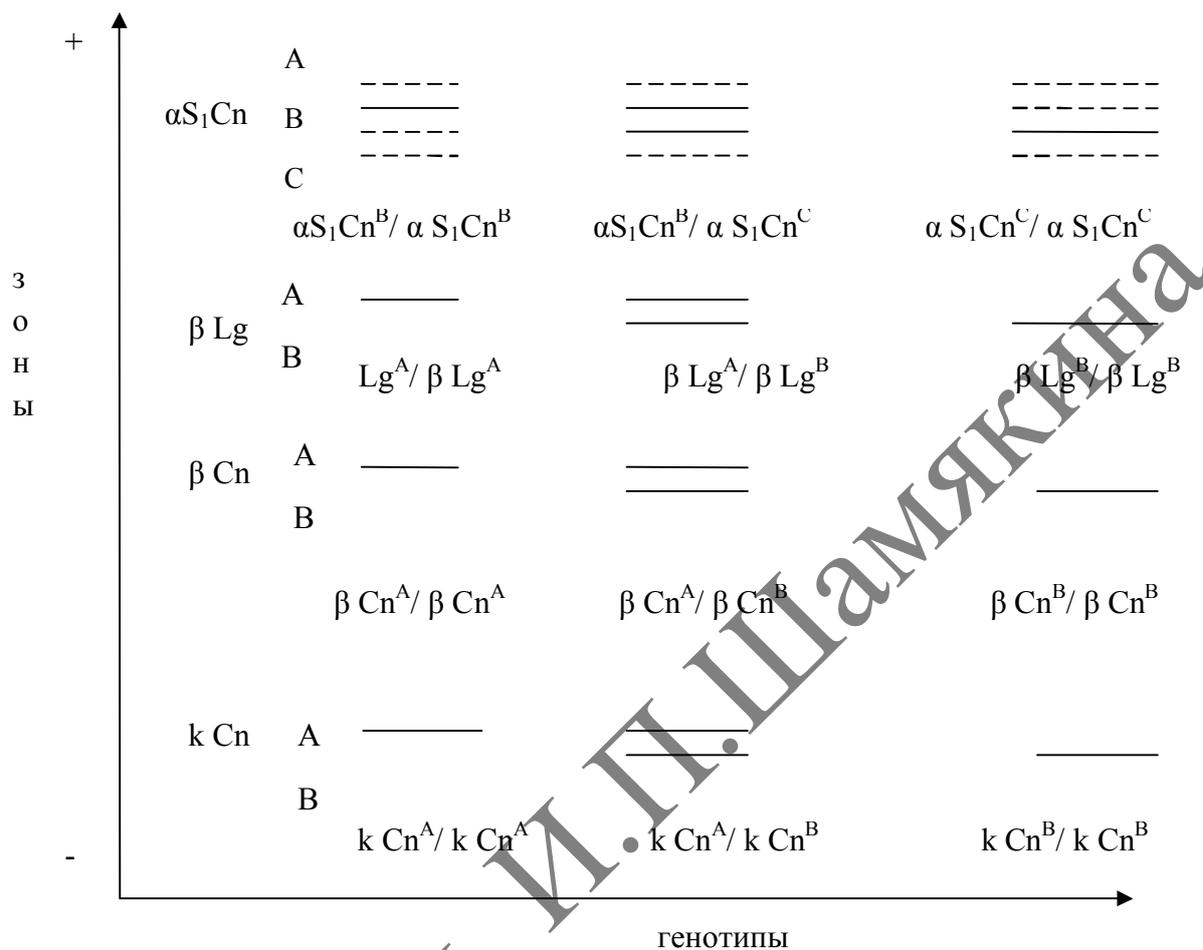
Линию старта устанавливали прокалыванием геля на расстоянии 1–2 см от катодного края металлической гребёночкой с размером зубца 4,0 x 6,0 x 0,5 мм. В каждый прокол на фильтровальной или хроматографической бумажке 4,0 x 6,0 мм вносили пробы молока. На одну ванночку наносили одновременно 40 образцов.

Электрофорез проводился в течение 2,5 часа при силе тока 120 мА на ванночку. Такой режим электрофореза требует принудительного охлаждения геля посредством вентилятора и постоянного орошения водой. Электролит наливался в гнезда размером 235 x 80 x 75 мм по 110 мл.

После завершения разгонки гелевую пластину разрезали вдоль тонкой проволокой на две части толщиной по 3 мм. Эти пластинки нумеровали и окрашивали в 1-процентном растворе амидо-чёрного 10 Б или в 1-процентном растворе нигрозина, приготовленного на промывной воде (смесь метанола, ледяной уксусной кислоты и дистиллированной воды в пропорциях 5:1:5). Время окрашивания составило 3 минуты. Затем пластину отмывали промывной водой до полного «проявления» фореграммы.

Применение метода электрофореза на крахмальном геле по методу Смитиса позволяет разделить белки молока на следующие полиморфные системы:  $\alpha S_1Cn$ ,  $\beta Cn$ ,  $k Cn$ ,  $\beta Lg$ .

Расшифровка фореграмм проводилась по схеме описанной ниже (рисунок).



**Рисунок – Расшифровка фореграмм белков молока**

Частота аллелей (для двухаллельных систем) была определена по формулам (1, 2).

$$P(A) = (2AA + AB) / 2n, \quad (1)$$

$$q(B) = (2BB + AB) / 2n, \quad (2)$$

где  $P(A)$  – частота аллеля  $A$ ;

$AA, BB$  – число особей с гомозиготным генотипом;

$AB$  – число особей с гетерозиготным генотипом;

$n$  – число особей в группах;

$q(B)$  – частота аллеля  $B$ .

Частота аллелей (для трехаллельных систем) была определена по формулам (3), (4), (5).

$$P(A) = (2AA + AB + AC) / 2n, \quad (3)$$

$$q(B) = (2BB + AC + BC) / 2n, \quad (4)$$

$$z(C) = (CC + AC + BC) / 2n, \quad (5)$$

где  $P(A)$  – частота аллеля А;

AA, BB, CC – число особей с гомозиготными генотипами;

AB, AC, BC – число особей с гетерозиготными генотипами;

n – число особей в группах;

$q(B)$  – частота аллеля В;

$z(C)$  – частота аллеля С.

Определение генетического равновесия проводилось с помощью теста  $\chi^2$ , согласно закону Гарди–Вайнберга, по формуле (6):

$$\chi^2 = (\Phi - T)^2 / T, \quad (6)$$

где  $\Phi$  – фактическое количество особей в популяции с определенным генотипом;

T – теоретически ожидаемое количество особей.

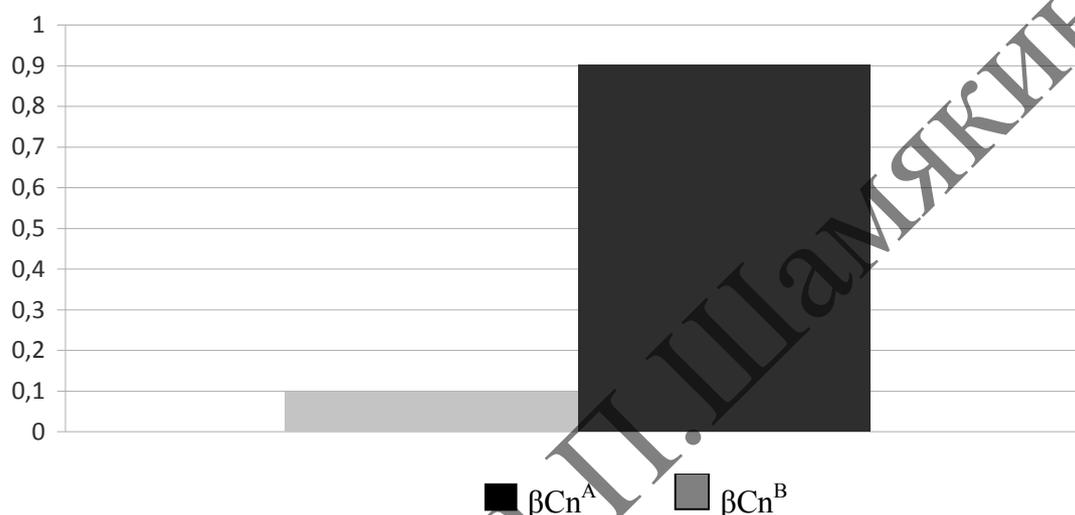
**Результаты исследования и их обсуждение.** Казеин, как и все белки, состоит из последовательности аминокислот, соединенных друг с другом в полипептидную цепь. Свободные карбоксильные группы дикарбоновых аминокислот и гидроксильные группы фосфорной кислоты казеина легко взаимодействуют с ионами солей щелочных и щелочноземельных металлов ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), образуя казеинаты.

Установлено, что казеин молока представляет собой смесь нескольких (до 20) фракций. Все фракции казеина являются производными от одной из четырех основных (альфа, бета, каппа, гамма).

$\beta Cn$  – молочный белок, составляющий 25%–35% от общего молочного белка. Первичная структура  $\beta Cn$  представляет собой

полипептидную цепь, которая содержит 5 фосфатных групп. Известно 7 генетических вариантов данной фракции.

В наших исследованиях в локусе  $\beta\text{Cn}$  было установлено только присутствие двух аллелей –  $\beta\text{Cn}^A$  и  $\beta\text{Cn}^B$  – с частотами 0,9020 и 0,0980 соответственно (диаграмма 1).

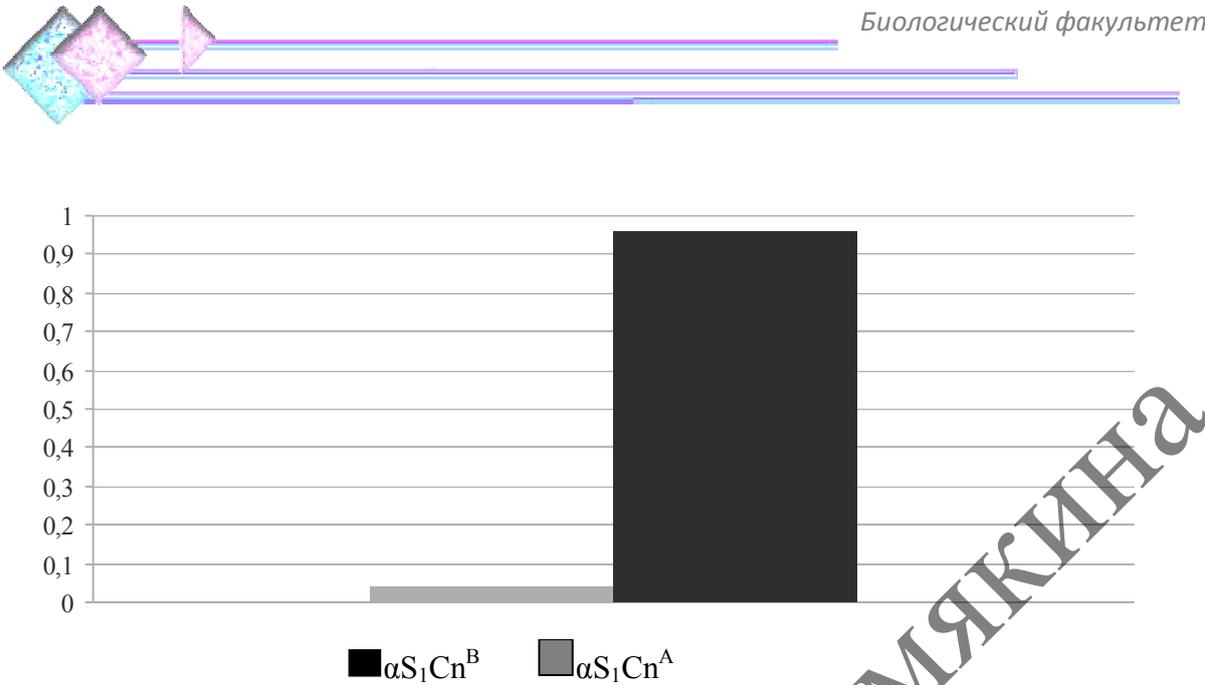


**Диаграмма 1 – Частота аллелей в локусе  $\beta\text{Cn}$   
в молоке овец цыгайской породы**

Исследуемая популяция находилась в генетическом равновесии, по локусу  $\beta\text{Cn}$ , согласно закону Харди-Вайнберга ( $\chi^2 = 0,01 - 0,53$ ).

$\alpha\text{S}_1\text{Cn}$  – это основная фракция казеина, которая является смесью двух белков – главного и второстепенного компонентов, имеющих одинаковую первичную структуру, но отличающихся степенью фосфорилирования. Он составляет основную часть казеинового комплекса молока. Молекулы этого белка состоят из простой пептидной цепи, которая содержит 199 остатков аминокислот, но подобно  $\beta$ -казеину и в отличие от  $\kappa$ -казеина не содержит цистин. Эти аллели кодоминантны и локализованы в 4-ой хромосоме крупного рогатого скота, у овец, коз.

В наших исследованиях в локусе  $\alpha\text{S}_1\text{Cn}$  было выявлено 2 аллеля:  $\alpha\text{S}_1\text{Cn}^A$  (0,0392) и  $\alpha\text{S}_1\text{Cn}^B$  (0,9608) с более высокой частотой для типа  $\alpha\text{S}_1\text{Cn}^B$  (диаграмма 2).



**Диаграмма 2 – Частота аллелей в локусе  $\alpha S_1 Cn$   
в молоке овец цыгайской породы**

По другим данным, у каракульской породы овец локус  $\alpha S_1 Cn$  характеризуется присутствием 3 аллелей  $\alpha S_1 Cn^A$ ,  $\alpha S_1 Cn^B$ ,  $\alpha S_1 Cn^C$  с более высокой частотой для типа  $\alpha S_1 Cn^B$  – 0,9355 [5].

Исследуемая популяция в локусе  $\alpha S_1 Cn$  находилась в генетическом равновесии, согласно закону Харди-Вайнберга ( $\chi^2 = 10,58$ ).

kCn является главным критерием, учитываемым при производстве таких молочных продуктов, как творог и сыр. Белок состоит из одного главного компонента, не содержащего углеводов, и шести второстепенных компонентов, относящихся к гликопротеидам. Группа каппа-казеинов составляет 8–15% от общего молочного белка. Каппа-казеин – это одна из конструктивных частей казеинового комплекса молока. Изучение ДНК, а именно гена, который контролирует k Cn, выявило различия на молекулярном уровне, а также различные вариации. Этот белок содержит 169 аминокислот. На данный момент доказано присутствие 6 аллелей. Локус k–Cn локализован в 4-ой хромосоме у крупного рогатого скота [10].

Первичная структура представляет собой полипептидную цепь, содержащую 169 остатков аминокислот (в том числе 2 остатка цистина) и одну фосфатную группу. В настоящее время выявлено 10 аллелей

каппа-казеина. Однако чаще встречаемыми в молоке овец являются аллели А и В.

В наших исследованиях в локусе  $kCn$  (диаграмма 3) было обнаружено два аллеля с наибольшей частотой для  $kCn^A$  (0,8627) и наименьшей для  $kCn^B$  (0,1373).



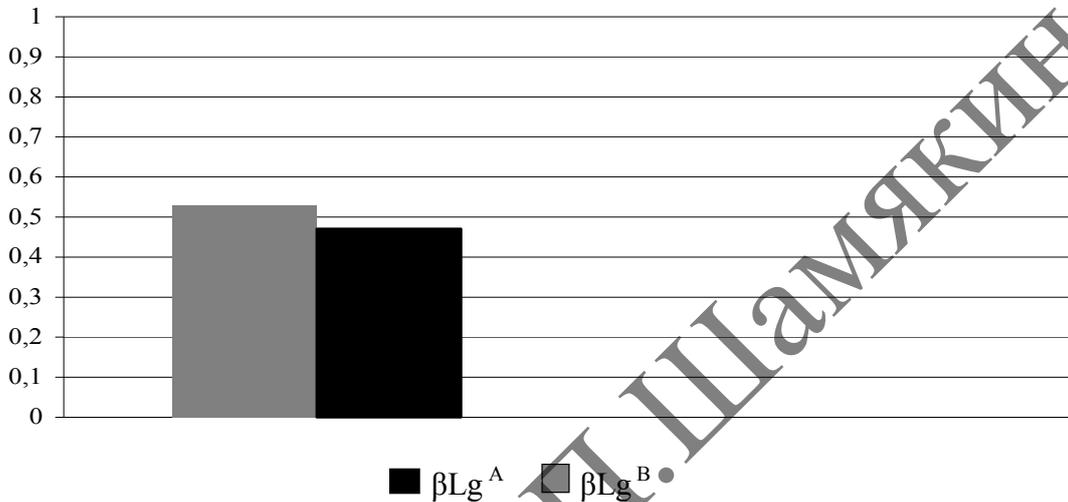
**Диаграмма 3 – Частота аллелей в локусе  $kCn$   
в молоке овец цыгайской породы**

Исследуемая популяция находилась в генетическом равновесии, согласно закону Гарди-Вайнберга, по тесту  $\chi^2$  (0,00–0,002).

$\beta Lg$  – это молочный белок, который имеет особый вид полиморфизма. Явление полиморфизма бета-лактоглобулинов было изучено раньше других фракций. Локус, который контролирует синтез  $\beta Lg$ , находится в 3 хромосоме. Считается, что именно этот белок придает вкус молоку [6].

$\beta Lg$  является наиболее важным в количественном отношении сывороточным белком (на его долю приходится около половины всех белков сыворотки и его содержание в молоке составляет 0,2–0,4%. Молекула  $\beta Lg$  состоит из 162 аминокислотных остатков и находится в молоке в виде димера.

В наших исследованиях в этом локусе было обнаружено два аллеля:  $\beta Lg^A$  – 0,4706 и  $\beta Lg^B$  – 0,5294 с более высокой частотой для типа  $\beta Lg^B$  (диаграмма 4).



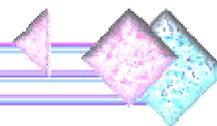
**Диаграмма 4 – Частота аллелей локуса  $\beta Lg$  в молоке овец цыгайской породы**

**Заключение.** В результате проведенных исследований в изученных локусах обнаружен аллельный полиморфизм с наибольшей частотой для типов  $\alpha S_1 Cn^B$  – 0,9608 и  $kCn^A$  – 0,8627. В локусе  $\beta Cn$  было обнаружено 2 аллеля с наибольшей частотой для типа  $\beta Cn^A$  – 0,9020. Для каракульской породы овец [5] наибольшая частота также характерна для аллели  $\beta Cn^A$ . Локус  $\beta Lg$  также характеризовался присутствием двух аллелей с наибольшей частотой для типа  $\beta Lg^B$  (0,5294). Популяция овец находилась в состоянии генетического равновесия.

Полученные данные могут быть использованы в генетическом мониторинге, для определения состояния популяций, ее приспособленности к конкретным условиям окружающей среды.

#### Литература

1. Кушнер, Х. Генетика белкового полиморфизма у животных и птиц / Х. Кушнер, Л. Зубарева. – М. : Колос, 1970. – 150 с.



2. Люцканов, П. Характеристика молдавских цыгайских и каракульских овец по полиморфизму белков крови и микросателлитам / П. Люцканов // *Stiinta Agricola*. – 2007. – № 2. – С. 54–59.
3. Mroczkowski, S. Sheep milk protein polymorphism and its effect on milk performance of Polish Merino / S. Mroczkowski // *Arch. Tierz.* – 2004. – Dummerstorf 47, Special Issue. – P. 114–121.
4. Bolla, P. Milk protein markers and production in sheep / P. Bolla // *Animal Genetics*. – 1989. – Vol. 20, №1. – P. 78–79.
5. Chianese, L. Occurrence of live  $\alpha$ s1-casein variants in ovine milk / L. Chianese // *Journal of Dairy Research*. – 1996. – № 63. – P. 49–59.
6. Grosclaude, F. Genetic polymorphism of milk proteins. Bulletin of the international / F. Grosclaude // *Dairy Federation*. – 1995. – № 304. – P. 2–3.
7. Жебровский, Л. С. Изучение состава молочных белков / Л. С. Жебровский. – Л. : Колос, 1979. – С. 38–41.
8. Smithies, O. Zone electrophoresis in starch gels / O. Smithies // *Biochem. J.* – 1955. – Vol. 61. – P. 629.
9. Луполов, Т. А. Генетический полиморфизм лактопротеинов и влияние локуса  $\beta$ Lg на показатели молочной продуктивности овец каракульской породы / Т. А. Луполов, В. С. Петку // *Весці НАН Беларусі. Сер. аграр. навук.* – 2009. – № 2. – С. 87–90.
10. Сулимова, Г. Е. Полиморфизм гена каппа-казеина в популяциях подсемейства Bovinae / Г. Е. Сулимова, Ю. Н. Бадагуева, И. Г. Удина // *Генетика*. – 1996. – Т. 32. – С. 1576–1582.
11. Elyasi, Gh. Study of Ovine Beta-Lactoglobulin Gene Polymorphism Using PCR-RFLP / Gh. Elyasi // *Technol. Agric. & Natur. Resour: Isf. Univ. Technol., Isf., Iran.* – Summer 2005. – Vol. 9, № 2. – P. 129–134.