

УДК 636.2:575

## ПОЛИМОРФНЫЕ СИСТЕМЫ БЕЛКОВ МОЛОКА ЧЁРНО-ПЁСТРЫХ КОРОВ МОЛДАВСКОГО ТИПА

### **Т. А. Луцолов**

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, доцент кафедры природопользования и охраны природы УО «Мозырский государственный педагогический университет имени И. П. Шамякина», Мозырь, РБ

### **В. С. Петку**

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, зав. кафедрой биотехнологии и зоотехнии Государственного аграрного университета Молдовы, Кишинэу, Молдова

### **В. Н. Науменко**

студент биологического факультета УО «Мозырский государственный педагогический университет имени И. П. Шамякина», Мозырь, РБ

*Информация о генетических особенностях аллелофонда породы позволяет более обоснованно подойти к проблеме комплектования хозяйств типичными для породы животными для поддержания характерной генетической структуры. В статье приводится информация о полиморфных системах белков молока чёрно-пёстрых коров молдавского типа. Обнаружен полиморфизм лактопротеинов  $\alpha S1-CN$ ,  $\beta-CN$ ,  $\kappa-CN$ ,  $\beta-LG$ . Во всех локусах, кроме  $\alpha S1-CN$ , обнаружено 2 аллеля. В локусе  $\alpha S1-CN$  обнаружено 3 аллеля (A, B, C). Самая низкая частота гена обнаружена в локусе  $\alpha S1-CN^C$  – 0,0485.*

**Ключевые слова:** генотип, генетический полиморфизм, лактопротеины, молдавский тип чёрно-пёстрого крупного рогатого скота.

### **Введение**

Одной из приоритетных задач международных программ FAO (Food and Agriculture Organization) ЕАЖ (Европейская Ассоциация Животноводства) является сохранение генетических ресурсов животных. Изучение и рациональное использование генофонда локальных пород имеет огромное значение в связи с их хорошей приспособленностью к местным природно-климатическим условиям, устойчивостью к заболеваниям, универсальными рабочими качествами и нередко уникальным аллелофондом. Мировой опыт показывает, что степень разнообразия полиморфных генов является на сегодняшний день наиболее объективным и информативным критерием оценки уровня генетической изменчивости в популяциях [1]. Информация о породных генетических особенностях аллелофонда по полиморфным системам лактопротеинов позволяет более обоснованно подойти к проблеме комплектования генофондных хозяйств типичными для породы животными с целью поддержания характерной генетической структуры и высокого уровня гетерозиготности.

Целью исследования явилось определение генетического полиморфизма лактопротеинов  $\alpha S1-CN$ ,  $\beta-CN$ ,  $\kappa-CN$ ,  $\beta-LG$  в молоке крупного рогатого скота.

**Материалы и методы.** Опыты проводились на популяции чёрно-пёстрых коров молдавского типа (n = 31) при Научно-практическом Институте Зоотехнии и Ветеринарии (с. Максимовка Ново-Анненского района, Молдова).

Молдавский тип чёрно-пёстрого крупного рогатого скота (*Bos Taurus L.*) создан путём скрещивания местных коров симментальской и красной степной пород с быками чёрно-пёстрой и голштинской пород с последующим разведением заявляемых генотипов «в себе». Имеют чёрную масть и экстерьер молочного типа, туловище удлиненное, спина и поясница ровные и крепкие, ноги хорошо развиты и в правильной позиции, с крепкими копытами. Коровы имеют объемное, железистое вымя ваннообразной, чашеобразной или округлой формы, длина сосков составляет в среднем 5–8 см, а диаметр 2–3 см. Скорость доения в среднем составляет 1,8–2,1 кг/мин. Потенциал молочной продуктивности составляет 4500–6000 кг, с жирностью 3,6–3,8%.

Преимущество нового типа перед исходными местными породами состоит в превышении показателей: по весу тела – в среднем на 13%; по молочной продуктивности – в среднем на 120%; по молочному жиру – в среднем на 0,5% и скорости доения – в среднем на 46,2% [2].

Наследственно обусловленный тип белка – бета-казеин, альфа-S<sub>1</sub>-казеин, каппа-казеин, бета-лактоглобулин 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-(гидроксиэтил)-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-меркапто-этанола (концентрация – 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°C. По истечении указанного времени из термостата извлекли ацетон и крахмал. В колбу с ацетоном долили 27 мл HCl (плотность 1,18) и перелили в колбу с крахмалом.

После тщательного смешивания возвращали 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°C.

Электролитным буфером послужил раствор, содержащий в 1000 мл 11,8 г борной кислоты и 2,1 г гидрата оксида 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°C.

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.

Линию старта устанавливали прокалыванием геля на расстоянии 1–2 см от катодного края металлической гребёнкой с размером зубца 4,0 x 6,0 x 0,5 мм. В каждый прокол на фильтровальной бумаге 4,0 x 6,0 мм вносили пробы молока. 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 гнездо 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 проточной водой до полного «проявления» фореграммы.

Применение метода электрофореза на крахмальном геле по методу Смитиса позволило расшифровать фореграммы по схеме, описанной ниже (рисунок 1).

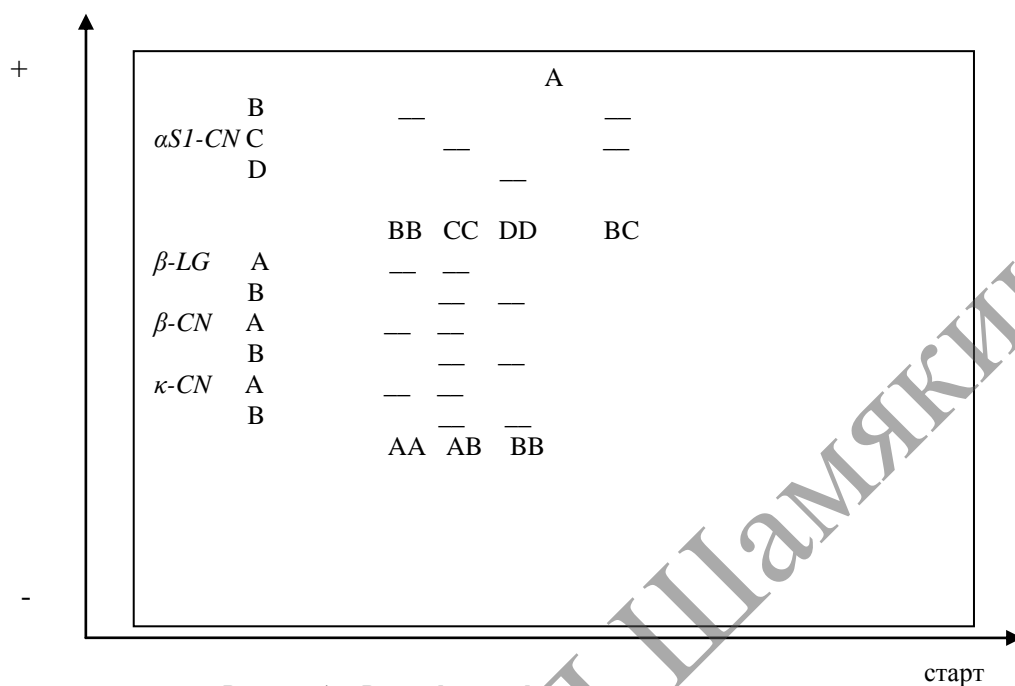


Рисунок 1. – Расшифровка фореграмм лактопротеинов

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 А;  
 AA, BB – число особей с гомозиготным генотипом;  
 AB – число особей с гетерозиготным генотипом;  
 n – число особей в группах;  
 $q(B)$  – частота аллеля В.

Частота аллелей (для трехаллельных систем) была определена по формулам (3)–(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 Харди-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

**Альфа-S<sub>1</sub>-казеин** ( $\alpha$ S1-CN) – молочный белок, который составляет основную часть казеинового комплекса молока. Он был открыт в 1961 году К. Ашаффенбургом. Молекулы альфа-S<sub>1</sub>-казеина состоят из простой пептидной цепи, которая содержит 199 остатков аминокислот, но подобно  $\beta$ -казеину и в отличие от  $\kappa$ -казеина не содержит цистеин. Локализация гена у КРС установлена в 4 хромосоме с 5 аллельными вариантами А, В, С, D, Е [5], [6].

В наших исследованиях локус  $\alpha$ S1-CN также обладал полиморфностью – установлены 3 аллеля А, В и С с наибольшей частотой для варианта  $\alpha$ S1-CN<sup>B</sup> (рисунок 2).

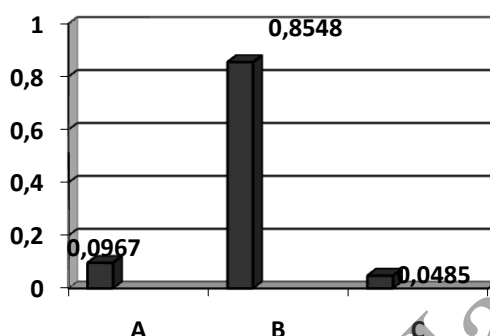


Рисунок 2. – Частота аллелей локуса  $\alpha$ S1-CN в молоке чёрно-пёстрых коров молдавского типа

Распределение соответствующих генотипов соответствовало ожидаемому распределению Харди-Вайнберга по тесту  $\chi^2$  (таблица 1).

Таблица 1. – Распределение популяции чёрно-пёстрых коров молдавского типа по  $\alpha$ S1-CN

Генотип	Количество животных	$\chi^2$
AB	5(5,12)*	0,0030
BB	23(22,65)	0,0053
BC	2(2,57)	0,1265
AC	1(0,29)	1,7306
Итого	31(31)	1,8654

\*В скобках указано теоретически ожидаемое число особей. То же для таблиц 2–4

**Бета-казеин** ( $\beta$ -CN) – молочный белок, молекула которого состоит из 209 аминокислотных остатков, не содержит цистеин, но имеет высокое содержание пролина. Бета-казеин составляет 25–35% от общего молочного белка. Он растворяется при низких температурах и может диссоциироваться из структуры мицелия казеина без нарушения целостности. Эта фракция является самой гидрофобной фракцией благодаря высокому содержанию пролина. Согласно некоторым данным, этот белок играет большую роль в содержании и распределении кальция в молоке [7].

Ген, отвечающий за синтез  $\beta$ -CN, имеет 8 вариантов аллелей, 4 из которых встречаются наиболее часто [7].

Изученная популяция коров в локусе  $\beta$ -CN проявила полиморфизм присутствием двух аллелей А и В, с частотой – 0,4838 для аллельного варианта А и 0,5162 для аллеля В (рисунок 3).

В результате распределения генотипов – 32,25% особей имели гомозиготный генотип АА и 35,48% гомозиготный генотип ВВ (таблица 2).

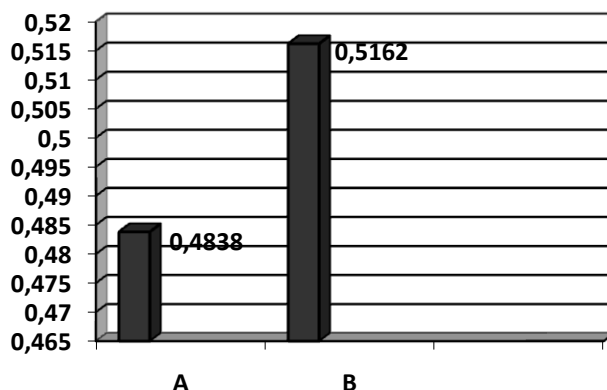


Рисунок 3. – Частота аллелей гена  $\beta$ -CN в молоке чёрно-пёстрых коров молдавского типа

Таблица 2. – Распределение чёрно-пёстрых коров молдавского типа по  $\beta$ -CN

Генотип	Количество животных	$\chi^2$
AA	10(7,25)*	1,0377
AB	10(15,48)	1,9421
BB	11(8,26)	0,9086
Итого	31(31)	3,8884

**Каппа-казеин** ( $\kappa$ -CN) – это одна из конструктивных частей казеинового комплекса молока. Этот белок является фосфогликопротеидом, имеет хорошую растворимость, ионы кальция не осаждают его. При действии сычужного или других протеолитических ферментов каппа-казеин осаждается вместе с  $\alpha$ S1-CN и 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 [8]. Изучение ДНК, а именно гена, который контролирует синтез  $\kappa$ -CN, выявило различия на молекулярном уровне, а также различные вариации. Этот белок содержит 169 аминокислот. Установлено, что аллель А в 136 положении содержит треонин, а в 148 – аспарагиновую кислоту, в то время как аллель типа В в этих положениях содержит изолейцин и аланин соответственно. Лocus  $\kappa$ -CN входит в группу сцепления U15 и локализован в 6-ой хромосоме у крупного рогатого скота [9]. Варианты каппа-казеина А и В встречаются у всех пород КРС с разной частотой, а варианты каппа-казеина С и Е встречаются довольно редко – у пород коров горной цепи восточного Алтая [10,11].

Полиморфность гена проявилась и в наших исследованиях. В изученном локусе было обнаружено 2 аллеля –  $\kappa$ -CN<sup>A</sup> и  $\kappa$ -CN<sup>B</sup>, с наибольшей частотой аллеля  $\kappa$ -CN<sup>A</sup> (рисунок 4).

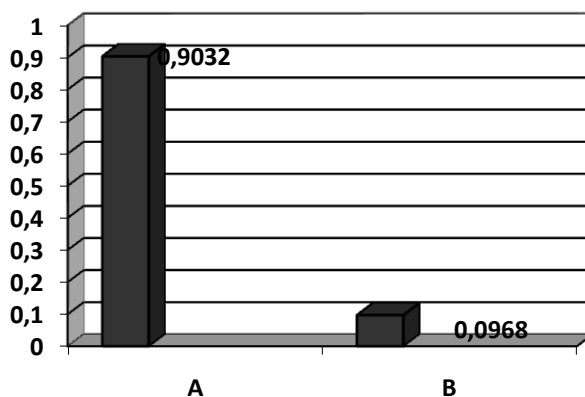


Рисунок 4. – Частота аллелей локуса  $\kappa$ -CN в молоке чёрно-пёстрых коров молдавского типа

Присутствие двух аллелей в анализируемой популяции позволило распределить коров по типам  $\kappa$ -CN с тремя генотипами (таблица 3).

Таблица 3. – Распределение чёрно-пёстрых коров молдавского типа по  $\kappa$ -CN

Генотип	Количество животных	$\chi^2$
AA	26(25,28)*	0,0200
AB	4(5,42)	0,3723
BB	1(0,29)	1,7339
Итого	31(31)	2,1262

Наибольшую численность в популяции составил гомозиготный генотип AA – 26 особей (83,37%), гетерозиготным генотипом AB обладали 4 особи (12,9%), а гомозиготным BB – 1 особь (3,22%). Исследуемая популяция находилась в генетическом равновесии по тесту  $\chi^2$ .

**Бета-лактоглобулин** ( $\beta$ -LG) – является наиболее важным в количественном отношении сывороточным белком. На его долю приходится около половины всех белков сыворотки, и его содержание в молоке составляет 7–12%. Молекула состоит из 162 аминокислотных остатков и находится в молоке в виде димера. Лocus обладает выраженным полиморфизмом. Установлено присутствие 8 алелей, 3 из которых (A,B,C) чаще встречаются у крупного рогатого скота. Ген входит во вторую группу сцепления, локализован в 16 хромосоме вместе с геном, определяющим группу крови J [12].

Считается, что этот белок придает вкус молоку. Его концентрация варьирует во время лактации. Самая высокая, 18–20 г/л, наблюдается на первой неделе лактации и 2–4 г/л – на последующих неделях.

Белок  $\beta$ -LG находится в молоке жвачных и у некоторых нежвачных животных, отсутствует у человека и грызунов [13].

В наших исследованиях в локусе  $\beta$ -LG было обнаружено два аллельных варианта гена –  $\beta$ -LG<sup>A</sup> и  $\beta$ -LG<sup>B</sup> (рисунок 5).

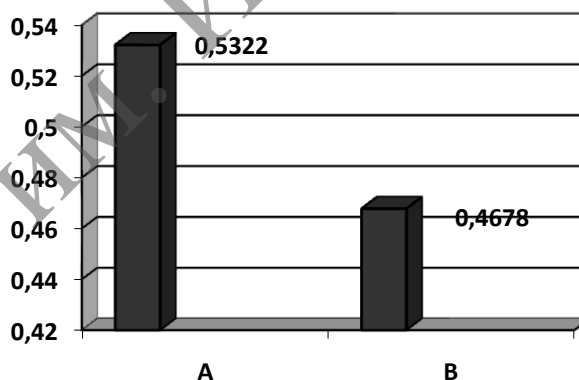


Рисунок 5. – Частота аллелей локуса  $\beta$ -LG в молоке чёрно-пёстрых коров молдавского типа

Популяция коров по типам бета-лактоглобулина распределилась по трем генотипам – AA, AB и BB (таблица 4).

Таблица 4. – Распределение чёрно-пёстрых коров молдавского типа по  $\beta$ -LG

Генотип	Количество животных	$\chi^2$
AA	9(8,78)*	0,0054
AB	15(15,44)	0,0122
BB	7(6,78)	0,0068
Итого	31(31)	0,0244

### Выводы

В результате исследования в молоке коров чёрно-пёстрой породы обнаружен полиморфизм  $\alpha SI-CN$ ,  $\kappa-CN$ ,  $\beta-CN$  и  $\beta-LG$ .

Гены характеризовались присутствием нескольких аллелей с наибольшей частотой для  $\alpha SI-CN^B$  (0,8548),  $\beta-CN^B$  (0,5162),  $\kappa-CN^A$  (0,9032),  $\beta-LG^A$  (0,5322). Исследуемая популяция находилась в условиях генетического равновесия во всех локусах.

Самая низкая частота была установлена в локусе  $\alpha SI-CN^C$  (0,0485). На наш взгляд, это может быть связано с обеднённым генофондом чёрно-пёстрых коров молдавского типа, причина которой связана, вероятно, с локальной селекцией. В этой связи возникает целесообразность подбора родительских пар, которые могли бы обеспечить сохранение генофонда в целом.

Таким образом, систематический генетический мониторинг в популяциях позволяет контролировать уровень генетического разнообразия, использовать возможности маркерной селекции, включая оценку внутривидовой дифференциации, формирование оптимальной генеалогической структуры и селекцию на гетерозис.

### Литература

1. Люцканов, П. Характеристика молдавских цыгайских и каракульских овец по полиморфизму белков крови и микросателлитам / П. Люцканов // *Știința agricolă. Universitatea Agrară de Stat din Moldova*. – 2007. – № 2. – P. 54–59.
2. Tip de taurine (Bos Taurus L.) Baltat cu Negru Moldovenesc: pat. 3923 Moldova, Int. Cl. : A01K 67/027 (2008.04) / Smirnov Ernest, MD; Focsa Valentin, MD; Constandoglo Alexandra, MD; Curuliuc Vasile, MD; Bahcivanji Mihail, MD; Darie Grigore, MD; Chilimar Sergiu, MD; Radionov Vladimir, MD; Munteanu Gheorghe, MD; заявитель Institutul științific-practic de biotehnologii în zootehnie și medicină veterinară, MD; заявл. А 2008 0252; опубл. 2008.10.03 // *Inventii / MD – BOPI*. – 2009. – № 6. – С. 17.
3. Smithies, O. Zone electrophoresis in starch gels / O. Smithies // *Biochem. J.* – 1955. – Vol. 61. – P. 629.
4. Жебровский, Л. С. Изучение состава молочных белков / Л. С. Жебровский. – Л. : Колос, 1979. – С. 38–41.
5. Mendelian polymorphisms underlying quantitative variation of goat  $\alpha_{S1}Cn$  / F. A. Grosclaude [et al.] // *Genet. Sel. Evol.* – 1987. – № 19. – P. 399–419.
6. Банникова, Л. Анализ неслучайности ассоциации аллелей 4 локусов белков молока в популяциях ярославской породы КРС / Л. Банникова, Л. Зубарева // *Генетика*. – 1996. – № 11. – С. 1569–1595.
7. The nature of  $\beta Cn$  heterogeneity in caprine milk / L. Chianese [et al.] // *Le Lait*. – 1993. – № 73. – P. 533–547.
8. Creangă, Șt. Aspecte privitoare la structura primară, secundară și terțiară a  $\kappa Cn$  și influența acestora asupra procesului de coagulare a laptelui / Șt. Creangă, V. Ujica // *Simpozionul Științific Național USAMV – Iași*. – 1995. – P. 53.
9. Jacob, E. Technological properties of milk by genetic polymorphisms of milk protein / E. Jacob, Z. Puhau // *J. Dairy Sci.* – 1992. – № 2. – P. 415–426.
10. Stasio, Di. Polimorfismo biochimico del latte nella raza bovina Grigio Alpina / Di Stasio, P. Merlin // *Revista Zootehnia e veterinarie*. – 1979. – № 2. – P. 64–67.
11. DNA polymorphisms at the casein loci in sheep / P. Di Grigorio [et al.] // *Anim. Genet.* – 1991. – № 22. – P. 21–30.
12. Банникова, Л. Анализ неслучайности ассоциации аллелей 4 локусов белков молока в популяциях ярославской породы КРС / Л. Банникова, Л. Зубарева // *Генетика*. – 1996. – № 11. – С. 1569–1595.
13. Perez, M. D. Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with Retinol and Fatty Acids and its Role as a Possible Biological Function for This Protein / M. D. Perez, M. Calvo // *Journal of Dairy Science*. – 1995. – V. 78(5). – P. 978–988.

POLYMORPHIC SYSTEMS OF PROTEINS OF MILK  
BLACK AND MOTLEY COWS OF THE MOLDAVIAN TYPE

T. A. Lupolov  
EE "Mozyrsky State Pedagogical University named after I. P. Shamyakin", Mozyr, RB

V. S. Petku  
State agricultural university of Moldova, Kishineu, Moldova

V. I. Naumenko  
EE "Mozyrsky State Pedagogical University named after I. P. Shamyakin", Mozyr, RB

Information about the genetic features of the allele pool breed allows more justified to come closer to the problem of farm gathering typical of the breed animals for maintain a characteristic genetic structure. The article provides the information about the polymorphic systems of black-and-motley cattle's milk protein of Moldovan type. Polymorphism of milk protein  $\alpha S1-CN$ ,  $\beta-CN$ ,  $\kappa-CN$ ,  $\beta-LG$  was found. In all loci except  $\alpha S1-CN$  was found 2 alleles. In  $\alpha S1-CN$  locus was discovered 3 alleles (A, B, C). The lowest frequency of gene was found in locus  $\alpha S1-CN^C - 0,0485$ .

Keywords: genotype, genetic polymorphism, milk protein, Moldovan type of black-and-motley cattle.

*Поступила в редакцию 01.09.14*

E-mail: lupolovt@tut.by

МГТУ ИМ. И.П.ШАМЯКИНА