

УДК 591.151:577.112:636.933.2.034

*Т. А. Луполов, В. С. Петку, С. М. Николаевич***ПОЛИМОРФНЫЕ СИСТЕМЫ БЕЛКОВ МОЛОКА ОВЕЦ ЦИГАЙСКОЙ ПОРОДЫ**

*У изученных животных в молоке обнаружен полиморфизм лактопротеинов  $\alpha_1S_1Cn$ ,  $\beta Cn$ ,  $kCn$ ,  $\beta Lg$ . В локусе  $\alpha_1S_1Cn$  выявлены два аллеля с наибольшей частотой для типа  $\alpha_1S_1Cn^B - 0,9608$ . В локусе  $\beta Cn$  было установлено два аллеля с наибольшей частотой аллеля  $\beta Cn^A - 0,9020$ . Локусы генов  $kCn$  и  $\beta Lg$  также характеризовались присутствием двух аллелей с наибольшей частотой для типов  $kCn^A (0,8627)$  и  $\beta Lg^B (0,5294)$ . Исследуемая популяция находилась в условиях генетического равновесия.*

*Выявленный полиморфизм может быть использован в качестве биохимического теста состояния генофонда породы, а также для прогнозирования на их основе продуктивных качеств животных.*

**Введение**

Практика ведения животноводства выработала различные методы создания и улучшения пород, суть которых сводится к выявлению и использованию животных с желательными признаками. Однако чем выше продуктивность животных, тем труднее достичь селекционных сдвигов. Альтернативой старым методам явились современные генетические подходы к совершенствованию пород, основанные на более полной оценке генотипа животных с помощью маркерных технологий, с использованием наследственного полиморфизма белков. Изменение частоты определённого аллеля типа белков или группы крови при проведении отбора в стаде может указывать на связь между иммуногенетическими свойствами и продуктивностью [1]. Это сделало возможным использование маркерных генов в практической селекции [2].

Например, у каракульской породы, установлено, что генотип AA по  $\beta$ -Lg влияет на молочную продуктивность: особи с таким генотипом производят больше молока по сравнению с другими генотипами [3].

Согласно другим исследованиям, для производства сыров лучше подходит молоко овец с гетерозиготным генотипом АВ [4]. Для производства сыра приоритетным является белок  $kCn$  – типа В [5].

Целью исследования явилось изучение генетического полиморфизма лактопротеинов  $\alpha_1S_1Cn$ ,  $\beta Cn$ ,  $kCn$ ,  $\beta Lg$  в молоке овец цигайской породы.

**Материалы и методы исследования.** Попыты проводились на популяции овец цигайской породы ( $n = 51$ ) овцеводческой фермы при Национальном Институте Зоотехнии и Ветеринарии «Тевит» (с. Максимовка, Ново-Анненского района, Молдова). Наследственно обусловленные типы белков определяли методом горизонтального электрофореза [6].

Приготовленный гель состоял из частично гидролизованного крахмала и трис-цитратного буфера с мочевиной, в 1000 мл которого содержалось 8,67 г трис-(оксиметил)-аминометана ( $C_4H_{11}O_3N$ ), 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  $+38,5^\circ C$ . 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 мертиололом в концентрации 1:15 000 или помещали в полиэтиленовых ампулах в холодильные камеры при температуре –15° С. При отсутствии таких ампул можно воспользоваться пенициллиновыми.

#### *Ход анализа*

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 пружинок или резинок.

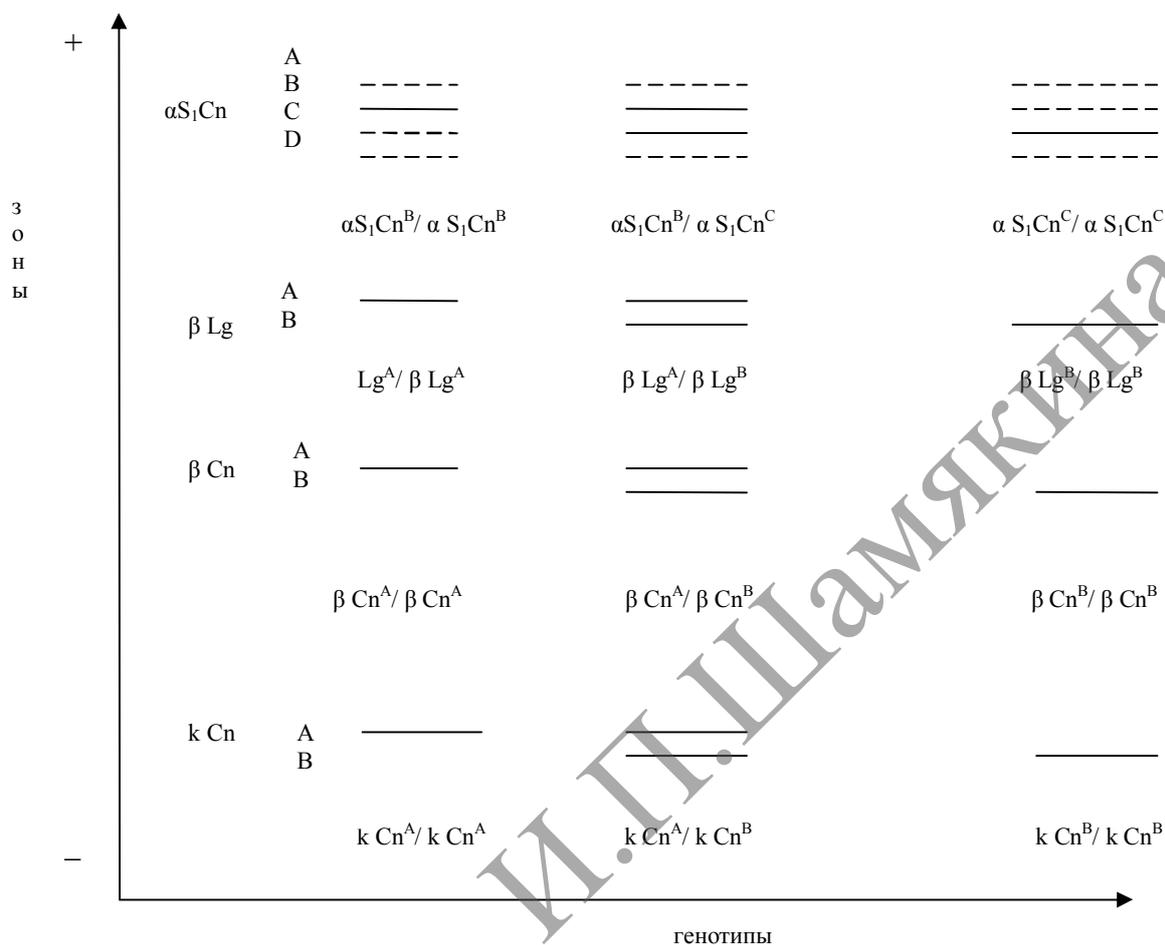
Линию старта устанавливали прокалыванием геля на расстоянии 1–2 см от катодного края металлической гребёночкой с размером зубца 4,0 x 6,0 x 0,5 мм. В каждый прокол на фильтровальной или хроматографической бумажке 4,0 x 6,0 мм вносили пробы молока. На одну ванночку наносили одновременно 40 образцов.

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 гнёзда 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<sub>1</sub>Cn,  $\beta$  Cn, k Cn,  $\beta$  Lg.

Расшифровка фореграмм проводилась согласно следующей схеме:



**Схема – Расшифровки фореграмм белков молока**

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

$$P(A) = (2AA + AB) / 2n, \tag{1}$$

$$q(B) = (2BB + AB) / 2n, \tag{2}$$

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)–(5).

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

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

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

где P (A) – частота аллеля A;  
 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 B;  
 z(C) – частота аллеля C.

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 – главный белок молока всех млекопитающих. Он принадлежит к группе белков, называемых фосфопротеинами. Как и все белки, казеин состоит из последовательности аминокислот, соединенных друг с другом в полипептидную цепь [7].

Установлено, что казеин молока представляет собой смесь нескольких фракций. Современные методы исследования позволяют проводить глубокий анализ состава казеина и выделить из него до 14–20 фракций. Все фракции казеина являются производными от одной из четырех основных (альфа, бета, каппа, гамма). Группа альфа-казеинов составляет 43–55%, бета-казеинов 24–35%, каппа-казеинов 8–15%, группа гамма-казеинов 3–7% [8].

**Альфа-S<sub>1</sub>-казеин** ( $\alpha S_1 Cn$ ) – это основная фракция казеина, которая состоит из смеси двух белков – главного и второстепенного компонентов, имеющих одинаковую первичную структуру, но отличающихся степенью фосфорилирования. Главный компонент  $\alpha S_1 Cn$  содержит 8 фосфоринных остатков, а второстепенный компонент – 9 остатков. Оба компонента характеризуются значительной чувствительностью к ионам кальция. Фракция имеет 5 генетических вариантов (A, B, C, D, E), отличающихся друг от друга как содержанием отдельных аминокислот, так и их расположением в полипептидной цепи [9].

В наших исследованиях в локусе  $\alpha S_1 Cn$  было обнаружено 2 аллеля:  $\alpha S_1 Cn^A$  с частотой 0,0392 и аллель  $\alpha S_1 Cn^B$  с частотой 0,9608 (рисунок 1).

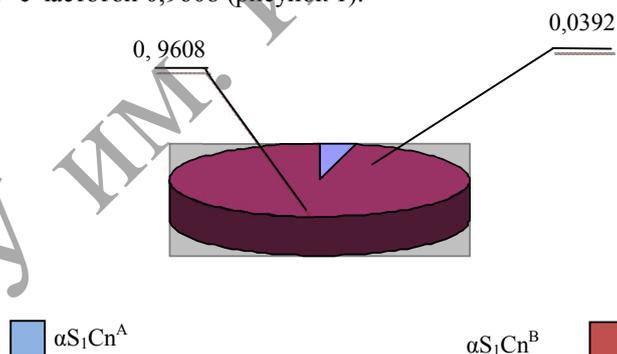


Рисунок 1 – Частота аллелей локуса  $\alpha S_1 Cn$  в молоке овец цыгайской породы

Присутствие двух аллелей в анализируемой популяции позволило распределить животных по типу  $\alpha S_1 Cn$  на три генотипа (таблица 1).

Таблица 1 – Распределение овец цыгайской породы по типу  $\alpha S_1 Cn$

Генетический вариант $\alpha S_1$ -казеина	Количество животных	$\chi^2$
AA	1 (0,08)*	10,58
AB	2 (3,84)*	0,67
BB	48 (47,08)*	0,00
Итого	51 (51)*	

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

Из 51 исследуемых особей гомозиготными генотипами ВВ обладали 48 или (94,12%), гомозиготным генотипом АА обладала 1 особь (1,96%), а гетерозиготными АВ – 2 особи (3,92%).

Исследуемая популяция в локусе  $\alpha S_1$ Cn находилась в генетическом равновесии, согласно закону Гарди – Вайнберга, по тесту  $\chi^2$  (0,00–10,58).

**Бета-казеин ( $\beta$ Cn)** – молочный белок, который составляет 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 [9].

До недавнего времени локус  $\beta$ Cn считался мономорфным [10], но в последнее время раскрыт его полиморфизм. В наших исследованиях было установлено присутствие двух аллелей  $\beta$ Cn<sup>A</sup> и  $\beta$ Cn<sup>B</sup> – с частотами 0,9020 и 0,0980 соответственно (рисунок 2).

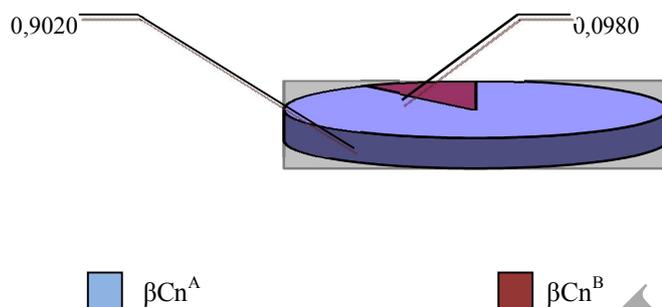


Рисунок 2 – Частота аллелей локуса  $\beta$ Cn в молоке овец цыгайской породы

Генотипы особей по типу  $\beta$ Cn в популяции распределились следующим образом (таблица 2).

Таблица 2 – Распределение овец цыгайской породы по типу  $\beta$ Cn

Генетический вариант $\beta$ -казеина	Количество животных	$\chi^2$
АА	42 (41,494)	0,01
АВ	8 (9,016)	0,11
ВВ	1 (0,49)	0,53
Итого	51 (51)	

Как видно из таблицы, 42 особи (82,35%) имели гомозиготный генотип АА, 8 особей (15,69%) – гетерозиготный генотип АВ и 1 особь – (1,96%) гомозиготный генотип ВВ.

Исследуемая популяция находилась в генетическом равновесии по тесту  $\chi^2$  (0,01–0,53).

**Каппа-казеин ( $\kappa$ Cn)** является главным белком, учитываемым при производстве таких молочных продуктов, как творог и сыр.  $\kappa$ Cn состоит из одного главного компонента, не содержащего углеводов, и шести второстепенных компонентов, относящихся к гликопротеидам.

Первичная структура белка представляет собой полипептидную цепь, содержащую 169 остатков аминокислот (в том числе 2 остатка цистеина), и одну фосфатную группу [11]. В настоящее время выявлено 10 аллелей каппа-казеина. Однако чаще встречаемыми в молоке овец являются варианты А и В.

В наших исследованиях в локусе  $\kappa$ Cn (рисунок 3) было обнаружено два аллеля – с наибольшей частотой для  $\kappa$ Cn<sup>A</sup> (0,8627) и наименьшей для  $\kappa$ Cn<sup>B</sup> (0,1373).

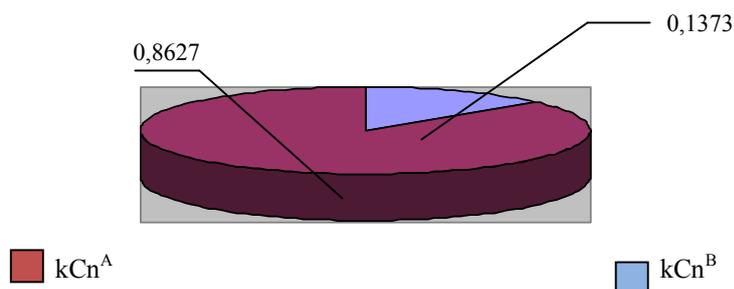


Рисунок 3 – Частота аллелей локуса  $\kappa$ Cn в молоке овец цыгайской породы

Присутствие трех аллелей в локусе *kCn* позволило распределить поголовье овец на три генотипа – AA, AB, BB (таблица 3).

Наибольшую численность в популяции составил гомозиготный генотип AA – 38 особей (74,51%), гетерозиготным генотипом AB обладали 12 особей (23,43%), а гомозиготным BB – 1 особь (1,96%).

Таблица 3 – Распределение овец цыгайской породы по типу *kCn*

Генетический вариант <i>k</i> -казеина	Количество животных*	$\chi^2$
AA	38 (37,96)	0,00
AB	12 (12,08)	0,00
BB	1 (0,96)	0,002
Итого	51 (51)	

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

**Бета-лактоглобулин** ( $\beta$ 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 [12].

$\beta$ 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<sup>A</sup> – 0,4706 и  $\beta$ Lg<sup>B</sup> – 0,5294 с более высокой частотой для типа  $\beta$ Lg<sup>B</sup> (рисунок 4).

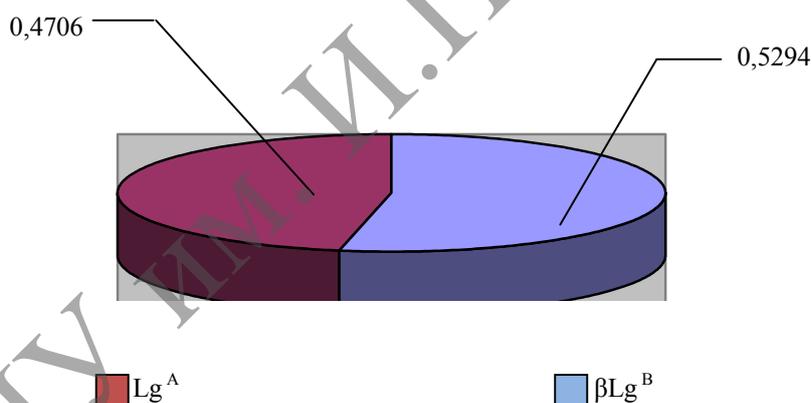


Рисунок 4 – Частота аллелей локуса  $\beta$ Lg в молоке овец цыгайской породы

Популяция овец по типам  $\beta$ Lg распределилась по трем генотипам (таблица 4) следующим образом: гомозиготный генотип AA – 19 особей (37,25%), гетерозиготный генотип AB – 10 особей (19,61%) и гомозиготный генотип BB – 22 особи (43,14).

Таблица 4 – Распределение овец цыгайской породы по типу  $\beta$ Lg

Генетический вариант $\beta$ -лактоглобулина	Количество животных	$\chi^2$
AA	19 (11,29)	5,27
AB	10 (25,42)	9,35
BB	22 (14,29)	4,16
Итого	51 (51)	

Результаты  $\chi^2$  (4,16–9,35) показывают генетическое равновесие в исследуемой популяции.

### Выводы

В результате исследования в молоке овец цыгайской породы обнаружен полиморфизм  $\alpha$ -казеинов,  $\kappa$ -казеинов,  $\beta$ -казеинов и  $\beta$ -лактоглобулинов.

Локусы всех изученных генов характеризовались присутствием двух аллелей с наибольшей частотой для типов  $\alpha_1S_1Cn^B$  (0,9608),  $\beta Cn^A$  (0,9020),  $\kappa Cn^A$  (0,8627) и  $\beta Lg^B$  (0,5294). Исследуемая популяция находилась в условиях генетического равновесия.

Самая низкая частота была установлена в локусе  $\alpha S_1Cn$ , для типа  $\alpha S_1Cn^B$  – 0,0392.

Исследуемая популяция распределилась по изученным локусам по трем генотипам. Наибольшее количество особей обладали гомозиготными генотипами BB по типу  $\alpha S_1Cn$  – (94,1%), а наименьшее (1,96%) – генотипами AA по типу  $\alpha S_1Cn$  и BB в локусе  $\beta Cn$  и  $\kappa Cn$  (1,96%).

Результаты  $\chi^2$  свидетельствуют о генетическом равновесии исследуемой популяции.

Выявленный полиморфизм может быть использован в качестве биохимического теста состояния генофонда породы, а также для прогнозирования на его основе продуктивных качеств животных.

### Літэратура

1. Жебровский, Л. С. Использование полиморфных белковых систем в селекции / Л. С. Жебровский. – Л. : Колос, 1979. – С. 38–41.
2. Меркурьева, Е. К. Генетика / Е. К. Меркурьева, З. В. Абрамова. – М. : Агропромиздат, 1991. – 508 с.
3. 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 Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2009. – № 2. – С. 87–90.
4. Wstępne badania nad określeniem wpływu genotypu laktoglobuliny na przydatność mleka do wyrobu serów podpuszczkowych i serwatkowych / K. Korman [et al.] // Zeszyt Specjalny. – 2002. – № 14. – P. 85–92.
5. Grosclaude, F. Structure, déterminisme génétique et polymorphisme de 6 lactoprotéines des bovines et des ovines / F. Grosclaude // INRA. ENSAR. Rennes. – 1991. – № 23–24.
6. Smithies, O. Zone electrophoresis in starch gels / O. Smithies // Biochem. J. – 1955. – Vol. 61. – P. 629.
7. Богатова, О. В. Химия и физика молока : учеб. пособие / О. В. Богатова, Н. Г. Догарева. – Оренбург : ГОУ ОГУ, 2004. – 137 с.
8. Дубинин, В. А. Молоко с точки зрения физиолога / В. А. Дубинин, А. А. Каменский // Химия и жизнь. – 1998. – № 6. – С. 44.
9. Martin, P. Polymorphisme de lactoprotéines caprines / P. Martin // Le Lait. – 1993. – № 73. – P. 511–532.
10. Dall Ollio, S. Ricerche elettroforetiche delle proteine del latte nella razza ovina Sopravissana / S. Dall Ollio, R. Davali, R. Bosi // Scientific Technology Latt. Cos. – 1991. – № 40. – P. 110–112.
11. Горбатова, К. К. Химия и физика белков молока / К. К. Горбатова. – М. : Колос, 1993. – 192 с.
12. 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.

### Summary

The scientific research has shown that the milk of the animals under discussion has the polymorphism of the following milk proteins:  $\alpha S_1Cn$ ,  $\beta Cn$ ,  $\kappa Cn$ ,  $\beta Lg$ . In the locus  $\alpha S_1Cn$  there are three alleles which are most typical for the type  $\alpha S_1Cn^B$  – 0,9608. There are two alleles which have been discovered in the type  $\beta Cn^A$  with the frequency of 0,9020 in the locus  $\beta Cn$ . The loci of the genes  $\kappa Cn$  and  $\beta Lg$  are characterized by two alleles which are most often found in the type  $\kappa Cn^A$  (0,8627) and  $\beta Lg^B$  (0,5294). The population under discussion has been at the stage of genetic equilibrium.

Thus the ascertained polymorphism may be widely used as a biochemical test to evaluate the state of the breed gene pool as for predicting the productive qualities of these animals.

Поступила в редакцию 25.01.11.