

ГЕНЕТИЧНА ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ БУГАЇВ-ПЛІДНИКІВ ЗА ЛОКУСОМ ГЕНА КАПА-КАЗЕЇНУ

Р. В. Ставецька*

Білоцерківський національний аграрний університет

Проведено порівняльний аналіз розподілу алельних частот локусу капа-казеїну у бугаїв-плідників Черкаського інституту агропромислового виробництва НААН України. Встановлені породні відмінності за даним показником: бажаним генотипом характеризуються бугаї-плідники швіцької породи Абел 593920645 та Драго 758976242. Використання перевірених гомозиготних бугаїв-плідників за геном капа-казеїну (генотип ВВ) дасть змогу створювати стада, у яких тварини вироблятимуть молоко з високими технологічними властивостями. Генотип ВВ капа-казеїну може бути використаний у якості селекційної ознаки під час відбору худоби, молоко яких придатне для виробництва високоякісних твердих сирів.

ДНК-технології стали невід'ємною частиною сучасної селекції в тваринництві. Включення генетичних маркерів у систему селекції (MAS–Marker Assistant Selection–маркер-спрямована селекція) сприяє вирішенню багатьох важливих проблем племінної справи. Суть цього напрямку досліджень — виявлення генів чи послідовностей ДНК, генетично зчеплених з «головними» генами господарсько-цінних ознак [5].

Кількість досліджених генетичних маркерів у домашніх тварин невелика, тому ведеться інтенсивна робота із складання генетичних карт великої рогатої худоби. Наприклад, спеціалісти центру досліджень США виділили майже 1200 мікросателітасоційованих маркерів [4].

Економічно ефективно використовувати молекулярно-генетичні маркери в роботі із племінними тваринами в процесі оцінки їхньої племінної цінності з урахуванням підбору відповідних варіантів схрещувань [9].

Казеїновий локус, який містить ген капа-казеїну, локалізований у хромосомі 6. Варіанти капа-казеїну А і В відрізняються двома амінокислотними замінами Thr136(ACC)/Ile(ATC) Asp148(GAT)/Ala(GCT) [8].

Алель А капа-казеїну забезпечує високі надой [6], алель В, особливо генотип ВВ, пов'язаний із високою масовою часткою жиру і білка в молоці, оптимальними розмірами казеїнових міцел, часом сичужного зсідання молока та щільністю одержаного сиру [6].

Результати досліджень у стаді холмогорської породи показали, що найвища масова частка жиру, білка та густина молока була в групі корів з генотипом ВВ. У середині лактації масова частка жиру в молоці корів з генотипом ВВ перевищувала аналогічний показник корів з генотипом АА на 0,31 %, корів з генотипом АВ — на 0,88 %. У кінці лактації масова частка жиру в молоці корів з генотипом ВВ була вищою порівняно з генотипом АА на 0,98 %, порівняно з генотипом АВ — на 1,01 % [2].

Визначення генотипів великої рогатої худоби за локусом капа-казеїну, виявлення порід з високою частотою зустрічності алельного варіанта В цього гена і тварин-носіїв цінного генотипу капа-казеїну ВВ відкриває реальні перспективи поставити під генетичний контроль селекційний процес формування стад корів, молоко яких придатне для виробництва високоякісних твердих сирів [1].

*Науковий консультант — д-р с.-г. наук, професор, членкор. НААН України Рудик І. А.

Найвища частота даного гена у сірої української породи (0,606), лебединської (0,548), білоголової української (0,380) [1] та української чорно-рябої молочної породи — 0,400 [3]. Голштинська порода у цьому відношенні має найгірші показники.

Відомо, що найбільший вплив на підвищення темпів генетичного прогресу популяцій мають бугаї, особливо батьки бугаїв. Своєчасна оцінка та маркування бугаїв-плідників, які допущенні до відтворення маточного поголів'я, за геном капа-казеїну, дасть змогу формувати гомозиготні стада молочної худоби з цінним генотипом ВВ і отримувати сир високої якості. Наприклад, у Росії провідні племпідприємства вказують у каталогах генотипи бугаїв за геном капа-казеїну [2].

Сьогодні в Україні молочна худоба представлена голштинською породою або породами, що поліпшувались нею. Це створює певні труднощі виробництва молочної сировини для отримання високоякісного сиру, тому виявлення і широке використання бугаїв-плідників із генотипом ВВ є актуальним і перспективним завданням.

Метою нашої роботи було проведення порівняльного аналізу розподілу алельних частот локусу капа-казеїну у бугаїв-плідників Черкаського інституту агропромислового виробництва.

Матеріали і методи. Дослідження провели на чистопородних бугаях-плідниках голштинської, симентальської, швіцької та абердин-ангуської порід (n=20). Кров брали з хвостової вени з наступною консервацією гепарином (з розрахунку 25 МО препарату на 1 мл крові). Дослідження проведені згідно з Інструкцією з проведення тестування племінних тварин за ДНК-маркерами № 741/9340 від 16.06.2004 р.

400 мкл розмороженої за кімнатної температури крові поміщали у пробірку об'ємом 1,5 мл і змішували з 4 об'ємами розчину ТЕ-буферу. Після короткого струшування пробірки центрифугували впродовж 30 с зі швидкістю 13400 об/хв для зсідання лейкоцитарної фракції. Після видалення рідини над осадом, яка містила лізат червоних кров'яних клітин, процедуру очищення лейкоцитів повторювали з 5 об'ємами ТЕ-буферу.

Далі лейкоцитів ресуспендували в 400 мкл буферу для лізису (5 М гуанідін тіоціанат, 0,02 М Na₃ЕДТА (рН 8,0), 0,05 М Tris-НСl (рН 6,4), 1,3 % Triton X-100). Гомогенат інкубували за 65 °С впродовж 5 хв, періодично струшуючи епендорф на вортексі для кращого лізису. Додавали 50 мкл 5 % водної суспензії діоксиду кремнію. Епендорфи струшували на вортексі і залишали відстоюватися за кімнатної температури 2 хв, після чого знову струшували і відстоювали впродовж 5 хв. Осаджували сорбент центрифугуванням за 5000 об/хв впродовж 30 с. Обережно, не зачіпаючи осаду сорбенту, відбирали супернатант і додавали 500 мкл розчину для відмивання (70 %-вий етанол, 0,01 М Tris-НСl (рН 8,0)). Осад сорбенту ретельно ресуспендували на вортексі і осаджували центрифугуванням за 10000 об/хв впродовж 30 с. Повторювали процедуру відмивання ще один раз. Відбирали супернатант і підсушували осад сорбенту за температури 65 °С до повного випаровування рідини впродовж 5–10 хв. Ресуспендували осад у 200 мкл ТЕ-буферу та прогрівали за 65 °С впродовж 30 хв, періодично струшуючи епендорфи на вортексі. Осаджували сорбент за 13400 об/хв впродовж 5 хв та обережно, не зачіпаючи осаду сорбенту, перенесли розчин ДНК у чисті епендорфи.

Концентрацію ДНК вимірювали за допомогою спектрофотометра СФ-46, визначаючи поглинання за довжини хвилі 260 нм (A_{260nm}). ПЛР проводили на ампліфікаторі Терцик (Москва, Росія). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила: 67 мМ Tris-НСl (рН 8,8), 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 1 од. Tag-полімерази, 50 нг геномної ДНК, 2,0 мМ MgCl₂ та по 0,4 мкМ кожного з праймерів. Послідовність праймерів для капа-казеїну була наступною: GAAATCCCTACCATCAATACC та CCATCTACGCTAGTTTAGATG, розмір специфічних продуктів ампліфікації — 273 п.о.

ПЛР проводили за наступними температурними режимами: 4 хв за 94 °С; 34 цикли: 15 с за 94 °С, 15 с за 58 °С, 15 с за 72 °С; 5 хв за 72 °С.

Після завершення програми ампліфікації продукти ПЛР обробляли специфічними ендонуклеазами рестрикції (Сібензим, Новосибірськ). Реакційна суміш об'ємом 35 мкл містила: 3,5 мкл 10× буферу для рестрикції специфічної ендонуклеази, 1 од. відповідної ендонуклеази, 25 мкл ПЛР-суміші. Рестрикцію проводили за 37 °С впродовж 12 год.

У таблиці 1 наведено розміри алельних варіантів дослідженого гену.

Послідовності праймерів та розміри специфічних продуктів ПЛР

Назва гену	Ендонуклеаза	Алель, п.о.	
		A (133, 91, 49)	B (224, 49)
Капа-казеїн	Hinf I		

Після завершення ПЛР у кожен пробірку з реакційною сумішшю вносили 5 мкл буферу для нанесення проб (15 % Ficoll-400, 0,02 М Na₃ЕДТА (рН 8,0), 0,15 % ксиленціанол). Для електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації використовували 2%-ний агарозний гель завдовжки 10 см. Електрофорез проводили у 0,5×ТВЕ буфері (50 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 10 мМ Na₃ЕДТА, 90 мМ борної кислоти) впродовж 1 год за напруги 5 В/см. Після закінчення електрофорезу гель обробляли бромистим етидієм (0,5 мкг/мл) та фотографували ПЛР-продукти за допомогою відеосистеми GelDoc XR System (BioRad). Молекулярну масу ПЛР-продуктів визначали за маркером GeneRuler 100 bp (Fermentas).

Результати та обговорення. Бугаї-плідники Черкаського інституту агропромислового виробництва належать до молочного (голштинська), комбінованого (симентальська, швіцька) та м'ясного (абердин-ангуська) напрямків продуктивності. Більшість з них оцінені за якістю нащадків, Лайон 578442399 та Вепр 5279 — за походженням (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристика бугаїв-плідників

№ п/п	Кличка і номер	Порода*	Племінна цінність				
			за надоем, кг	за вмістом жиру		за вмістом білка	
				%	кг	%	кг
1	Гумус 550119445	С	+392	-0,14	+15	-0,01	+13
2	Роман 660886883	Г	+136	+0,28	+28	+0,14	+16
3	Джупі Ред 114386090	Г	+849	-0,06	+30	-0,02	+28
4	Екі 1401938927	Г	+1078	-0,04	+41	-0,05	+34
5	Джамір 1401822731	Г	+957	+0,25	+59	+0,05	+37
6	Джокус 113080315	Г	+1789	-0,01	+72	-0,02	+59
7	Гарон 7712881947	Г	+2026	-0,40	+48	-0,11	+61
8	Бенаро Ред 359855968	Г	+1667	-0,14	+64	-0,01	+60
9	Абел 593920645	Ш	+878	+0,03	+34	-0,15	+20
10	Лайон 578442399	Г	+1134	-0,39	+18	-0,04	+36
11	Вепр 5279	Г	—	—	—	—	—
12	Тумпі Ред 112367468	Г	+1246	-0,12	+41	-0,12	+32
13	Драго 758976242	Ш	+235	+0,11	+16	+0,13	+15
1	2	3	4	5	6	7	8
14	Аура 373534221	Г	+1200	-0,15	+39	+0,03	+42
15	Трамп 1401861522	Г	+1657	-0,18	+52	-0,11	+47
16	Белісар Ред 365235897	Г	+843	+0,09	+42	+0,09	+36
17	Рондо 720201545	С	+729	-0,04	+28	+0,03	+26
18	Тріо 0939936464	А	—	—	—	—	—
19	Репп 688101342	С	+422	+0,26	+33	+0,06	+19
20	Манітус 336401654	Г	+1733	-0,09	+62	+0,00	+58

Примітка: С — симентальська, Г — голштинська, Ш — швіцька, А — абердин-ангуська

Бугаї-плідники голштинської породи мають середню племінну цінність за надоем +1255, масовою часткою жиру в молоці — 0,07, білка — 0,02, кількістю молочного жиру +46, молочного білку +42; симентальської породи — +514; +0,03; +0,03; +25; +19; швіцької — +556; +0,07; -0,01; +25; +17 відповідно. За високої племінної цінності за надоем для бугаїв-плідників голштинської породи характерні від'ємні значення племінної цінності. Це загальновідома тенденція від'ємної кореляції між цими показниками. Частота зустрічальності досліджених генотипів складає 0,900 для генотипу АВ і 0,100 для генотипу ВВ (рис. 1, рис. 2, табл. 3).

М Р 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

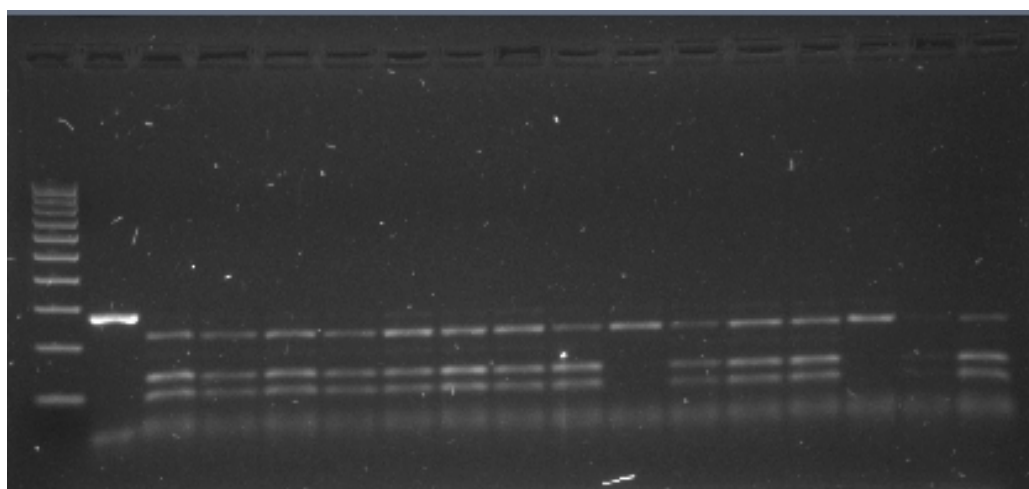


Рис. 1. Електрофоретичне розділення продуктів рестрикції гена капа-казеїну: М — маркер молекулярної маси (GeneRuler 100 bp, Fermentas); Р — ПЛР продукт; 1–15 — досліджені тварини

М Р 16 17 18 19 20

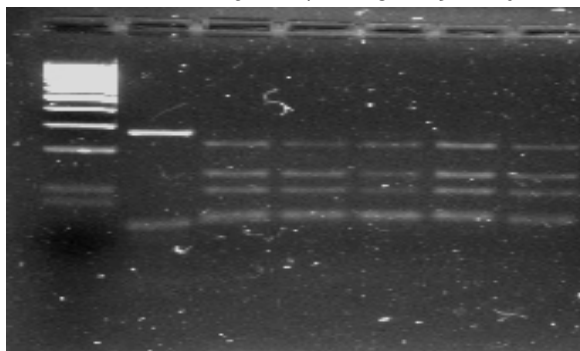


Рис. 2. Електрофоретичне розділення продуктів рестрикції гена капа-казеїну: М — маркер молекулярної маси (GeneRuler 100 bp, Fermentas); Р — ПЛР продукт; 1–5 — досліджені тварини

Із досліджених бугаїв-плідників різних порід бажаним генотипом характеризуються бугаї-плідники швіцької породи Абел 593920645 та Драго 758976242, тобто спостерігається тенденція впливу породи на наявність бажаного локусу капа-казеїну.

У швіцької худоби, яка поширена на північному-сході України, високі надії (5500–6000 кг), масова частка жиру (4,0–4,2 %) та білка (3,5–3,6 %) у молоці добре поєднуються з оптимальною живою масою (600–650 кг). Як показали результати полімеразно-ланцюгової реакції, бугаї-плідники швіцької породи Черкаського інституту агропромислового виробництва володіють спадковістю, яка сприятиме отриманню від їх дочок високих надій молока, придатного для сировиробництва.

Таблиця 3

Генотипи досліджених тварин за геном капа-казеїну

№	Розміри продуктів рестрикції, п.о.	Генотип
1	224, 133, 91, 2×49	АВ
2	224, 133, 91, 2×49	АВ
3	224, 133, 91, 2×49	АВ
4	224, 133, 91, 2×49	АВ
5	224, 133, 91, 2×49	АВ
6	224, 133, 91, 2×49	АВ

7	224, 133, 91, 2×49	AB
8	224, 133, 91, 2×49	AB
9	224, 49	BB
10	224, 133, 91, 2×49	AB
11	224, 133, 91, 2×49	AB
12	224, 133, 91, 2×49	AB
13	224, 49	BB
14	224, 133, 91, 2×49	AB
15	224, 133, 91, 2×49	AB
16	224, 133, 91, 2×49	AB
17	224, 133, 91, 2×49	AB
18	224, 133, 91, 2×49	AB
19	224, 133, 91, 2×49	AB
20	224, 133, 91, 2×49	AB

Сьогодні найпоширенішою породою в Україні є голштинська, яка належить до спеціалізованого молочного типу худоби і є беззаперечним світовим лідером серед спеціалізованих молочних порід. Голштинська порода широко використовується і використовувалась як поліпшуюча порода при створенні нових порід, у тому числі таких як українські чорно- і червоно-ряба та червона молочних порід, також за чистопородного розведення. Передбачалось, що розведення новостворених порід у переважній більшості буде проводитись із використанням плідників цих порід. Проте, як показує практика, продовжується проводитись поглинальне схрещування із голштинською породою і сучасне поголів'я має високу частку спадковості голштинської породи.

Селекція голштинської породи була спрямована виключно на підвищення молочної продуктивності з урахуванням екстер'єрного типу. Селекція на придатність молока до виробництва високоякісних твердих сирів не проводилась. Тому необхідним є виявлення бугаїв-плідників голштинської породи, які мають бажаний генотип BB за геном капа-казеїну та можуть бути використані для виробництва молока, придатного для виробництва високоякісних твердих сирів.

ВИСНОВКИ

Використання перевірених гомозиготних бугаїв-плідників за геном капа-казеїну (генотип BB) дасть змогу створювати стада, у яких тварини вироблятимуть молоко з високими технологічними властивостями. Із досліджених бугаїв-плідників Черкаського інституту агропромислового виробництва бажаним генотипом характеризуються лише бугаї-плідники швіцької породи Абел 593920645 і Драго 758976242. Генотип BB капа-казеїну може бути використаний у якості селекційної ознаки під час відбору худоби, молоко яких придатне для виробництва високоякісних твердих сирів.

Перспективи подальших досліджень. Слід проводити дослідження з виявлення бугаїв-плідників голштинської породи, гомозиготних за геном капа-казеїну (BB) і широкого використання їх та нащадків.

GENETIC DIFFERENTIATION OF BULL-SIRES OF LOKUS K-CASEIN

R. Stavetska

SUMMARY

The comparative analysis of division of allelic frequencies of lokus k-casein is conducted for bulls of the Cherkassy institute of agroindustrial production NAAS of Ukraine. The differences of pedigrees are established after this index: the desired genotype have bulls of Swiss breed Abel 593920645 and Drago 758976242. The use of tested bulls after the gene of k-casein will enable to create herds in which animals will yield milk with high technological properties. The genotype of BB of k-casein can be used as a selection indication during the selection of cattle, milk of which is suitable for the production of high-quality hard cheeses.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЗА ЛОКУСОМ ГЕНА КАПА-КАЗЕИНА

Р. В. Ставецкая

АННОТАЦІЯ

Проведен сравнительный анализ распределения аллельных частот локуса каппа-казеина у быков-производителей Черкасского института агропромышленного производства НААН Украины. Установлены породные отличия за данным показателем: желаемый генотип характерен для быков-производителей швицкой породы Абела 593920645 и Драго 758976242. Использование проверенных гомозиготных быков-производителей за геном каппа-казеина даст возможность создавать стада, в которых животные будут производить молоко с высокими технологическими свойствами. Генотип ВВ каппа-казеина может быть использован в качестве селекционного признака во время отбора скота, молоко которых пригодное для производства высококачественных твердых сыров.

ЛІТЕРАТУРА

1. Димань Т. М. Генетична диференціація domestikованих та диких видів копитних : дис. д-ра с.-г. наук: спец. 03.00.15 «Генетика» / Т. М. Димань. — К., 2002. — 314 с.
2. Молочное скотоводство — доходная отрасль животноводства // Аграрный эксперт. <http://www.agropressa.ru/prnwin.php?s=0&na=570>
3. Чумель Р. І. Генетико-біохімічні та продуктивні особливості худоби північно-східного регіону України : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: спец. 06.02.01 «Розведення та селекція тварин» / Р. І. Чумель. — Чубинське, 2004. — 21 с.
4. Hansson B. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations / B. Hansson, L. Westerberg // Mol. Ecol. — 2002. — Vol. 11. — № 12. — P. 2467–2474.
5. Hill W. G. In advances in statistical methods for the genetic improvement of livestock (ed. K. Hammond and D. Gianola) / W. G. Hill, S. A. Knoff // Springer-Verlag. — Berlin, 1990. — P. 477.
6. Marzalli A. S. Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk / A. S. Marzalli, K. F. Ng-Kwai-Hang // J. Dairy Sci. — 1986. — Vol. 69. — P. 1793–1798.
7. McLean D. M. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition / D. M. McLean, E. R. B. Graham, R. W. Ponzoni, H. A. McKenzie // J. Dairy Res. — 1985. — Vol. 51. — P. 531–546.
8. Pinder S. J. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of polymerase chain reaction / S. J. Pinder, B. N. Perry, C. J. Skidmore, D. Savva // Anim. Genet. — 1991. — Vol. 22. — P. 11–22.
9. Togashi K. Overview of genetic evaluation in dairy cattle / K. Togashi, C. Y. Lin, K. Yokouchi // Animal Science Journal. — 2004. — V. 75. — P. 275–284.

Рецензент: провідний науковий співробітник лабораторії біологічних основ генетики і селекції тварин, кандидат сільськогосподарських наук М. І. Кузів.