

Н.И. Павлова, Н.П. Филиппова, Х.А. Куртанов, В.А. Алексеев ПУТИ СНИЖЕНИЯ АЛЛЕРГИИ НА МОЛОКО КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ЯКУТИИ С ПОМОЩЬЮ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ГЕНА β -ЛАКТОГЛОБУЛИНА

УДК 637.144.5:577.1

С целью уменьшения количества заболеваемости аллергией на молоко среди населения Якутии впервые изучено аллельное и генотипическое разнообразие гена β -лактоглобулина у крупного рогатого скота, разводимого в Республике Саха (Якутия). Установлено, что частота аллеля *B* гена β -лактоглобулина преобладает у исследованных коров холмогорской и симментальской пород местной селекции и особенно у коров калмыцкой породы. Генотипом, отвечающим за низкое количество сывороточных белков в молоке, следовательно, за его гипоаллергенность, является генотип *BB*. Из изученных популяций им обладали чаще всего коровы калмыцкой породы и симментальской породы местной селекции.

Применение маркер-направленной селекции для увеличения количества особей с генотипом *BB* гена β -лактоглобулина среди молочного скота позволит значительно уменьшить аллергенность производимого молока, что является актуальным для уменьшения заболеваемости атопическими аллергиями в РС(Я).

Ключевые слова: бета-лактоглобулин, аллель, генотипы, полиморфизм, аллергия, сывороточные белки молока, молоко, крупный рогатый скот.

In order to reduce the incidence of milk allergy among residents of Yakutia, Russia we studied an allelic and genotype variation of beta-lactoglobulin gene of cattle breed in the Republic of Sakha (Yakutia). Allele distribution analysis of beta-lactoglobulin gene among the studied breeds demonstrated that the frequency of allele *B* prevails in Kholmogor cattle, local selection of Simmental cattle and especially in Kalmyk cattle. The genotype associated with the low content of milk serum proteins, and therefore hypoallergenic milk is *BB* genotype. This genotype was observed most often in cows of Kalmyk breed and cows of local Simmental breed.

The use of marker-assisted selection in dairy cattle will facilitate the increase in number of individuals with *BB* genotype of beta-lactoglobulin gene which is critical for the reduction of incidence of atopic allergies in the Republic of Sakha (Yakutia).

Keywords: beta-lactoglobulin, allele, genotype, polymorphism, allergy, milk serum proteins, milk, cattle.

Введение. В последние годы мировая медицинская статистика констатирует рост числа аллергических заболеваний. Причины этого связаны с рядом факторов: ухудшением экологической обстановки; увеличением случаев контакта населения с химическими веществами как на производстве, так и в быту; нерациональным питанием, применением продуктов с пищевыми добавками; растущей урбанизацией, изменением образа жизни, увеличением числа стрессовых ситуаций; увеличением потребления лекарственных препаратов [7].

По данным ГБУ РС (Я) ЯРКВД, у детей в возрасте до 14 лет атопический дерматит занимает первое место среди остальных дерматитов за последние три года.

Аллергические реакции на пищевые продукты встречаются часто, особенно распространена аллергия на молоко у

взрослых и детей. Непереносимость коровьего молока может быть вызвана самыми разнообразными нарушениями расщепления и всасывания углеводов, жиров или белков, однако реакции повышенной чувствительности к молоку обусловлены главным образом белковыми компонентами. Основными аллергенами коровьего молока, содержащимися в казеине и молочной сыворотке, являются β -лактоглобулин, альбумин, α -лактальбумин, лактоферрин и иммуноглобулины [5]. Основными подходами снижения аллергенности продуктов на основе молока являются: нагревание, обработка высоким давлением, химическая модификация (реакция Майера), ферментативный гидролиз [2].

Сильное и длительное нагревание уменьшает питательную ценность продукта, обработка высоким давлением, реакция Майера и ферментативный гидролиз требуют технического оснащения и больших экономических затрат. Исходя из этого, необходимо рассмотреть другие способы снижения аллергенности молока. Одним из таких способов является получение естественным путем натурального молока с низким содержанием β -лактоглобулина с помощью маркер-направленной селекции.

Все белки молока характеризуются

наличием генетически детерминированных полиморфных вариантов, отличающихся одной или несколькими аминокислотными заменами, которые, в свою очередь, обусловлены нуклеотидными заменами в разных аллелях одного гена.

Наиболее часто встречающимися вариантами в гене β -лактоглобулина являются *LGB A* и *LGB B*, которые отличаются двумя аминокислотными заменами: Asp 64 (*LGB A*) – Gly 64 (*LGB B*) и Val 118 (*LGB A*) – Ala 118 (*LGB B*) и соответственно кодируются разными аллелями данного гена. Аллель *B* *LGB* гена β -лактоглобулина связан с высоким содержанием в молоке казеиновых белков и высоким процентом жира, а вариант *A* *LGB* характеризуется высоким содержанием сывороточных белков [4]. Также известно, что степень экспрессии аллеля *A*, как в гомо-, так и в гетерогенном состоянии, значительно выше, чем аллеля *B* [1].

Тестирование аллеля *B* гена *LGB* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (ПЦР-ПДРФ) используется в селекционной практике в качестве маркера для получения молока с пониженным содержанием β -лактоглобулина на всех стадиях онтогенеза животных[6].

ФГБНУ «ЯНЦ КМП»: ПАВЛОВА Надежда Ивановна – м.н.с., аспирант ФГОУ ВПО «Якутская государственная сельскохозяйственная академия», Solnishko_84@inbox.ru, КУРТАНОВ Харитон Алексеевич – к.м.н., зав. лаб., hariton_kurtanov@mail.ru, АЛЕКСЕЕВ Владислав Амирович – н.с., vldslvalexseev@gmail.com; ФИЛИППОВА Наталья Павловна – к.б.н., доцент ЯГСХА, inniah1970@list.ru.

Учитывая связь генов со свойствами аллергенности молока, возникает необходимость оценки аллельного и генотипического разнообразия крупного рогатого скота, разводимого в Республике Саха (Якутия), по гену β -лактоглобулина. В связи с этим актуализируется изучение полиморфизмов гена β -лактоглобулина у завозного скота симментальской породы австрийской селекции, калмыцкой породы, а также местной симментальской и холмогорской пород.

Цель исследования: оценка аллельного и генотипического разнообразия крупного рогатого скота, разводимого в Республике Саха (Якутия), по гену β -лактоглобулина.

Материал и методы. Для данного исследования были использованы пробы ДНК из выборки популяции коров различных пород, разводимых в Республике Саха (Якутия). В выборку вошли коровы симментальской породы СХПК «Наяхы» и СХПК «Усть-Алдан» Усть-Алданского района, холмогорской породы ООО «Кладовая Олекмы» Олекминского района и КФХ «Дайына» Намского района, симментальской породы австрийской селекции и калмыцкой породы ООО «Агрофирма Немюгю» Хангаласского района. Всего исследовали 156 голов коров четырех пород, в т.ч. симментальской местной селекции $n=86$, холмогорской местной селекции $n=38$, симментальской австрийской селекции $n=20$ и калмыцкой породы $n=12$.

Экспериментальные исследования проводились в лаборатории генетики и селекции на базе ФГБОУ ВО «Якутская государственная сельскохозяйственная академия».

Сбор крови для выделения ДНК производили из яремной вены в объеме 6 мл в вакуумные пробирки с сухим ЭДТА К3. Геномную ДНК выделяли общепринятым стандартным фенолхлороформным методом [3].

Метод генотипирования с помощью ПЦР-ПДРФ основан на том, что изменения нуклеотидной последовательности в аллельных вариантах гена приводят к появлению или исчезновению сайтов рестрикции эндонуклеаз. При анализе структуры стада крупного рогатого скота разных пород по гену β -лактоглобулина использовали методу Дж. Ф. Медрано и Е. Акилар-Кордова [8].

Для проведения ПЦР использовали специфичные праймеры (ЗАО «Синтол», г. Москва). Характеристики праймеров, рестриктаз и сайта узнавания представлены в табл. 1.

Таблица 1

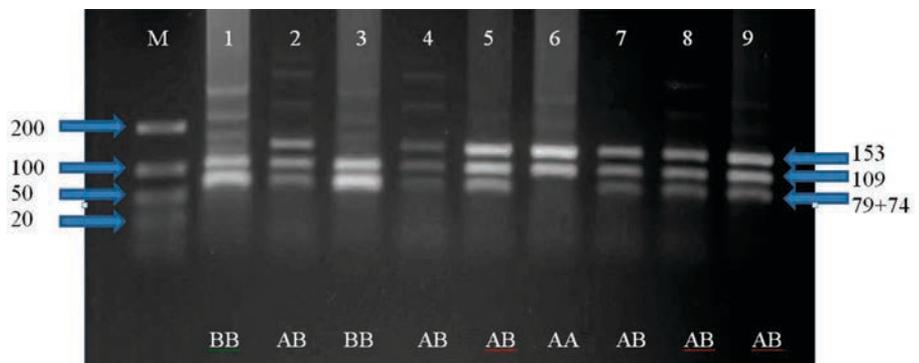
Характеристика праймера использованных для определения вариантов гена *bLGB*

Ген	Праймер	Рестриктаза	Сайт узнавания	Разработчик
<i>LGB</i>	F: 5'- GTCCTTGTGCTGGACACCGACTACA -3' R: 5'-CAGGACACCGG CTCCCGGTATATGA -3'	HaeIII	GG/CC	Medrano J.F. et al., 1990 [7]

Таблица 2

Условия проведения ПЦР

Ген	Амплификат	Длина фрагментов рестрикции	Условия проведения ПЦР
<i>LGB</i>	262	AA: 153, 109 AB: 153, 109, 79+74 BB: 109, 79+74	1. 94°C – 4 мин 2. (94°C-1 мин; 55°C-1 мин; 72°C-1 мин) · 30 3. 72°C – 5 мин



Электрофореграммы результатов ПЦР-ПДРФ анализа: М – маркер молекулярных масс Thermo Scientific FustRuler Ultra Low Range DNA Ladder, ready-to-use; 1, 3 – генотип BB; 2,4,5,7,8,9 – генотип AB; 6 – генотип AA

Для генотипирования стада по методике J.F. Medrano и соавторов получают продукт ПЦР гена β -лактоглобулина размером 262 п.о. ПЦР проводили на программируемом термоциклере «Терцик» (Россия). ПЦР смесь объемом 25 мкл содержала буфер для Taq ДНК полимеразы – 2,5 мкл, dNTP – 2,5 мкл, Taq ДНК полимеразы – 0,5 мкл, 0,5 мкл каждого праймера, 18 мкл бидистиллированной воды и 1 мкл исследуемого ДНК образца. Температурные условия для проведения ПЦР представлены в табл. 2.

Для определения полиморфизма гена β -лактоглобулина по вариантам А и В ПЦР пробы (20 мкл) обрабатывали 5 ед. эндонуклеазы рестрикции HaeIII в 1×буфере «С» («СибЭнзим», г. Новосибирск) при 37°C в течение ночи. Для визуализации продуктов рестрикции пробы с краской вносили в лунки 2%-ного агарозного геля с содержанием этидия бромид (0,5 мкг/мл) и проводили горизонтальный электрофорез при 15 В/см в течение 50 мин в 1×TBE буфере. После электрофореза наблюдали следующие генотипы: AA имеет фрагменты 153 п.о. и 109 п.о.; AB –

фрагменты 153, 109, 79+74 п.о.; BB – 109, 79+74 п.о. (рисунок).

Результаты и обсуждение. С помощью метода ПЦР-ПДРФ анализа ДНК у коров исследованных пород были обнаружены аллели А и В β -лактоглобулина (табл. 3).

Расчет соответствия фактического распределения генотипов по локусу β -лактоглобулина теоретически ожидаемому выявил, что во всех изученных породах сохраняется генное равновесие.

Установлено, что частота аллеля В преобладает над частотой аллеля А с достоверностью $p < 0,001$ у коров холмогорской (0,60) и симментальской пород местной селекции (0,65) и особенно у коров калмыцкой породы (0,83).

Генотипом, отвечающим за низкое количество сывороточных белков в молоке, тем самым гипоаллергенность молока, является генотип BB [6]. Из изученных популяций им обладали чаще всего коровы калмыцкой породы (67%) и симментальской породы местной селекции (43%). У коров симментальской породы австрийской селекции по гену β -лактоглобулина

Таблица 3

Частота встречаемости вариантов аллелей и генотипов гена β -лактоглобулина у коров

Порода	Кол-во голов	Распределение	AA		AB		BB		Частота аллелей, ед.		χ^2
			n	%	n	%	n	%	A	B	
Холмогорская	38	Н	7	18	16	42	15	40	0,40	0,60	0,52
		О	6,1	16	18,2	47,9	13,7	36,1			
Симментальская местной селекции	86	Н	11	13	38	44	37	43	0,35	0,65	0,06
		О	10,5	12,2	39,1	45,5	36,4	42,3			
Симментальская австрийской селекции	20	Н	6	30	11	55	3	15	0,58	0,42	0,34
		О	6,7	33,5	9,7	48,5	3,6	18,0			
Калмыцкая	12	Н	-	-	4	33	8	67	0,17	0,83	0,40
		О	0,35	2,9	3,4	28,3	8,75	68,8			

Примечание. Н – наблюдаемое распределение генотипов, О – ожидаемое распределение генотипов.

преимущественно встречались животные с генотипами АВ (55%) и АА (30%).

У коров калмыцкой породы отсутствует генотип АА. У симментальской породы австрийской селекции больше всего коров с генотипом АВ, тогда как у местных пород преобладает генотип ВВ. Это может быть следствием направленного селекционного отбора. Так, в республике большинство хозяйств направлены на производство сливок и масла и тем самым предпочитают разводить жирномолочный скот. Калмыцкий скот относится к породам мясного направления, поэтому отбор животных преимущественно велся по мясным качествам и приросту молодняка. Симменталы австрийской селекции являются породой молочно-мясного направления, с большим акцентом на молочную продуктивность, где главным селекционируемым признаком является высокая молочная продуктивность.

Вывод:

Как показали результаты исследования, частота встречаемости аллеля *LGB A* была ниже у крупного рогатого скота следующих пород – холмогорской (40%), калмыцкой (17%) и симментальской местной селекции (35%).

У коров симментальской породы австрийской селекции этот показатель был выше и составил 58%.

Желательным генотипом ВВ гена β -лактоглобулина, отвечающим за гипоаллергенность молока, из изученных популяций обладали больше всего коровы калмыцкой породы (67%) и симментальской породы местной селекции (43%). У коров симментальской породы австрийской селекции преимущественно встречались животные с генотипами АВ (55%) и АА (30%).

Таким образом, применение маркер-направленной селекции у молочного скота позволит увеличить количество особей с генотипом ВВ гена β -лактоглобулина, что является актуальным для снижения заболеваемости атопическими аллергиями в Республике Саха (Якутия).

Литература

- Афанасьев М.П. Экспрессия генов белков молока у разных видов сельскохозяйственных животных / М.П. Афанасьев, Р.А. Хаертдинов // Достижение науки и техники АПК. – 2010. – № 2. – С. 43-46.
- Afanasyev M.P. Gene expression of milk proteins in different species of farm animals / M.P. Afanasyev, R.A. Haertdinov // Science and agribusiness technology. – 2010. - № 2. – P. 43-46.

2. Головач Т.Н. Аллергенность белков молока и пути ее снижения / Т.Н. Головач, В.П. Курченко // Труды БГУ. – 2010 – Т. 5, ч. 1. – С. 9 – 55.

Golovach T.N. Allergenicity of milk proteins and ways to reduce / T.N. Golovach, V.P. Kurchenko // Proceedings of the BSU. – 2010. - Vol.5, Part 1. – P. 9 – 55.

3. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко. – Лесные Поляны: Изд-во ВНИИплем, 1999. – 148 с.

DNA- technology assessment of farm animals / L.A. Kalashnikova, I.M. Dunin, V.I. Glazko // Lesnaya polyana: Izd VNIIPlem, 1999. - 148 p.

4. Долматова И.Ю. Оценка генетического потенциала крупного рогатого скота по маркерным генам / И.Ю. Долматова, Ф.Р. Валитов // Вестник Башкирского университета. - 2015. - Т. 20, №3. – С. 850–853.

Dolmatova I.Yu. The assessment of genetic potential of cattle using marker genes / I.Yu. Dolmatova, F.R. Valitov // The Bulletin of the Bashkir university. - 2015. - Vol. 20, № 3. – P. 850 – 853.

5. Захарова И.Н. Диетотерапия при непереносимости белков коровьего молока у детей раннего возраста / И.Н. Захарова, Н.А. Корovina, Н.Е. Малова // Вопросы современной педиатрии. – 2005. - Т. 4, №1. – С. 67–70.

Zakharova I.N. Diet therapy at intolerance of cow's milk proteins at children of early age / I.N. Zakharova, N. A. Korovina, N. E. Malova // Issues of modern pediatrics. – 2005. - Vol. 4, №1. – P. 67 – 70.

6. Зиновьева Н.А. Патент РФ 2469088 Способ выявления варианта В β -лактоглобулина у крупного рогатого скота / Н.А. Зиновьева, Е.А. Гладырь, П.В. Горелов, Ю.И. Чинаров. – 2012. <http://allpatents.ru/patent/2469088.html>.

Zinovyeva N.A. Patent 2469088 of Russian Federation. The way of identification of the variant of beta-lactoglobulin in cattle / N.A. Zinovyeva, E.A. Gladyr, P.V. Gorelov, Yu.I. Chinarov // <http://www.findpatent.ru/patent/246/2469088.html> © FindPatent.ru - patent search, 2012-2016.

7. Разработка методики определения бета – лактоглобулина в молоке и молочных продуктах с применением метода иммуноферментного анализа / Е.А. Зверева, Н.И. Смирнова, А.В. Жердев [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5.

The development of identification beta-lactoglobulin in milk and dairy products using enzyme-linked immunosorbent assay / E.A. Zvereva, N.I. Smirnova, A.V. Zherdev [et al.] // Modern problems of science and education. – 2013. – № 5.

8. Medrano J.F. Polymerase chain reaction – amplification of bovine beta-lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis / J.F. Medrano, E. Aguilar-Cordova // Animal Biotechnology. - 1990. - V.1. P. 73.