

УДК 577.3

Е. В. КОЛЕСНЕВА, Ю. С. БАКАКИНА, Д. Л. СОДЕЛЬ, Е. В. ЖОРНИК, Л. А. БАРАНОВА,
Л. В. ДУБОВСКАЯ, И. Д. ВОЛОТОВСКИЙ

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ХОЗЯЙСТВЕННО ПОЛЕЗНЫХ ПРИЗНАКОВ ПОРОД ЖИВОТНЫХ

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: kolesneva_kate@mail.ru

(Поступила в редакцию 26.12.2013)

Введение. В условиях увеличения потребления и производства продукции животноводства селекция часто направлена на повышение продуктивности, при этом качеству мяса уделяется недостаточное внимание, хотя очевидно, что от качества используемого сырья зависит качество продуктов мясоперерабатывающей промышленности. В настоящее время перспективным направлением в селекции животных является использование ДНК-маркеров, характеризующих отдельные количественные хозяйственно полезные признаки.

Так, ген рианодин-рецепторного белка *RYR1* ассоциируется с индуцируемой стрессом злокачественной гипертермией. При наличии дефектов в гене *RYR1* при стрессовых воздействиях в мышечной ткани происходит повышение неконтролируемого выброса Ca^{2+} в клетках и, как следствие, усиленная мышечная работа и интенсивный гликолиз. Результатом являются низкие качество мяса и общая выживаемость животных.

Присутствие полиморфа V199I в гене *PRKAG3*, кодирующего изоформу субъединицы $\gamma 3$ АМФ-активируемой протеинкиназы, стимулирует организм к выработке огромного количества гликогена, что в свою очередь приводит к низкому рН мяса и заметному снижению влагоудерживающей способности. Ген *H-FABP* детерминирует проявление мясной и откормочной продуктивности, оказывая влияние на отложение внутримышечного жира у свиней.

На качество мяса оказывают также влияние мышечные белки и их состояние, от баланса между количеством синтезированных и деградированных белков зависит масса мышечной ткани [1, 2]. Из-за дифференциальной экспрессии генов, пост-трансляционных модификаций, субклеточной локализации, белкового обмена и взаимодействия белков друг с другом невозможно оценить состояние клетки в конкретный момент времени исходя только из информации о последовательности геномной ДНК или о количестве транскрибированной мРНК. Поэтому в последнее время в мышечной ткани ведется активный поиск белковых маркеров для оценки различных параметров мяса сельскохозяйственных животных, таких как процессы роста и развития, нежность и влагоудерживающая способность, а также для контроля технологических процессов обработки мяса.

Целью данной работы было исследование молекулярно-генетического и протеомного статуса сельскохозяйственных животных для оценки хозяйственно полезных признаков.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служили образцы мышечной и хрящевой ткани различных пород и помесей пород свиней.

Геномную ДНК выделяли с помощью набора реактивов Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Литва) согласно протоколу фирмы-изготовителя. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США).

Для генотипирования животных использовали метод ПЦР/ПДРФ-анализа (полимеразная цепная реакция/полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). ПЦР проводили на амплификаторе MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США) согласно условиям, ука-

занным в табл. 1. Реакционная смесь (общий объем 40 мкл) содержала 1,5 мМ MgCl₂, по 12 пМ каждого праймера, 500 мкМ смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 1,5 ед. Taq ДНК полимеразы (Fermentas, Литва) и 50 нг ДНК. Информация о последовательности праймеров, температуре отжига и ферментах рестрикции приведена в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. **Праймеры и ферменты рестрикции, используемые при ПЦР/ПДРФ-анализе полиморфизма генов *RYRI*, *PRKAG3* и *FABP-H***

Ген, локализация	Полиморфизм	Последовательность праймеров, (5' > 3')	Длина продукта, п.о.	Фермент рестрикции	Аллели, п.н.
<i>RYRI</i> , 19p13.1	17 экзон, C1843T (R615C)	F 5'-GTG CTG GAT GTG CTG TGT TCC CT-3' R 5'-CTG GTG ACA TAG TTG ATG AGG TTT G-3'	134	HhaI	NN – норма (54, 80) nn – мутация (134) Nn – гетерозигота (134, 54, 80)
<i>PRKAG3</i> , 15q	CBS область, G596A (V199I)	F 5'-GGA GCA AAT GTG CAG ACA AG-3' R 5'-CCC ACG AAG CTC TGC TTC TT-3'	258	BsaHI	VV (119, 91) II (167, 91) VI (167, 119, 91)
<i>FABP-H</i> , 6p21.31	5'область, полиморфный сайт GATTC	F 5'-ATC AGC CCA AGA GTG AGT TTC CTT TC-3' R 5'-CGC TCC CGA AAT AGG AAG CCC C-3'	560	Hinf	HH (201, 359) hh (560) Hh (560, 201, 359)

Для гидролиза амплифицированных фрагментов ДНК использовали рестриктазы Fermentas (Литва) в стандартных условиях. Продукты рестрикции анализировали гель-электрофоретическим методом в 1,0%-ном агарозном геле. Визуализацию осуществляли с использованием красителя Zubr Green 1 («Праймтех», Беларусь) в проходящем ультрафиолетовом свете при помощи имидж-системы GelDoc 2000 (Bio-Rad Laboratories, США).

Для экстракции белков из мышечной ткани использовали лизирующий буфер (pH 8,3), содержащий 50 мМ Трис, 10 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), 18 мМ 1,4-дителиотрейтол, 1 % (вес/объем) Тритона X-100 и 1%-ный (вес/вес) коктейль для ингибирования животных протеаз (Sigma, США) при соотношении 1 : 4 (масса/объем). Гомогенат осветляли центрифугированием при 16000g × 15 мин. Для осаждения белков добавляли 10 объемов охлажденного ацетона, содержащего 10 % (вес/объем) трихлоруксусной кислоты и 0,07 % (объем/объем) β-меркаптоэтанола. Образцы высушивали при комнатной температуре и растворяли в буфере для двумерного гель-электрофореза, содержащем 8 М мочевины, 50 мМ дителиотрейтол, 4 % (вес/объем) 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропаносульфат (ХАПС), 0,2 % (вес/объем) амфолитов 4–6 и 0,0002 % (вес/объем) бромфенолового синего. Для измерения концентрации белка применяли метод, разработанный Bradford [3], с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Двумерный гель-электрофорез проводили в соответствии со стандартной методикой [4]. Для разделения белков в первом направлении двумерного гель-электрофореза использовали 7-см стрипы с иммобилизованным линейным градиентом pH 4–7 (Bio-Rad Laboratories, США). Разделение во втором направлении проводили на 13%-ных вертикальных полиакриламидных гелях при силе тока 25 мА на гель. Визуализацию белковых пятен в гелях после завершения второго направления электрофореза осуществляли методом окрашивания нитратом серебра с тиосульфатом натрия [5]. Для анализа окрашенные серебром гели сканировали при помощи калибровочного денситометра GS-800 (Bio-Rad Laboratories, США). Карты от четырех биологических повторов статистически анализировали с использованием программного обеспечения PDQuest (Bio-Rad Laboratories, США).

Приготовление образцов для MALDI-TOF-MS (метод масс-спектрометрии (MS) с ионизацией лазерной десорбцией при содействии матрицы (MALDI) с времяпролетным масс-анализатором (TOF)), а именно расщепление белков на пептиды трипсином непосредственно в геле, экстракцию пептидов из геля, их очистку по технологии ZipTip (Millipore, США) и элюирование на планшет для MALDI-TOF-MS проводили с использованием роботизированной станции Xcise (Shimadzu Biotech, Япония) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Все масс-спектры были получены с использованием MALDI-TOF-масс-спектрометра Axima-CFR plus, оборудованного азотным лазером ($\lambda=337$ нм) (Kratos Analytical, Великобритания) в рефлекторном позитивном режиме в диапазоне масс 800–3500 Да. Для детекции пиков использовали программное обеспечение Kompact (Schimadzu, Япония). Полученный список средних масс для каждого образца сопоставляли с известными массами в базах данных NCBI, используя поисковую программу MASCOT (www.matrixscience.com) с ограничением по таксону *Mammals*. Чувствительность при этом была ± 1 Да, а ошибка расщепления – 1–2. Идентификацию белков считали успешной, когда количество вероятностных баллов, рассчитанное с помощью MASCOT MOWSE, было достоверно выше значения вероятности случайного события.

Результаты и их обсуждение. Для исследования генетического статуса животных был проведен анализ полиморфных вариантов генов *RYRI*, *PRKAG3*, *FABP-H* среди животных различных пород мясного и мясосального направления (рис. 1, табл. 2).

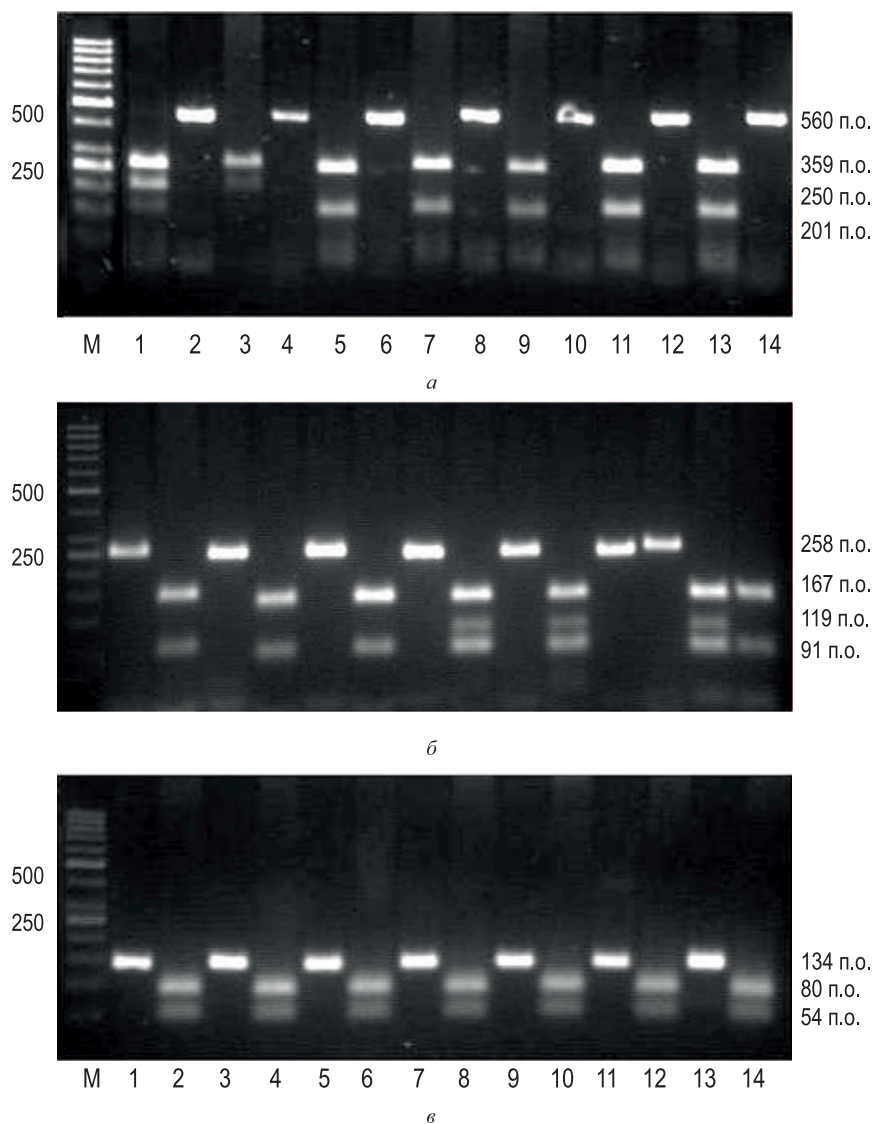


Рис. 1. Гель-электрофореграммы продуктов рестрикции гена *FABP-H* после гидролиза рестриктазой Hinf (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 – ПЦР-продукт на матрице геномной ДНК; 1 – гетерозиготный генотип Hh; 5, 7, 9, 11, 13 – гомозиготный генотип дикого типа HH) (а), гена *PRKAG3* после гидролиза рестриктазой BsaHI (1, 3, 5, 7, 9, 11, 12 – ПЦР-продукт на матрице геномной ДНК; 2, 4, 6, 13 – гомозиготный мутантный генотип Hh; 8, 10, 13 – гетерозиготный генотип Hh) (б), справа указано положение маркерных фрагментов ДНК (б) и гена *RYRI* после гидролиза рестриктазой HhaI (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – ПЦР-продукт на матрице геномной ДНК; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 – дикий генотип NN) (в). Слева указано положение маркерных фрагментов ДНК (п.о.), справа – размер продуктов рестрикции (п.о.)

Т а б л и ц а 2. Распределение генотипов в исследуемой выборке животных

Породы и помеси пород	Количество	Генотипы						
		FABP-H		PRKAG3			RYRI	
		НН, кол-во/%	Нн, кол-во/%	VV, кол-во/%	VI, кол-во/%	II, кол-во/%	NN, кол-во/%	Nn, кол-во/%
<i>Мясное направление продуктивности</i>								
«Белорусская мясная»	20	13/65	7/35	14/70	6/30	0	19/95	1/5
<i>Мясосальное направление продуктивности</i>								
«Дюрок»	7	5/71,4	2/28,6	0	3/42,9	4/57,1	7/100	0/0
«Йоркширская»	8	7/87,5	1/12,5	5/62,5	3/37,5	0/0	8/100	0/0
«Крупная белая»	3	3/100	0/0	1/33,3	2/66,7	0/0	3/100	0/0
<i>Помеси пород свиней</i>								
«Белорусская мясная» × «крупная белая»	5	5/100	0/0	4/80	1/20	0/0	5/100	0/0
«Йоркширская» × «ландрас»	4	4/100	0/0	0/0	4/100	0/0	4/100	0/0

По гену *FABP-H* установлено, что у породы «дюрок» 5 образцов ДНК (71,4 %) относятся к генотипу НН, а 2 образца (28,6 %) – к генотипу Нн. У породы «белорусская мясная» установлено, что 13 проб (65 %) относятся к генотипу НН, а 7 проб (35 %) – к генотипу Нн. У породы «крупная белая», а также у помесей пород «йоркширская» × «ландрас» и «белорусская мясная» × «крупная белая» все исследованные образцы относились к генотипу НН. Как видно из табл. 2, животные породы «дюрок» отличаются наименьшей частотой встречаемости генотипов НН гена *H-FABP*, что, вероятно, связано с низкой мраморностью мяса у этих пород. По данным зарубежных авторов D. W. Newsom и G. Thaller, содержание внутримышечного жира у животных этих пород в среднем составляет 1,68 % [6, 7]. Зарубежные исследователи T. Urban. и E. S. Cho утверждают, что применение гена-маркера *H-FABP* в селекции свиней обеспечивает увеличение массы задней трети полутуши у потомков на 0,5–0,8 кг уже в первом поколении [8, 9].

По гену *PRKAG3* были определены следующие аллельные варианты по породам. Аллельный вариант VI: 2 образца (66,7 %) породы «крупная белая», 6 образцов (30 %) породы «белорусская мясная», по 3 образца пород «йоркширская» и «дюрок» (37,5 и 42,9 % соответственно), 4 образца (100 %) помеси пород «йоркширская» × «ландрас» и 1 образец (20 %) помеси пород «белорусская мясная» × «крупная белая». Аллельный вариант II: 4 образца (57,1 %) породы «дюрок». Аллельный вариант VV (дикий тип): 1 образец (33,3 %) породы «крупная белая», 14 образцов (70 %) породы «белорусская мясная», 5 образцов (62,5 %) породы «йоркширская», 4 образца (80 %) помеси пород «белорусская мясная» × «крупная белая».

Фенотипический эффект V199I мутации гена *PRKAG3* приводит к уменьшению содержания гликогена в мышцах и увеличению pH, т. е. генотип II ассоциирован с низким содержанием гликогена, низким процентом постного мяса и высоким конечным pH. Животные, носители аллеля (V⁻), содержат в составе мышц большее количество гликогена, который после убоя превращается в молочную кислоту, что способствует более низкому уровню pH, чем в мясе животных с генотипом II. Так называемое «кислое мясо», pH 5,2, характеризуется бледным цветом мышц, мягкостью и водянистостью, т. е. низкой влагосвязывающей способностью. Для животных с генотипом VV гена *PRKAG3* показатели продуктивности соответствуют среднестатистическому уровню в отличие от генотипа VI, обладающего улучшенным качеством мяса. Аллельные варианты VI и II (носитель мутации V199I) являются предпочтительными из-за низкого содержания гликогена и высокого показателя конечного pH. Таких животных целесообразно использовать в селекции по улучшению качества мяса. В данном исследовании наибольшее количество образцов с генотипом VV гена *PRKAG3* было обнаружено среди породы «белорусская мясная» (70 %) и помеси «белорусская мясная» × «крупная белая» (80 %).

Ген *RYRI*, связанный со стрессовым синдромом свиней, также оказывает влияние на качество мяса. Животные – носители мутации (аллель nn) – характеризуются низким качеством мяса (PSE), оно бледное, экссудативное, мягкое. Установлено, что все протестированные образцы относятся к аллельному варианту дикого типа, за исключением одного образца породы «белорус-

ская мясная». Мутация в этом гене ведет к заболеванию свиней – злокачественному гипертермическому синдрому и появлению животных с низким качеством мяса. Таких животных необходимо исключать из селекционного процесса.

Таким образом, между отдельными особями животных, а также между их породами на сельхозпредприятиях страны существуют генетические различия, которые могут использоваться в способах разведения для получения животных с улучшенными характеристиками.

Для изучения протеома мышечной ткани различных пород свиней и помесей пород были получены протеомные карты мышечной ткани свиней пород «ландрас», «белорусская мясная», «дюрок», «йоркширская» и помесей пород «белорусская мясная» × «крупная белая» и «йоркширская» × «ландрас». Типичные протеомные карты белков мышечной ткани свиней пород «ландрас», «дюрок» и «белорусская мясная» с указанием областей, по которым наблюдались отличия, представлены на рис. 2.

Результаты сравнительного анализа протеомных карт белков мышечной ткани свиней различных пород и помесей пород представлены в табл. 3.

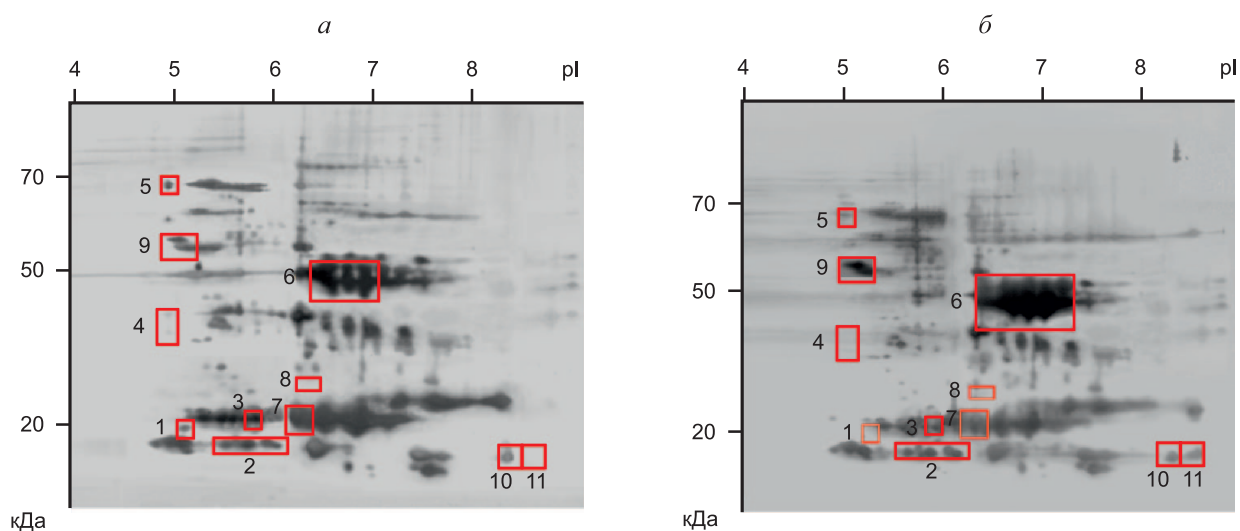


Рис. 2. Протеомные карты мышечной ткани свиней пород «ландрас» (а) и «дюрок» (б) с указанием областей, по которым наблюдались отличия

Т а б л и ц а 3. Отличия в относительном объеме белковых пятен на протеомных картах пород различного направления и помесей пород свиней, изображенных на рис. 2

Породы свиней и помеси пород животных	Номер области на рис. 2										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Мясное направление продуктивности</i>											
«Ландрас»	+	+	++	–	++	+	++	–	+	+	–
«Белорусская мясная»	+	++	+	+	+	+	+	–	++	+	+
<i>Мясосальное направление продуктивности</i>											
«Йоркширская»	–	–	+	–	+	+	++	–	+	+	+
«Дюрок»	+	++	++	–	++	+++	++	–	++	+	+
<i>Помеси пород свиней</i>											
«Белорусская мясная» × «крупная белая»		++	+	–	+	++	++	+	++	+	+
«Йоркширская» × «ландрас»	–	+	++	–	+	+	++	–	+	+	+

Как видно из рис. 2 и табл. 3, у пород мясной продуктивности «ландрас» и «белорусская мясная» наблюдаются отличия в протеомном профиле, состоящем из указанных на рис. 2 11 белков, по сравнению с породами мясосального направления «йоркширская» и «дюрок». При этом при-

существуют некоторые различия между породами в каждом из направлений. Так, на протеомных картах белков мышечной ткани свиней породы «ландрас» наблюдается увеличение экспрессии белковых пятен №3, 5 и 7 и снижение экспрессии белковых пятен №2 и 9, а также отсутствие белкового пятна №4 и присутствие белка №11 по сравнению с протеомными картами белков мышечной ткани свиней породы «белорусская мясная».

При сравнении пород мясного и мясосального направлений можно отметить, что протеомный профиль белков мышечной ткани свиней породы «дюрок» имеет большее сходство с породами мясного направления, чем с породой «йоркширская». В отличие от породы «йоркширская», на протеомных картах мышечной ткани свиней породы «дюрок», как и у свиней мясного направления, присутствуют белковые пятна №1 и 2. При этом наиболее значительное сходство протеомного профиля мышечной ткани свиней породы «дюрок» наблюдается с породой «ландрас» мясного направления: наблюдается увеличение экспрессии белковых пятен №3, 5 и 7 и отсутствие белкового пятна №4. Полученные результаты согласуются с данными о том, что в результате селекции изначально сальная порода «дюрок» изменила свое направление на мясосальное, причем многие селекционеры относят эту породу к чисто мясному направлению [10].

Рассмотрим протеомные профили помесей пород свиней. Наиболее информативными выглядят результаты протеомного профилирования породы «йоркширская» × «ландрас». Нами были также изучены обе исходные породы, тогда как в случае помеси пород «белорусская мясная» × «крупная белая», образцы мышечной ткани породы «крупная белая» в нашем исследовании отсутствовали. Как видно из полученных результатов, белки №1, 5 и 11, вероятно, унаследованы свиньями помеси «йоркширская» × «ландрас» от породы «йоркширская», тогда как белки №2 и 3 – от породы «ландрас».

Таким образом, результаты сравнительного анализа протеомов мышечной ткани свиней различных пород и помесей пород свиней позволяют заключить, что протеомный состав клеток мышечной ткани зависит от породы животного. Далее была предпринята попытка идентифицировать белки, по которым наблюдались отличия.

Результаты идентификации представлены в табл. 4. Идентификация оказалась успешной для 6 белков. Успех идентификации белков определяется как размером доступной информации в базах данных, так и объемами белкового пятна в геле, а также зависит от всех этапов предварительной обработки, предшествующих нанесению смеси пептидов на мишень.

Т а б л и ц а 4. Масс-спектрометрическая идентификация белковых пятен, отмеченных на рис. 2, с помощью поисковой базы данных MASCOT

Номер белкового пятна	Название идентифицированного белка	Количество вероятностных баллов	Совпадение аминокислотной последовательности, %	Молекулярная масса, кДа	pI
1	Легкая цепь 2 миозина	83	49	18966	4,9
3	Белок теплового шока 27, фрагмент	130	53	22768	5,98
5	Белок теплового шока 70, фрагмент	85	26	44763	6,22
6	Креатинкиназа	84	15	42944	6,63
9	Актин, фрагмент	56	17	44763	5,55

Белковое пятно №1 было идентифицировано как легкая цепь миозина. Легкие цепи миозина 1 – нефосфорилируемые субъединицы обычных миозинов, гексамерных моторных белков, являющихся посредником широкого спектра сократительных событий [11, 12]. У позвоночных миозин состоит из двух тяжелых цепей с молекулярной массой около 200 кДа и четырех легких цепей с молекулярной массой около 20 кДа. Легкие цепи миозина способны модулировать скорость сокращения, увеличивая или уменьшая взаимодействие головок миозина и нитей актина при образовании поперечных мостиков, которые собственно генерируют тянущее усилие и обеспечивают скольжение нитей актина относительно миозина.

Белковое пятно №9 представляет собой актин. Актин – глобулярный белок с молекулярной массой 42 кДа, полимеризованная форма которого образует микрофиламенты – один из основ-

ных компонентов цитоскелета эукариотических клеток [13]. Вместе с белком миозином актин образует основные сократительные элементы мышц – актомиозиновые комплексы саркомеров. Актин является высококонсервативным белком, экспрессирующимся во всех эукариотических клетках. У позвоночных животных различают 6 изоформ актина. В зависимости от изоэлектрической точки они делятся на 3 класса – α , β и γ , β и γ -актины характерны для немышечных клеток, а α -актины – для мышечных [12].

В целом приблизительно 50 % всех белков мышечной ткани – это белки сократительного аппарата, в большинстве включающих миозиновые комплексы толстых филаментов и актиновые нити тонких филаментов. Миозинсвязывающий белок В (MyBP-H) является важным регуляторным белком толстых нитей, находящихся в быстрых мышечных волокнах, и оказывает значительное влияние на длину и толщину миозиновых филаментов.

Белковые пятна № 3 и 5, как было обнаружено, являются белками теплового шока 27 и 70 соответственно (БТШ 27 и БТШ 70). В ответе на стрессовое воздействие клетки мгновенно продуцируют ряд белков, известных как белки теплового шока (БТШ), также называемые белками стресса [14]. Они рассматриваются как молекулярные шапероны, которые играют универсальную физиологическую роль в поддержании клеточного гомеостаза [15]. Известно, что продукция белков теплового шока повышается при заболеваниях мышц и после физической нагрузки. БТШ 27 является представителем класса малых белков теплового шока. Он обеспечивает способность клеток реагировать на травмы, тепловой шок, окислительный стресс и другие стрессовые факторы. БТШ 27 взаимодействует с ключевыми компонентами сигнального пути апоптоза и может препятствовать действию широкого спектра апоптотических агентов, вызывающих гибель клеток. БТШ 70 относится к классу белков теплового шока, экспрессирующихся во всех живых организмах [14]. При действии температурного и окислительного стрессоров происходит повреждение белков клеток, ведущее к частичному разворачиванию их структуры и агрегации. БТШ 70 связывает гидрофобные остатки на поверхности белковых молекул, предотвращая агрегацию частично денатурированных белков вследствие стресса [16]. БТШ 70 также связывают частично синтезированные полипептидные последовательности, способствуя образованию правильной структуры и препятствуя их агрегации. Доказано участие БТШ 70 в трансмембранном транспорте белковых молекул, в утилизации поврежденных или дефектных белков и антиапоптотических механизмах. БТШ 70 ингибирует апоптоз, препятствуя включению прокаспазы-9 в апоптосому, и дальнейшую активацию каскада эффекторных каспаз [17].

В скелетной мускулатуре наблюдается конститутивно повышенная экспрессия БТШ 27, который играет ключевую роль в образовании и защите структуры миофибрилл, в то время как БТШ 70 высококонсервативен и является обязательным белком стресса, который вызывает изменение ответа ткани скелетной мускулатуры на стресс, включая мышечную регенерацию и сокращение [14]. Различные функции, которые были описаны для БТШ 27 и БТШ 70, указывают на то, что они могут выполнять ключевую роль в росте мышечной массы у различных пород свиней [14, 16, 17].

Белок № 6 масс-спектрометрически идентифицирован как креатинкиназа. Белок № 7 идентифицирован как триозофосфатизомераза путем сопоставления с имеющимися в литературе протеомными картами мышечной ткани свиней.

Креатинкиназа – фермент, катализирующий реакцию фосфорилирования креатина, поставляющую энергетический субстрат для мышечного сокращения. Содержится в клетках скелетной мускулатуры, сердечной мышцы, головного мозга, щитовидной железы и легких [18]. Активность креатинкиназы значительно увеличивается при всех типах мышечной дистрофии, при неадекватно высоких мышечных нагрузках [12]. Повышенный уровень активности этого фермента тесно связан с процессами обмена в мышцах, что обуславливает повышенную откормочную продуктивность и мясные качества. Большинство исследователей указывают на высокую положительную степень взаимосвязи активности этого фермента с показателями мясности и возможность использования этого фермента для раннего прогнозирования продуктивности свиней [19]. При этом 3–4-месячный возраст максимальной активности креатинкиназы и является

ся оптимальным для тестирования. Кроме того, многими авторами было установлено, что повышенная активность креатинкиназы свидетельствует о предрасположенности к PSE [20]. Тем не менее улучшение мясных качеств будет наиболее эффективным при отборе свиней с повышенной активностью фермента креатинкиназы.

Триозофосфатизомераза – основной фермент метаболизма во всех живых клетках и тканях, катализирует превращение D-глицеральдегид-3-фосфата в дигидроксиацетонфосфат в ходе пентозофосфатного цикла, повышенная активность которого усиливает гликолитический метаболизм [21]. Белок представляет собой димер, состоящий из идентичных субъединиц с молекулярной массой около 26 кДа [22]. Нарушения синтеза этого фермента сопровождаются развитием триозофосфат-изомеразного дефицита, хронической гемолитической анемии, нейромышечной дисфункции, кардиомиопатии, нейродегенеративных заболеваний, склероза тканей [22].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что протеомный профиль мышечной ткани свиней зависит от направления продуктивности, а также позволяет установить характер наследования белков при скрещивании пород. Результаты идентификации показали, что в качестве протеомных маркеров мясной продуктивности свиней могут выступать актин и миозин, белки теплового шока, в частности, БТШ 27 и БТШ 70, триозофосфатизомераза, креатинкиназа.

Заключение. С использованием метода ПЦР/ПДРФ-анализа изучено распределение аллельных вариантов генов *FABP*, *RYRI* и *PRKAG3* у пород мясного и мясосального направления и помесей пород свиней. Установлено, что животные породы «дюрок» отличаются наименьшей частотой встречаемости генотипа НН гена *H-FABP*, что, вероятно, обусловлено низкой мраморностью мяса у этой породы и может быть использовано при селекции. Улучшению качества мяса при селекционном процессе будет способствовать и отбор животных по генотипам VI и II гена *PRKAG3*. В отношении гена *RYRI* все протестированные образцы относятся к аллельному варианту дикого типа, за исключением одного образца породы «белорусская мясная». Известно, что мутация в этом гене ведет к заболеванию свиней – злокачественному гипертермическому синдрому и появлению животных с низким качеством мяса, такие животные должны быть исключены из селекционного процесса.

На основе протеомного анализа белков мышечной ткани свиней пород мясного и мясосального направления предлагается использовать в качестве маркеров мясной продуктивности следующие белки: актин и миозин (могут обуславливать прирост мышечной ткани и влияют на структуру мышечной ткани), белки теплового шока (выполняют ключевую роль в росте мышечной массы у различных пород свиней), в частности, БТШ 27 (играет ключевую роль в образовании и защите структуры миофибрилл) и БТШ 70 (отвечает за мышечную регенерацию), триозофосфатизомераза (нарушения синтеза этого белка приводят к развитию различных патологий мышечной ткани), креатинкиназа (от активности фермента зависит интенсивность процессов мышечного обмена, что обуславливает повышенную откормочную продуктивность и мясные качества животного).

Литература

1. Bendixen E. // Meat Sci. 2005. Vol. 71. P. 138–149.
2. Maltin C., Balcerzak D., Tilley R., Delday M. // Proc. Nutr. Society. 2003. Vol. 62. P. 337–347.
3. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
4. Laemmli U. K. // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
5. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. // Anal. Chem. 1996. Vol. 68. P. 850–858.
6. Newcom D. W., Baas T. J., Schwab C. R., Stalder K. J. // J. Anim. Sci. 2005. Vol. 83, N 2. P. 316–323.
7. Thaller G., Kühn C., Winter A. et al. // Anim. Genet. 2003. Vol. 34, N 5. P. 354–357.
8. Urban T., Mikolášová R., Kuciel J. et al. // J. Appl. Genet. 2002. Vol. 43, N 4. P. 505–509.
9. Cho E. S., Park D. H., Byeong-Woo K. et al. // Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2003. Vol. 45, N 5. P. 703–710.
10. Blanchard P. J., Warkup C. C., Ellis M. et al. // Animal Science. 1999. Vol. 68. P. 495–501.
11. Bouley J., Meunier B., Chambon C. et al. // Proteomics 2005. Vol. 5. P. 490–500.
12. Van de Wiel D. F. // Meat Sci. 2007. Vol. 77, N 1. P. 46–54.
13. Doran P., Donoghue P., O'Connell K. et al. // Int. J. Mol. Med. 2007. Vol. 19. P. 547–564.
14. Xu Y. J., Jin M. L., Wang L. J. et al. // J. Anim. Sci. 2009. Vol. 87. P. 2519–2527.
15. Liu Y., Steinacker J. M. // Front. Biosci. 2001. Vol. 6. P. D12–D25.

16. Duguez S., Bihan M. C., Gouttefangeas D. et al. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2003. Vol. 285. P. E206–E215.
17. Beere H. M., Wolf B. B., Cain K. et al. // Nat. Cell Biol. 2000. Vol. 2, N 8. P. 469–475.
18. Argiroudis S. A., Kent J. E., Blackmore D. J. // Equine Vet. J. 1982. Vol. 14, N 4. P. 317–321.
19. Дементьева Т. А. // Зоотехния. 1997. № 5. С. 6–7.
20. Mitchell G., Heffron J. J. A. // Adv. Food Res. 1982. Vol. 28. P. 167–174.
21. Laville E., Sayd T., Terlouw C. et al. // J. Agric. Food Chem. 2007. Vol. 55. P. 5834–5841.
22. Orosz F., Oláh J., Ovádi J. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1792, N 12. P. 1168–1174.

*E. V. KOLESNEVA, Y. S. BAKAKINA, D. L. SODEL, E. V. ZHORNIK, L. A. BARANOVA,
L. V. DUBOVSKAYA, I. D. VOLOTOVSKI*

GENETIC AND PROTEOMIC ANALYSIS FOR EVALUATION OF ECONOMICALLY USEFUL TRAITS AMONG ANIMAL BREEDS

Summary

There are genetic differences in the distribution of alleles *FABP*, *RYR1* and *PRKAG3* responsible for the meat quality between pig breeds on the farms of the country. Proteome profile of pigs muscle was shown to depend on the direction of productivity and allowed to establish the nature of inheritance of proteins by crossbreeding. The proteomic markers of pigs meat productivity were revealed and identified. The obtained results can be used in pigs breeding.