

РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА МЯСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО НОСИТЕЛЬСТВУ МУТАЦИИ ГЕНА CAPN1

Сурундаева Л.Г.¹, Косян Д.Б.¹, Русакова Е.А.², Кван О.В.², Шейда Е.В.²

¹ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт мясного скотоводства Россельхозакадемии, г. Оренбург, Россия (460000, Оренбург, ул. 9 января, 29), e-mail: vniims.or@mail.ru

²ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный университет», г. Оренбург, Россия (460018, Оренбург, проспект Победы, 13), e-mail: kosyan.diana@mail.ru

Проведен анализ влияния полиморфизма гена CAPN1 на аминокислотный состав мяса бычков калмыцкой породы. Исследование проводилось с использованием современного оборудования методом капиллярного электрофореза с использованием системы «Капель». Анализ полученных данных позволил выявить определенные изменения в содержании аминокислот в мышечной ткани животных в связи с наличием мутационной аллели гена CAPN1 в разных исследуемых группах. По результатам исследования выявлены значительные различия в содержании валина, фенилаланина, в мышечной ткани. В образцах, полученных от особей II группы, содержание этих аминокислот оказалось выше аналогичного уровня в I и III группах на 11,7 %, 12,8 % и 1,7 % и 18,8 %. Максимальная динамика замечена в количестве фенилаланина при сравнении с I и III группой, в процентном отношении разница составила 12,8 % и 18,8 % соответственно. В отношении метионина и треонина разница между группами не превышала 3–5 % в пользу II. В ходе экспериментальных исследований были выявлены различия, что в исследуемом мясе содержится пониженный уровень валина, метионина и фенилаланина. Несмотря на пониженное содержание относительно эталона (на 30,6 % ниже нормы), различия наблюдаются внутри групп. Так, содержание валина преобладает во II и III группах в сравнении с I на 3,6 %.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, полиморфизмы, аминокислотный состав, длиннейшая мышца, ген CAPN1.

EARLY DIAGNOSIS OF AMINO ACID COMPOSITION OF MEAT OF CATTLE BY THE CARRIER OF THE MUTATION OF THE GENE CAPN1

Surundaeva L.G.¹, Kosyan D.B.¹, Rusakova E.A.², Kvan O.V.², Sheyda E.V.²

¹All-Russian research Institute of meat cattle breeding, Orenburg, Russia (460000, Orenburg, street 9 January, 29), e-mail: vniims.or@mail.ru

²Orenburg State University, Orenburg, Russia (460048, Orenburg, avenue Pobeda, 13), e-mail: kosyan.diana@mail.ru

Analysis of influence of gene polymorphism CAPN1 on the amino acid composition of the flesh of bulls Kalmyk breed. The study was conducted using modern equipment by capillary electrophoresis, using the system of «Drops». Analysis of the obtained data allowed to reveal certain changes in the content of amino acids in muscle tissue of animals in connection with presence of a mutant allele of a gene CAPN1 different groups studied. According to the results of the study revealed substantial differences in the content of valine, phenylalanine, in muscle tissue. In samples from individuals of the 2nd group, the content of these amino acids were higher than a similar level in the I and III groups of 11.7 %, 12.8 % and 1.7 % and 18.8 %. Maximum dynamics observed in the number of phenylalanine in comparison with I and III group, in percentage terms, the difference grew by 12.8 % and 18.8 %, respectively. In respect of methionine and threonine the difference between the groups did not exceed 3–5 % in favor II. In experimental studies have been identified differences that investigated meat that contains a reduced level of valine, methionine and phenylalanine. Despite the low content concerning the standard (30.6% below norm) differences within groups. So, the content of valine prevails in the II and III groups in comparison with I 3,6 %.

Keywords: Cattle, polymorphisms, amino acid composition, longissimus, gene CAPN1.

Введение

Изучение деградации клеточных белков (протеолиз) является одним из важных направлений биологии. Протеолиз позволяет поддерживать постоянство внутренней среды в клетке,

контролировать физиологическое состояние и представляет собой один из универсальных механизмов гомеостаза живой клетки [1].

В организме позвоночных содержится целый набор протеолитических ферментов, кодируемых до 5 % генома, основными из которых являются протеазы, в частности кальпаиновая система. Наличие хотя бы незначительных изменений в нуклеотидной последовательности способствует появлению дополнительных функций измененной системы [2,3]. Так, ген кальпаина – CAPN1, кальций-зависимой протеазы, изменяющей мышечную ткань в процессе автолитического созревания мяса – член широкого семейства цитозольных Ca²⁺-активируемых цистеиновых протеаз, обладающих структурой EF-hand. В кодирующей части этого гена ранее были обнаружены две несинонимические замены, которые приводили к изменениям в аминокислотной последовательности в положениях 316 (глицин на аланин) и 530 (валин на изолейцин). Выявлено, что данная замена сопряжена с повышением интенсивности посмертных автолитических процессов в тканях. Однако не описано влияние данного полиморфизма на общее содержание аминокислот, а также на количественную динамику заменимых и незаменимых аминокислот в отдельности [4,5].

Материалы и методы исследования

Оценка взаимосвязи различных аллельных вариантов гена CAPN1 и аминокислотного состава мышечной ткани проведены на модели молодняка калмыцкой породы крупного рогатого скота (КРС). На основе предварительного генетического анализа из 70 бычков месячного возраста было сформировано 3 группы животных (n=15): I – без мутационной аллели (GG); II – гетерозиготное ее проявление (GC); III – с наличием полиморфизма в гене CAPN1 (CC). В последующем, все животные выращивались в одних условиях. Убой проводился в возрасте 14 месяцев.

Генетический анализ для выявления полиморфизма гена CAPN1 проводился с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (АНК-32, Синтол, Россия). В качестве исследуемого биологического материала в работе использовались образцы крови для выделения ДНК. Выделение ДНК для постановки ПЦР в реальном времени проводилось с использованием набора «ДНК-экстран» (Синтол, Россия). Праймеры синтезированы на основе нуклеотидной последовательности ДНК гена CAPN1 крупного рогатого скота (Синтол, Россия):

5'-AGCAGCCCACCATCAGAGAAA – 3'

5'- TCAGCTGGTTCGGCAGAT – 3'

Исследования проведены на базе Испытательного Центра Всероссийского научно-исследовательского института мясного скотоводства (аккредитация Госстандарта России – № РОСС RU 0001 21 ПФ 59 от 29.08.2008 г.).

Аминокислотный состав длиннейшей мышцы был определен методом капиллярного электрофореза с использованием системы «Капель» путем измерения массовой доли аминокислот.

Статистическая обработка полученного материала проводилась при помощи приложения «Excel» из программного пакета «Office XP» и «Statistica 6.0», включая определение средней арифметической величины (M), стандартной ошибки средней (m).

Результаты исследований

Анализ полученных данных позволил выявить определенные изменения в содержании аминокислот в мышечной ткани животных в связи с наличием мутационной аллели гена CAPN1 в разных исследуемых группах (табл. 1).

Таблица 1. Содержание незаменимых аминокислот в образцах мышечной ткани исследуемых животных

Показатель	Группа		
	I	II	III
Незаменимые АМК, мг/100г:	6786±534,5	6941±564,9	6687±576,8
Валин	678±3,05	768±20,0**	755±8,03
Лейцин-изолейцин	1855±75,0	1793±71,9	1808±61,0
Лизин	1748±40,2	1729±49,9	1708±24,5
Метионин	519±10,0	528±58,3	527±38,9
Треонин	860±116,8	897±30,3	847±24,4
Триптофан	339±29,7	323±2,8	309±17,3
Фенилаланин	787,3±158,1	903±14,8**	733±24,6

В частности, при относительных незначительных расхождениях по общему уровню незаменимых аминокислот 2,23–3,65 %, по содержанию валина, фенилаланина, в мышечной ткани различия оказались значительными. Так, в образцах, полученных от особей II группы, содержание этих аминокислот оказалось выше аналогичного уровня в I и III группах на 11,7 %, 12,8 % и 1,7 % и 18,8 %. Максимальная динамика замечена в количестве фенилаланина при сравнении с I и III группой, в процентном отношении разница составила 12,8 % и 18,8 % соответственно. В отношении метионина и треонина разница между группами не превышала 3–5 % в пользу II.

Наименее биологически полноценные белки в мышцах были характерны для I группы. Так, по содержанию заменимых аминокислот разница составила со II группой – 0,6 %; с III – 5,2 %. II группа превалировала по значениям серина и гистидина. Разница по серину составила:

I–II – 13,5 %, II–III – 3,3 %. Количество гистидина во II группе было выше на 3,4 % и 10,5 % относительно I и III групп соответственно (табл. 2).

Таблица 2. Содержание заменимых аминокислот в образцах мышечной ткани исследуемых животных

Показатель	Группа		
	I	II	III
Заменимые АМК, мг/100г:	7012±456,4	6966±432,3	6648±414,7
Аланин	1431±54,7	1387±69,9	1310±51,3
Аргинин	1431±54,7	1323±25,2	1331±37,7
Гистидин	722±95,0	748±3,6	669±22,8
Глицин	920±30,4	897±37,4	826±21,5
Оксипролин	61,6±0,9	60,4±2,13	63,3±0,45
Пролин	731±20,6	712±80,5	683±16,4
Серин	784±8,22	906±104,4	876±13,5

С уменьшением содержания аминокислот в мясе понижается энергетическая ценность его белков, а утрата в том числе и незаменимых аминокислот существенно понижает биологическую ценность этих белков, поэтому данный критерий является важным для оценки параметра питательности мясной продукции (табл. 3).

Таблица 3. Содержание незаменимых аминокислот, в 1 г белка длиннейшей мышцы спины бычков, мг/г

Показатель	Аминокислота						
	валин	лейцин-изолейцин	лизин	метионин	треонин	триптофан	фенилаланин
I	34,7±0,11	85,1±1,13	81,0±6,34	24,6±0,81	40,7±0,75	15,1±0,48	38,0±1,67
II	36,0±0,15	84,0±2,10	81,0±0,70	24,7±2,20	42,0±0,70	15,1±0,50	42,3±0,40
III	36,0±2,50	84,0±2,10	81,0±0,70	24,7±2,20	42,0±0,70	15,1±0,50	42,3±0,40
Эталонные значения, мг/г белка	50,0	70,0	55,0	35,0	40,0	10,0	60,0

В ходе экспериментальных исследований было выявлено, что в исследуемом мясе содержится пониженный уровень валина, метионина и фенилаланина. Несмотря на пониженное содержание относительно эталона (на 30,6 % ниже нормы), различия наблюдаются внутри групп. Так, содержание валина преобладает во II и III группах в сравнении с I на 3,6 %.

Таким образом, можно сделать вывод, что наличие полиморфизма в гене CAPN1 способствует изменению в белковом синтезе, особенно это проявляется на примере валина. Поскольку данная аминокислота является основным звеном в метаболизме в мышцах и восстановлении поврежденных тканей, то можно предположить, что животные, имеющие данную мутацию, будут характеризоваться более ускоренными темпами синтеза мышц и, соответственно, ростом.

Список литературы

1. Внутриклеточная Ca²⁺-зависимая протеолитическая система животных / Л. А. Бондарева, Н. Н. Немова, Е. И. Кяйвяряйнен ; [отв. ред. Т. А. Валуева]; Рос. акад. наук, Карел. науч. центр, Ин-т биологии. – М.: Наука, 2006. – 294 с.: ил.; 22 см. – Библиогр.: с. 232-286. – 640 экз. – ISBN 5-02-035568-2.
2. Косян, Д. Б. Использование метода ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по гену CAPN1 с использованием генетических маркеров / Д. Б. Косян, Е. А. Русакова, О. В. Кван, Л. Г. Сурундаева, Л. А. Маевская // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – № 6. – С. 26-30.
3. Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов: учебное пособие / М.Б. Ребезов, Е.П. Мирошникова, О.В. Богатова и др. – Челябинск: Издательский центр: ЮУрГУ, 2011. – Ч. 2. – 133 с
4. Page, V. T. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle / V. T. Page, E. Casas, M.P. Heaton, M. Koohmaraie et al. // Journal Animal Science, 2002. – V. 80. – P. 3077-3085.
5. Hughes, T. Regulation of gene expression by alternative untranslated regions / T. Hughes // Trends Genet. – 2006. – V.22. – P.119-122.

Рецензенты:

Лебедев С.В., д.б.н., заведующий экспериментально-биологической клиникой (виварий) ФГБОУ ВПО ОГУ, г. Оренбург.

Дускаев Г.К., д.б.н., заведующий отделом кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов ГНУ ВНИИМС Россельхозакадемии, г. Оренбург.