

ИЗМЕНЧИВОСТЬ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ КОСТРОМСКОЙ ПОРОДЫ

Сообщение 1

ПИЛЬКО В. В., ГУРЬЯНОВА А. С.,
СИРОТКИНА Л. К.

Генетический полиморфизм многих белков организма сельскохозяйственных животных, как результат эволюционного процесса, представляет значительный теоретический и практический интерес и вызывает необходимость дальнейшего изучения его у отечественных пород.

Изучение этого явления стало возможным относительно недавно, благодаря разработке и совершенствованию лабораторных методик тонкого разделения белковых смесей животного происхождения. К числу таких методик, получивших за последние годы широкое применение, относится разработанный О. Смитсом (1955) метод электрофореза в крахмальном геле, позволяющий разделить гомологичные белки с самыми незначительными различиями в первичной их структуре. Используя этот метод, в последнее время ряд авторов успешно изучают явление генетически обусловленного полиморфизма энзиматических белков-ферментов.

Изменчивость двух ферментов сыворотки крови крупного рогатого скота костромской породы: амилазы и церулоплазмина и связи типов амилазы с их активностью мы определяли обычными методами.

Типы амилазы и церулоплазмина определяли с помощью электрофореза в крахмальном геле по методике Эбертуса (1967). Электролитный буфер включал 0,75 г гидрата окиси лития, 11,7 г борной кислоты на литр дистиллята; буфер для геля — 1,744 г триса и 0,92 г лимонной кислоты на литр дистиллята. Сила тока на одну гелевую пластину размером 210×130×6 мм составляла 45 м/а.

При удалении линии «боратов» к аноду на 7—9 см от линии старта разгонка прекращалась. Чтобы не разогревался гель, концентрацию электролитного буфера в анодных ваннах разбавляли водой в два раза. По окончании электрофореза гелевые пластины разрезали на три части вдоль, одна из них использовалась для опре-

деления типов церулоплазмина и амилазы, а две других — для изучения других ферментов или белков. Церулоплазмин определяли после двухчасовой инкубации гелевой пластины в ацетатном буфере (13,6 ацетата натрия с тремя молекулами воды на 1 л воды) при 37°C. В этом буфере предварительно растворяли 1,5 г парафенилендиамина. После указанного срока окраску сливали и читали типы церулоплазминов: быстрая полоса — тип А, медленная — тип В и обе — тип АВ. Появление окрашенных полос в местах оксидазной активности (церулоплазминов) обусловлено тем, что при окислении п-фенилендиамина образуется нерастворимый в воде хинон — «основание Бандровского». Далее гелевые пластины заливали ацетатным буфером указанной концентрации и вновь помещали в термостат на 12 часов. Затем буфер заменяли промывной жидкостью (5 частей воды, 5 частей гидролизного спирта, одна часть ледяной уксусной кислоты). Через 1—2 часа жидкость удаляли и гель заливали водой. Спустя час читали типы амилазы, смотревшиеся как полупрозрачные полосы вблизи старта: быстрая полоса — тип В, медленная — С и обе — ВС.

Определяли амилазную активность сыворотки крови животных с разными типами амилазы по методике Смита и Роя в модификации А. П. Рыжовой (1965). Активность амилазы выражали в условных единицах Смита и Роя. За единицу активности принималось количество фермента, которое гидролизует 10 мг крахмала за 30 минут до стадии, не дающей окраски с йодом. Содержание амилазы в условных единицах рассчитывалось по формуле $\frac{A-B}{A} \times \frac{1,2 \cdot 100}{10 \cdot 0,02}$, где А — показания электрофотоколориметра в контроле, В — в опыте, 1,2 — миллиграммов крахмала в опыте, 0,02 — количество сыворотки, взятой в опыт. Полученный цифровой материал обработан общепринятыми методами биометрии.

Типы указанных ферментов были изучены в случайной выборке животных костромской породы племзавода «Пламя» в марте 1971 г., включавшей коров III отела и старше, I—II отелов и нетелей. Типы амилазы изучали у 302 и типы церулоплазминов — у 297 животных. Изучаемые системы оказались диаллельными: по амилазе установлено три типа — В, С и ВС, по церулоплазмину — А, В и АВ. Концентрация генов фактически составила $A_m^B = 0,6005$, $A_m^C = 0,3995$, $C_p^A = 0,7775$ и $C_p^B = 0,2225$.

По обеим изученным системам исследованная популяция животных существенно отличается от черно-пестрой и красной датской популяций, охарактеризованных по этим же системам В. А. Джумковым (1970). Так, по черно-пестрому скоту им получено $A_m^B = 0,567$, $Cp^A = 0,445$; по красному датскому скоту $A_m^B = 0,713$ и $Cp^A = 0,717$.

По обеим изученным системам в исследованной популяции наблюдается соответствие полученной и ожидаемой частоты аллелей A_m и Cp . В табл. 1 представлена характеристика изученных групп животных костромской породы по типам амилазы и церулоплазминов. Из материалов таблицы видно, что по обеим системам в возрастном аспекте в стаде наблюдается перераспределение типов амилазы и церулоплазминов. Среди коров III отела и старше отмечается более высокая концентрация генов A_m^B и Cp^A по сравнению с группой нетелей: $A_m^B = 0,629$ и $Cp^A = 0,869$ у коров и $A_m^B = 0,534$ и $Cp^A = 0,697$ у нетелей соответственно. У коров I—II отелов эти величины имеют промежуточное значение. В результате какого процесса это происходит, можно только предполагать. Во-первых, это результат селекции на более высокую жизнеспособность и продуктивность, или, во-вторых, это результат использования ограниченного числа производителей в стаде в связи с искусственным осеменением. Для выяснения этого необходимы дальнейшие исследования, поскольку от решения вопроса зависит возможность использования обоих тестов в селекции молочного стада.

Таблица 1

Распространение типов изученных ферментов в различных возрастных группах животных костромской породы

Тип ферментов	Коровы III отела и старше		Коровы I—II отелов		Нетели	
	голов	%	голов	%	голов	%
В	39	38,6	33	34,4	30	28,5
С	13	12,9	9	9,4	25	23,8
ВС	49	48,5	54	56,2	50	47,7
Всего	101	—	96	—	105	—
А	77	75,4	53	56,3	49	48,5
В	1	1,1	3	3,3	10	19,9
АВ	24	23,5	38	40,4	42	31,5
Всего	102	—	94	—	101	—

Для более объективного суждения о ценности тех или иных типов ферментов в селекции необходимо определение их в связи с их активностью. Такое исследование было проведено нами у нетелей изучаемой породы. Нетели для подобных исследований являются более удобным объектом, чем коровы, поскольку у них отсутствует влияние лактации. Результаты исследований активности сывороточной амилазы в связи с разными типами амилазы представлены в табл. 2

Таблица 2

Активность сывороточной амилазы у нетелей ($M \pm m$)

Показатель	Тип амилазы		
	В	С	ВС
Число животных	14	12	19
Содержание фермента, усл. ед.	$114,0 \pm 12,8$	$189,0 \pm 22,2$	$139,0 \pm 12,6$

У животных с типом фермента С (табл. 2) отмечается наиболее высокая активность амилазы сыворотки крови, самая низкая зарегистрирована у животных с типом В, и типично промежуточная величина активности фермента наблюдается у животных с типом ВС. Разница в величине активности между животными типов С и В составляет 75 ед., между С и ВС — 50 ед. и достоверна ($t = 2,98$ и $t_1 = 2,02$, $P > 0,05$), разница между типами ВС и В равна 25 ед. и недостоверна.

Наблюдаемые факты, очевидно, можно истолковать как влияние гена на тип синтезируемого фермента и его активность. Одновременно и по второму изучаемому ферменту — церулоплазмину — визуально наблюдаются различия в интенсивности образования темно-коричневого основания (хинона) в зависимости от скорости движения компонентов. Определяемая активность по интенсивности окрашивания была выше у более быстрого типа А и наименьшая у типа В.