

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ГЕНОВ СОМАТОТРОПИНОВОГО КАСКАДА, АССОЦИИРОВАННЫХ С МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ У КОРОВ КАЗАХСКОЙ БЕЛОГОЛОВОЙ ПОРОДЫ

Бейшова Индира Салтановна, канд. с.-х. наук, доцент кафедры биологии и химии, зав. отделом молекулярно-генетических исследований испытательной лаборатории производства продуктов питания, Костанайский государственный университет имени А. Байтурсынова.

110000, Республика Казахстан, г. Костанай, ул. Маяковского, 99/1.

E-mail: indira_bei@mail.ru

Ключевые слова: гены, каскад, полиморфизм, продуктивность, порода, соматотропный, мясная.

Цель исследований – поиск ассоциаций генов соматотропного каскада с признаками мясной продуктивности крупного рогатого скота казахской белоголовой породы и выявление генотипов, наиболее перспективных для разработки генетических маркеров хозяйственно-полезных признаков. В качестве материала исследования использовали кровь казахского белоголового скота. Образцы крови, а также данные зоотехнического учета были предоставлены ТОО «Жанабек» и ТОО «Караман-К», Костанайская область. Определение генотипов животных по генам гипофизарного фактора транскрипции-1 (bPit-1), гормона роста (bGH), рецептора гормона роста (bGHR) и инсулиноподобного фактора роста-1 (bIGF-1) проводили методом ПЦР-ПДРФ с использованием эндонуклеаз рестрикции HinFI, AluI, SspI и SnaBI, соответственно. Статистический анализ результатов генотипирования и зоотехнических данных проводили с использованием программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 6.0. Оценку мясной продуктивности крупного рогатого скота проводили по живой массе и индексам, характеризующим телосложение. Наибольшее значение индекса растянутости наблюдалось у животных с генотипами bPit-1-HinFI^{AB} и bPit-1-HinFI^{AA}. Так, показатель индекса растянутости у коров с генотипом bPit-1-HinFI^{AB} составляет 129,464 (125,000; 132,787), с генотипом bPit-1-HinFI^{AA} – 127,966 (125,000; 132,787), в то время, как данный показатель у коров с генотипом bPit-1-HinFI^{BB} составляет 124,167 (111,864; 131,026). Полиморфизм bIGF-1-SnaBI ассоциирован с показателем живой массы казахского белоголового скота. Так, животные с генотипом bIGF-1-SnaBI^{BB} во всех возрастах характеризуются пониженным живым весом по сравнению к животными с генотипами bIGF-1-SnaBI^{AB} и bIGF-1-SnaBI^{AA}. Однако результаты оценки выявленных предпочтительных и нежелательных генотипов касательно общей выборки показали на отсутствие статистически значимых ассоциаций с мясной продуктивностью.

Большой интерес для повышения мясной продуктивности крупного рогатого скота представляют гены соматотропного каскада, белковые продукты которых являются ключевыми звеньями одной гуморальной цепи, участвующей как в процессе лактации, так и в процессах роста и развития млекопитающих (bPit-1, bGH, bGHR, bIGF-1) [1, 2]. Следовательно, изучение полиморфизмов этих генов является перспективным с точки зрения поиска маркеров, ассоциированных с признаками и молочной, и мясной продуктивности у крупного рогатого скота [3, 4].

Характеристика соматотропного каскада. Известно, что гормон роста и целый ряд других белков (прямо или косвенно необходимых для его функционирования) обеспечивают разнообразные молекулярные и клеточные эффекты, приводящие, в конечном счёте, к развитию и росту организма.

Функционирование системы гормона роста представляется в виде целого ряда последовательных молекулярных процессов, в которых принимают участие десятки других белков/пептидов. Компоненты этой системы участвуют в запуске секреции гормона роста, его транспорте в кровотоке, в передаче гормонального сигнала в клетке-мишени (внутриклеточный сигналинг) и, наконец, в целенаправленных изменениях генной экспрессии в клетках-мишенях. Синтез гормона роста обеспечивает ген bGH. Регуляция синтеза гормона роста представляет собой многоуровневый каскад взаимодействий белок-рецептор, тесно связанных между собой. Нарушение

и, тем более, выпадение любого звена влечет за собой изменения в работе соматотропиновой оси, которые могут привести как к различиям в фенотипических проявлениях количественных признаков продуктивности у сельскохозяйственных животных, так и к заболеваниям, развивающимся на разных этапах онтогенеза.

Гипофизарный фактор транскрипции (PIT-1) участвует в регуляции экспрессии генов пролактина (PRL), соматотропина (GH) и тиреотропного гормона, а также регулирует дифференциацию и пролиферацию клеток гипофиза в раннем эмбриогенезе и определяет развитие зон, ответственных за синтез соматотропина [5, 6, 7].

Исследования ассоциации полиморфных вариантов гена Pit-1 с признаками мясной продуктивности ведутся на различных породах.

Наиболее исследованным из них является Pit1-Hinf I полиморфизм, впервые описанный J. Woollard (1994) и в последствии идентифицированный как молчащая G→A замена в области шестого экзона. Несмотря на то, что данная мутация не приводит к аминокислотной замене белка и теоретически не должна влиять на его физиологические свойства, рядом авторов выявлены различные виды ассоциации этого полиморфизма, как с признаками мясной, так и молочной продуктивности у представителей разных пород [8].

Ген бычьего гормона роста (bGH или bST) картирован на 19-й хромосоме и является участником мультигенного семейства, которое включает так же пролактин, и плацентарные лактогены. Его протяженность составляет примерно 1800 пар оснований и включает пять экзонов (I-V), которые кодируют матричную РНК размером 786 пар оснований, и четыре интрона (A-D). По большей части его последовательность сходна с таковой у мышей и человека [9].

Учитывая значительную роль в процессе роста и лактации, GH ген является потенциальным объектом для изучения ассоциации его молекулярных вариантов признаками продуктивности крупного рогатого скота. У представителей различных пород крупного рогатого скота было описано несколько полиморфных вариантов гена соматотропина. Большая часть выявленных полиморфных сайтов расположена в нетранслируемых интронах, некоторые в регуляторной последовательности и лишь один из них расположен в транслируемой области пятого экзона, в положении 2141 и представляет собой трансверсию C→G.

Именно она и привлекает наибольшее внимание в исследованиях, связанных с поиском ассоциаций полиморфных вариантов гена гормона роста с признаками мясной и молочной продуктивности у крупного рогатого скота.

Рецептор гормона роста (GH R) кодируется одиночным геном, который локализован на хромосоме 20 у КРС. Он содержит одиночный трансмембранный домен, содержащий 24 аминокислоты, экстрацеллюлярный (гормон-связывающий) домен и длинный цитоплазматический домен (сигнал-индуцирующий). Состоит из 9 экзонов в транслируемой части (со 2 по 10) и 9 экзонов в 5'-некодирующем регионе, который включает 9 нетранслируемых экзонов [10]. 5'-регуляторная область данного гена содержит составные промоторные элементы, энхансеры, репрессоры, детерминанты тканеспецифичной экспрессии гена и другие регуляторные элементы. Экзоны нетранслируемой области подвергаются альтернативному сплайсингу и каждый из них имеет личный сайт начала транскрипции.

Цель исследований – поиск ассоциаций генов соматотропного каскада с признаками мясной продуктивности крупного рогатого скота казахской белоголовой породы и выявление генотипов, наиболее перспективных для разработки генетических маркеров хозяйственно-полезных признаков.

Задачи исследований:

- установить генотипы полиморфных генов соматотропного каскада;
- исследовать влияние генов соматотропного каскада на показатели мясной продуктивности крупного рогатого скота казахской белоголовой породы;
- провести анализ ассоциаций предпочтительных (нежелательных) генотипов с мясной продуктивностью скота касательно общей выборки.

Материалы и методы исследований. Объект исследования – выборки коров казахской белоголовой породы. Предмет исследования – полиморфные гены соматотропинового каскада (bPit-1, bGH, bGHR).

Материал исследования – образцы ДНК, выделенной из крови коров казахской белоголовой породы. Геномную ДНК выделяли из крови КРС, используя набор «Pure Link Genomic DNA Kits», согласно инструкции изготовителя.

Для определения концентрации полученной ДНК в растворе использовали спектрофотометрический метод. При этом пользовались прибором Dynamica HaloDNAMaster.

Для всех исследуемых локусов при изучении полиморфизма ДНК был применен метод полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом продуктов амплификации (ПЦР-ПДРФ). Последовательности праймеров и условия ПЦР для анализа каждого полиморфизма приведены в таблице 1.

Таблица 1

Условия ПЦР и последовательности праймеров

Ген/рестриктаза	Условия амплификации	Последовательности праймеров
bPit-1-Hinfl	94 °C – 1 мин; 95 °C – 45 сек 56 °C – 60 сек 72 °C – 60 сек 72 °C – 1 мин x 35 циклов	Hinfl-F: 5'-aaccatcatctcccttctt-3' Hinfl-R: 5'-atgtacaatgtctctgag-3'
bGH-AluI	95 °C – 5 мин; 95 °C – 30 сек 64 °C – 30 сек 72 °C – 60 сек 72 °C – 1 мин x 35 циклов	AluI-F: 5'-ccgtgtctatgagaagc-3' AluI-R: 5'-gttcttgagcagcgcgt-3'
bGHR-SspI	95 °C – 5 мин; 95 °C – 30 сек 60 °C – 30 сек 72 °C – 30 сек 72 °C – 1 мин x 35 циклов	SspI-F: 5'-atatgtagcagtgacaatat-3' SspI-R: 5'-acgttctcactgggttgatga-3'

Полимеразную цепную реакцию генов проводили в амплификаторе ProFlex PCR System, «Applied Biosystems». Результаты амплификации оценивались с помощью метода гель-электрофореза. Электрофорез проводили при силе тока 400 мА в агарозном геле в буфере TAE (40 миллимоль (мМ) трисгидроксиметиламинометан, 20 мМ ледяная уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА), с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Для оценки молекулярного веса фрагментов использовали маркеры молекулярного веса ДНК. Результаты электрофореза визуализировали на трансиллюминаторе системы QUANTUM модель 1100 SUPER.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена bPit-1 в экзоне 6 проводился с помощью рестриктазы Hinfl. Полиморфизм обусловлен А→Г нуклеотидной заменой, не приводящей к изменению аминокислотной последовательности. Сайтом узнавания для рестриктазы Hinfl является последовательность G↓ANTC. Разрезаемый в ходе ферментации фрагмент содержит нуклеотид А, соответствующий аллелю bPit-1-Hinfl В. В случае присутствия Г нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как bPit-1-Hinfl А.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена bGH в экзоне 5 проводился с помощью рестриктазы AluI. Полиморфизм обусловлен транзицией С→G. Сайтом узнавания для рестриктазы AluI является последовательность AG↓CT. Распознаваемый ферментом аллель содержит нуклеотид С и обозначен как bGH-AluI L. В случае присутствия G-нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как bGH-AluI V.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена bGHR в экзоне 8 проводился с помощью рестриктазы SspI. Рестриктаза SspI распознает Т→А транзицию в экзоне 8. Сайтом узнавания для рестриктазы является последовательность AAT↓ATT. Разрезаемый ферментом

амплификат содержит нуклеотид Т, соответствующий аллелю bGHR-SspI F. В случае присутствия А-нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как bGHR-SspI Y.

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием стандартного пакета программ Statistica 6.0. Сравнение выборок по распределению частот аллелей исследуемых генов, а также оценку соответствия фактического распределения генотипов теоретически ожидаемому по закону Харди-Вайнберга проводили с помощью критерия χ^2 . Различия во всех случаях рассматривались как статистически достоверные при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты исследований. Установлено, что у коров казахской белоголовой породы полиморфизм *bPit-1-HinFI* ассоциирован с индексом растянутости в возрасте 24 месяца (наибольшее значение признака – генотип *bPit-1-HinFI^{BB}*, а полиморфизм *bIGF-1-SnaBI* ассоциирован с признаком живая масса в возрасте 12, 18, 24 месяца (наибольшее значение генотип *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}*, наименьшее – генотип *bIGF-1-SnaBI^{AA}*).

Наибольшее значение растянутости характерно для группы коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}* и *bPit-1-HinFI^{AB}*. Для них интервал медианы колеблется в пределах 125-132%. В то время как для группы коров с генотипом *bPit-1-HinFI^{BB}* этот показатель колеблется в пределах 11-141%. Результаты интервального анализа относительно общей выборки представлены на рисунке 1.

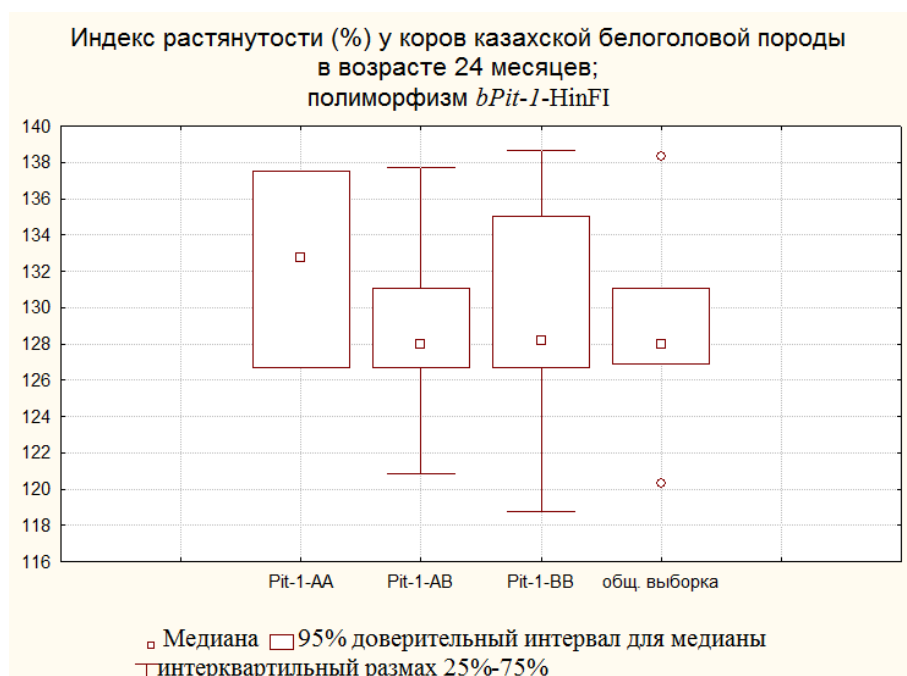


Рис. 1. Индекс растянутости (%) у коров казахской белоголовой породы в возрасте 24 месяцев; полиморфизм *bPit-1-HinFI*

Из графика, представленного на рисунке 1, очевидно, что несмотря на достоверное различие групп с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* между собой, по отношению к общей выборке все фенотипические эффекты находятся в пределах популяционной нормы признака.

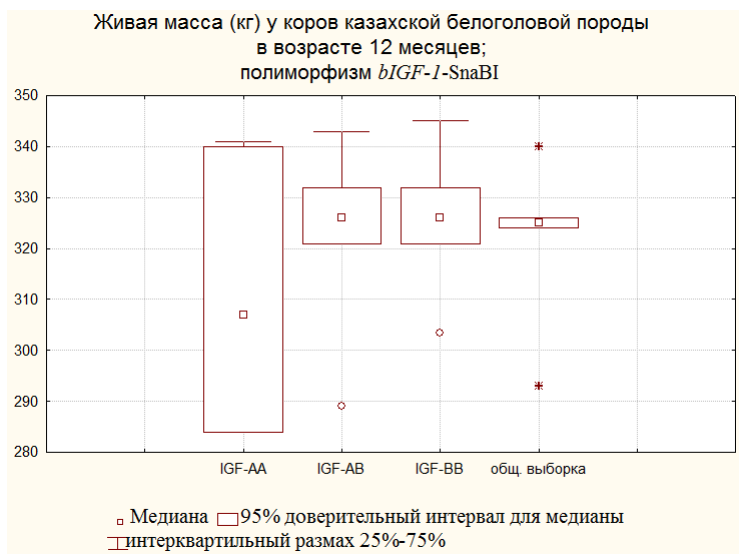
Таким образом, полиморфизм *bPit-1-HinFI*, ассоциированный с растянутостью в возрасте 24 месяца, не перспективно рассматривать в качестве генетического маркера.

Оценка влияния гена инсулиноподобного фактора-1 на мясную продуктивность казахского белоголового скота показала, что коровы с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{BB}* на всех возрастах характеризуются пониженным живым весом по отношению к животным с генотипами *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{AA}*.

Так, в возрасте 12 месяцев этот показатель колеблется в пределах 284-341 кг для коров с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{BB}* по сравнению с 321-332 кг у коров с генотипами *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{AA}*.

В возрасте 18 и 24 месяца это соотношение составляет 321-387 к 365-376 кг и 363-465 к 383-425 кг соответственно.

Для этих групп пород так же было проведено интервальное оценивание относительно общей выборки, результаты которого представлены на рисунке 2.



а



б

Рис. 2. Живая масса (кг) коров казахской белоголовой породы (полиморфизм *bIGF-1-SnaBI*): а – в возрасте 12 месяцев; б – в возрасте 18 месяцев



Рис. 2в. Живая масса (кг) коров казахской белоголовой породы (полиморфизм *bIGF-1-SnaBI*) в возрасте 24 месяца

По приведенным на рисунке 2 диаграммам очевидно, что группы с генотипами *bIGF-1-SnaBI^{AA}*, *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}* действительно значительно различаются между собой. Однако группа с генотипом деконсалидирована и ее размах признака находится за пределами и верхнего, и нижнего доверительного интервала медианы общей выборки. Причем данная тенденция прослеживается во всех возрастных категориях.

Заключение. Для коров казахской белоголовой породы генетических маркеров мясной продуктивности среди полиморфных генов соматотропинового каскада не выявлено.

Библиографический список

1. Михайлова М. Е. Влияние полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада *bGH*, *bGHR* и *bIGF-1* на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы / М. Е. Михайлова, Е. В. Белая // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2011. – Т. 55, №2. – С. 63–69.
2. Тюлькин, С. В. Полиморфизм гена гипофизарного фактора транскрипции у быков-производителей Республики Татарстан / С. В. Тюлькин, И. И. Хатыпов, А. В. Муратова [и др.] // Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана. – 2015. – №222 (2). – С. 218-220.
3. Hammami, H. Environmental sensitivity for milk yield in Luxembourg and Tunisian Holsteins by herd management level / H. Hammami, B. Rekik, C. Bastin [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2009. – Vol. 92. – №9. – P. 4604-4612.
4. Szewczuk, M. Association of insulin-like growth factor I gene polymorphisms (*IGF1/TasI* and *IGF1/SnaBI*) with the growth and subsequent milk yield of Polish Holstein-Friesian heifers / M. Szewczuk, M. Bajurna, S. Zych, W. Kruszyński // Czech Journal of Animal Science. – 2013. – Vol. 58. – P. 401-411.
5. Carrijo Sônia Mara Association of *PIT1* genotypes with growth traits in Canchim cattle / Carrijo Sônia Mara [et al.] // Scientia Agricola. – 2008. – Vol. 65. – №2. – P. 116-121.
6. Misrianti, R. Polymorphism Identification of *Pit1* Gene in Indonesian Buffaloes (*Bubalus bubalis*) and Holstein-Friesian Cows / R. Misrianti, C. Sumantri, A. Farajallah // Media Peternakan. – 2010. – Vol. 33. – P. 131-136.
7. Edriss, M. A. Association of *PIT-1* gene polymorphism with birth weight, milk and reproduction traits in Isfahan Holstein cows / M. A. Edriss, V. Edriss, H. R. Rahmani // Archiv Tierzucht. – 2009. – Vol.52. – P. 445-447
8. Woollard, J. Rapid communication: *HinfI* polymorphism at the bovine *Pit1* locus / J. Woollard, C. B. Schmitz, A. E. Freeman, C. K. Tuggle // Journal of Animal Science. – 1994. – №72. – 3267 p.
9. Gordon, D. F. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene / D. F. Gordon, D. P. Quick, C. P. Ewin [et al.] // Molecular and Cellular Endocrinology. – 1983. – Vol. 33. – P. 81-95.
10. Parsons, Y. M. Assignment of the growth hormone receptor gene to band q17 of the homeologous sheep 16 and cattle 20 chromosomes / Y. M. Parsons, G. C. Webb, C. D. Bottema // Mammalian Genome. – 1998. – №9. – P. 599-600.