

УДК 636.2.02.082.084

Наметов А.М.¹, доктор ветеринарных наук, профессор

Кякебаев Н.А.², доктор сельскохозяйственных наук

Бейшова И.С.³, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

Поддудинская Т.В.³, магистр сельскохозяйственных наук

¹ НАО «Западно – Казахстанский аграрно – технический университет имени Жангир хана»,

г. Уральск, Республика Казахстан

² ТОО «Костанайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства», г. Костанай, Республика Казахстан

³ РГП на ПХВ «Костанайский государственный университет имени А.Байтурсынова», г. Костанай, Республика Казахстан

⁴ УО «Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка», г. Минск, Республика Беларусь

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПЦР-ПДРФ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ГОРМОНА РОСТА И РЕЦЕПТОРА ГОРМОНА РОСТА

Аннотация

Метод полимеразной цепной реакции с анализом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) позволяет устанавливать генотипы полиморфных генов-кандидатов хозяйственно-полезных признаков сельскохозяйственных животных, в том числе и у крупного рогатого скота. Используя метод ПЦР-ПДРФ, возможно на ранних этапах развития определять продуктивность крупного рогатого скота (КРС), и основываясь на этой информации, осуществлять селекционные мероприятия в животноводческих хозяйствах. Как следствие, применение молекулярной диагностики продуктивности КРС приведет к снижению затрат на содержание и кормление животных, что повысит рентабельность производства.

Целью настоящей работы являлась оптимизация ПЦР-ПДРФ анализа для детекции однонуклеотидных замен (SNP) и идентификации аллельных вариантов генов гормона роста (*bGH*) и рецептора гормона роста (*bGHR*). Проведение ПДРФ-анализа позволило идентифицировать генотипы и аллели генов *bGH* и *bGHR*; это говорит о том, что оптимизированная нами методика эффективна и ее можно применять для установления генотипов по полиморфизмам *bGH*-AluI и *bGHR*-SspI.

Ключевые слова: *ген гормон роста (bGH), ген инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), полиморфизм, аллель, генотип.*

Введение. В то время, как традиционная селекция для получения животных с желательными признаками пользуется данными фенотипа, маркер-сопутствующая селекция использует информацию о маркерных точках генотипа, связанных с участками генома, отвечающими за развитие количественных признаков, с данными об их реализации в фенотипе. Поиск генетических маркеров широко ведется среди однонуклеотидных полиморфизмов – точечных мутаций, обусловленных выпадением, добавкой или заменой одного нуклеотида. Маркерные SNP, расположенные в пределах гена-кандидата, могут оказывать различный фенотипический эффект в зависимости от локализации и характера мутации.

Мутации, приводящие к возникновению аллелей генов, участвующих в формировании количественных признаков, используются для поиска прямых ассоциаций с признаками продуктивности сельскохозяйственных животных.

Известно, что гормон роста наряду с другими участниками соматотропинового каскада запускает во всех клетках организма серии метаболических процессов отвечающих за рост и развитие [1-6]. Работа соматотропинового каскада представляет собой систему сложных взаимодействий «белок-рецептор», участвующих в регуляции ростовых процессов организма.

С учетом вышеизложенного, в качестве потенциального маркера мясной продуктивности КРС мы выбрали *AluI*-полиморфизм гена гормона роста так как данная мутация, во-первых, обуславливает аминокислотную замену в структуре белка и доступна для массового скрининга, во-вторых, интерес представляет его фенотипический эффект в комплексе другими ключевыми генами соматотропинового каскада.

Среди известных полиморфизмов гена инсулиноподобного фактора роста для нашего исследования наибольший интерес представляет полиморфизм *bIGF-1-SnaBI*, который локализован в области промотора Р 1 и, вероятнее всего оказывает влияние на особенности экспрессии белка инсулиноподобного фактора роста 1 на всех стадиях развития.

Однако, при использовании для генотипирования по генам *bGH* и *bGHR* методик, описанных в литературе, мы получали, кроме специфического ПЦР-продукта, ещё и неспецифические для реакции ПЦР – фрагменты, которые затрудняли дальнейшую детекцию.

На основании вышеизложенного, целью работы являлась оптимизация ПЦР-ПДРФ анализа для детекции однонуклеотидных замен (SNP) и идентификации аллельных вариантов генов гормона роста (*bGH*) и рецептора гормона роста (*bGHR*).

Материал и методы исследований. Исследования проводились в отделе молекулярно-генетических исследований научно-инновационного центра РГП на ПХВ «Костанайский государственный университет имени А.Байтурсынова».

В качестве объекта исследования была выбрана группа животных герефордской породы казахстанской селекции (100 голов). Биологический материал (цельная кровь крупного рогатого скота) был отобран сотрудниками хозяйства и сотрудниками отдела молекулярно-генетических исследований научно-инновационного центра РГП на ПХВ «Костанайский государственный университет имени А.Байтурсынова».

Выделение ДНК из цельной крови КРС проводилось колоночным методом (набор PureLink Genomic DNA Mini Kit). Концентрацию и чистоту ДНК измеряли на спектрофотометре Dynamica Halo DNAmaster. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе ProFlex PCR System («Applied Biosystems») в объёме 20 мкл, содержащем 11,8 мкл воды, 2 мкл 10X буфера, 0,4 мкл смеси dNTP (10 mM), 2 мкл $MgCl_2$ (25 mM), по 1 мкл прямого и обратного праймера, 0,3 мкл Taq полимеразы (5U/μl) и 1,5 мкл ДНК. Условия амплификации и последовательность праймеров указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательность праймеров и условия амплификации полиморфных участков генов гормона роста и рецептора гормона роста

Ген	Последовательность праймеров	Условия амплификации	Ссылка
<i>bGH</i>	F: 5'-ccgtgtctatgagaagc-3'; R: 5'-gttcttgagcagcgcggt-3'	95° С – 10 мин; (94° С – 30 сек; 64° С – 60 сек; 72° С – 30 сек) x 40 циклов; 72° С – 10 мин	[7]
<i>bGHR</i>	F: 5'-aatacttgggctagcagtgacaatat-3'; R: 5'-acgtttcactgggtgatga-3'	95° С – 3 мин; (95° С – 30 сек; 61° С – 30 сек; 72° С – 30 сек) x 30 циклов; 72° С – 10 мин; 12° С – 5 мин	[8]

Для определения аллельного полиморфизма генов *bGH* и *bGHR* образующийся ПЦР-продукт обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *AluI* и *SnaBI* (Thermo Scientific) соответственно и инкубировали при 37°С в течение ночи.

Детекцию результатов ПЦР-ПДРФ проводили в 3 %-ном агарозном геле с последующей визуализацией с помощью системы гель-документирования Quantum 1100 (Vilber Lourmat).

Результаты и их обсуждение. Первым этапом оптимизации ПЦР-ПДРФ для полиморфизма *bGH-AluI* был подбор оптимальных условий отжига праймеров. Целью данного этапа является наработка чистого ПЦР-продукта в количестве, достаточном для дальнейшей рестрикции и детекции генотипов методом горизонтального гель-электрофореза. Для этого сначала ставили ПЦР с градиентом температур отжига. В нашем случае, с учетом длины и

состава праймеров, градиент температур находился в интервале 57-66° С и включал температуры 57, 59, 61, 63, 65 и 67° С.

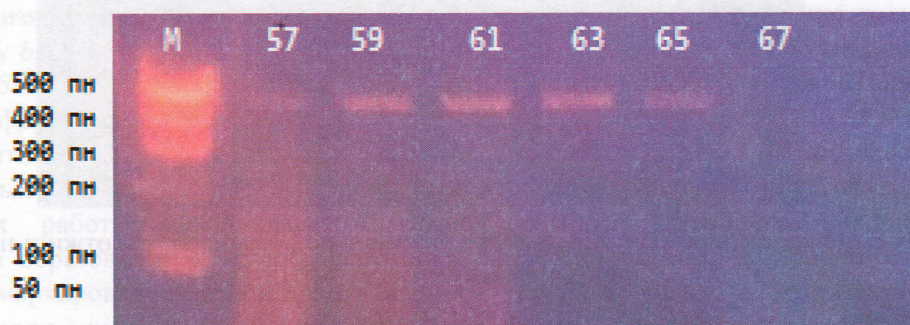
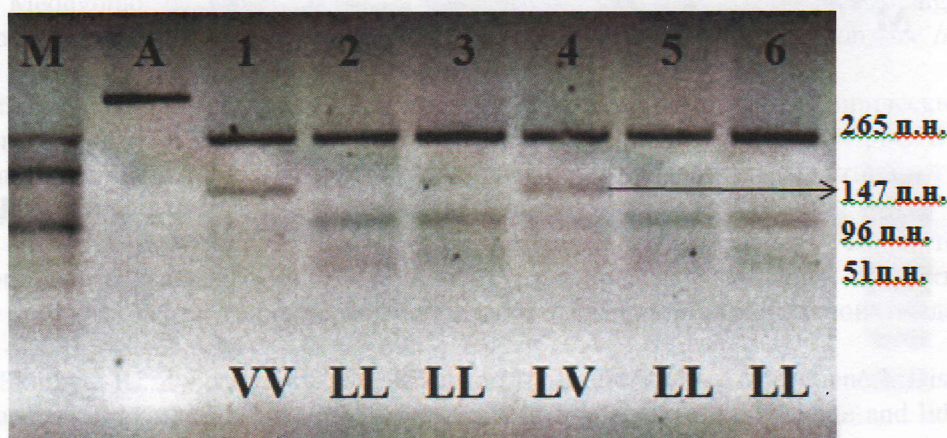


Рисунок 1 - Градиентная ПЦР для подбора оптимальной температуры отжига праймеров по полиморфному участку *bGH*-AluI

В результате при температуре отжига 61°С был получен чистый амплификат, на нужной длине фрагмента, однако в небольшом количестве. Эта проблема была решена увеличением количества циклов с 30 до 40, а затем до 45 циклов.

Повышенный выход целевого продукта позволяет проводить рестрикцию в небольшом объеме реакционной смеси и визуализировать генотипы с помощью горизонтального электрофореза в 2 %-м агарозном геле (рисунок 2).



1-6 – номера лунок; А – амплификат полиморфного участка гена *bGH*; М – маркер молекулярных масс O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); LL, LV и VV – соответствующие генотипы

Рисунок 2 — Электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции фрагмента гена *bGH*

Как видно на рисунке, при данных условиях электрофореза достаточно четко визуализируются полосы, позволяющие идентифицировать генотип.

Оптимизация ПЦР методики ПЦР-ПДРФ для полиморфизма *bGHR*-SspI проводилась с целью увеличения выхода целевого продукта и уменьшения количества неспецифических фрагментов. Для этого нами была поставлена ПЦР с градиентом температур отжига праймеров в интервале 59-69°С.

Так как целевой фрагмент достаточно небольшой, то интервал температур для градиентной ПЦР был смещен в сторону увеличения температур для предотвращения посадки праймеров на неспецифичные участки и синтеза неспецифических фрагментов.

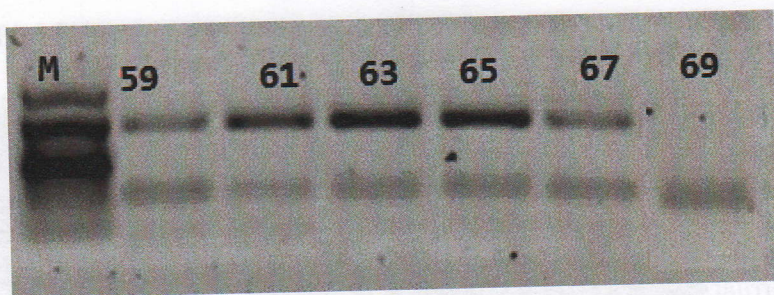
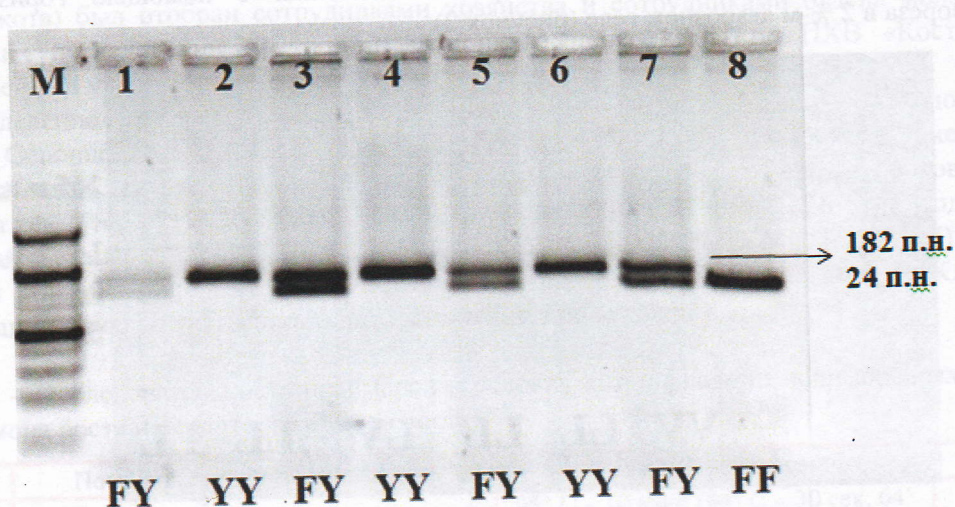


Рисунок 3 - Градиентная ПЦР для подбора оптимальной температуры отжига праймеров по полиморфному участку *bGHR*-*SspI*

Как видно на рисунке 3, оптимальной температурой отжига праймеров является 63°C . В дальнейшем для рестрикции брали 10 мкл амплификата, Рестрикцию проводили по протоколу фирмы-производителя.

Так как визуализируемые фрагменты ДНК, образующиеся после рестрикции (182 и 158 п.н.) имеют небольшую разницу в длине, то гель для разгонки брали 3%.

Достаточно высокая концентрация ДНК в образце и 3%-я плотность агарозного геля позволяет установить все три генотипа, несмотря на то, что один из фрагментов рестрикции 24 п.н. не виден (рисунок 4)



1-8 – номера лунок; М – маркер молекулярных масс O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); FF, FY и YY – соответствующие генотипы

Рисунок 4 - Электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции фрагмента гена *bGHR*

Как видно на рисунке, при данных условиях электрофореза достаточно четко визуализируются полосы, позволяющие идентифицировать генотип, несмотря на то, что фрагмент длиной 24 п.н. не визуализируется. На дорожках, соответствующих генотипу FF визуализируется полоса длиной 158 п.н., на дорожках, соответствующих генотипу FY видны 2 фрагмента рестрикции 182 и 158 п.н., 1 полоса 182 п.н., идущая на уровне амплификата соответствует генотипу YY.

Заключение. Таким образом, в результате работ по оптимизации ПЦР-ПДРФ генотипирования крупного рогатого скота по полиморфизму *bGH*-*AluI* отработаны условия ПЦР, позволяющие получить амплификат нужной концентрации и чистоты. В частности, снижена температура отжига праймеров с 64°C до 61°C по сравнению с первоисточником (что позволило получить фрагмент нужной длины без неспецифических полос), а также увеличена длительность отжига (с 30 до 60 секунд) и увеличено число циклов (с 30 до 45) по сравнению

со стандартным протоколом, что позволило наработать чистый амплификат в необходимом количестве.

Оптимизированы условия для постановки ПЦР для ДНК-типирования животных по полиморфизму *bGHR*-*SspI*. В частности, подобрана оптимальная температура отжига (63°C по сравнению с 61°C по протоколу первоисточника), повышающая выход целевого продукта по отношению к фрагментам неспецифической длины.

Для оптимизации этапа электрофоретического этапа детекции *SspI*-полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена *bGHR* была увеличена плотность агарозного геля с 2% до 3%.

Данная работа выполнялась в рамках проекта грантового финансирования Министерства образования и науки Республики Казахстан на 2018-2020 гг «Комплексное генетическое маркирование мясной продуктивности у крупного рогатого скота герефордской и ангусской пород казахстанской селекции по генам, регулирующим темпы роста» (№ государственной регистрации 0118PK00396).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lemay D. G., Lynn D.J., Martin W.F. The bovine lactation genome: insights into the evolution of mammalian milk // *Genome Biology* - 2009. - V.10(4).
2. Luikart G., England P.R., Tallmon D. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing // *Nat. Rev.Genet.* - 2003. - V.4. - P. 981-994.
3. Manel S., Schwartz M.K., Luikart G. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics // *Trends Ecol. Evol.* - 2003. - V. 18. - P. 189-197.
4. Medugorac I., Russ I. Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size // *Molecular Ecology*. - 2009. - V. 18. - P. 3394-3410.
5. Беляя Е.В., Михайлова М.Е., Батин Н.В. Комбинированные фенотипические эффекты полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада (*bPit-1*, *bPRL*, *bGH*, *bGHR* и *bIGF-1*) на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы // *Молекулярная и прикладная генетика: сб.науч.тр.* - 2012. - Т. 13. - С. 36-43.
6. Михайлова М.Е., Беляя Е.В. Влияние полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада *bGH*, *bGHR* и *bIGF-1* на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы // *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. - 2011. - Т. 55. - № 2. - С. 63-69.
7. Skinkytė R., Zwierchowski L., Riaubaitė L., Baltrėnaitė L., Miceikienė I. Distribution of allele frequencies important to milk production traits in lithuanian black & white and lithuanian red cattle // *Veterinarija ir zootechnika*. - 2005. - Т. 31(53). - P. 93-97.
8. Viitala S., Szyda J., Bloot S., Schulman N., Lidauer M., Mäki-Tanila A., Georges M., Vilkkilä J.H. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire cattle // *Genetics*. - 2006. - № 173. - P. 2151-2164.

ТҮЙІН

Полимеразды тізбекті реакция әдісімен рестрикционды фрагменттердің ұзындығын талдау (ПТР-РФҰП) ауылшаруашылық жануарларының, оның ішінде ірі қара малдардың экономикалық жағынан пайдалы қасиеттері бойынша полиморфтық кандидат-гендердің генотиптерін орнатуға мүмкіндік береді. ПТР-РФҰП әдісін қолдану арқылы бастапқы даму кезеңінде ірі қара малдың өнімділігін анықтауға болады және осы ақпарат негізінде ауылшаруашылығында селекциялық іс-шаралар жүзеге асырылады. Нәтижесінде мал шаруашылығы өнімділігінде молекулалық диагностикалауды қолдану жануарларды өсіру мен азықтандыруға жұмсалатын шығынды төмендетуге мүмкіндік береді, бұл өндірістің табыстылығын арттырады.

Осы жұмыстың мақсаты бір нуклеотидті алмастыруларды (SNP) және өсу гормоны рецепторы (*bGHR*) мен өсу гормоны гендерінің (*bGH*) аллельдік нұсқаларын анықтау үшін ПТР-РФҰП талдауын оңтайландыру болып табылады. РФҰП талдауы *bGH* және *bGHR* гендерінің генотиптері мен аллельдерін анықтауға мүмкіндік береді; бұл өз кезегінде

онтайландырылған техниканың тиімді екенін және bGH-AluI және bGHR-SspI полиморфизмдері бойынша генотиптерді анықтау үшін пайдалануға мүмкіндік беретінін көрсетеді.

RESUME

The method of polymerase chain reaction with the analysis of the lengths of restriction fragments (PCR-RFLP) allows to set the genotypes of polymorphic candidate genes for economically useful traits of farm animals, including cattle. Using the PCR-RFLP method, it is possible to determine the productivity of cattle at the early stages of development, and based on this information, to carry out selection activities in livestock. As a result, the use of molecular diagnostics of cattle productivity will lead to lower costs for keeping and feeding animals, which will increase the profitability of production.

The purpose of this work was to optimize PCR-RFLP analysis for the detection of single nucleotide polymorphism (SNP) and the identification of allelic variants of growth hormone (bGH) genes and growth hormone receptor (bGHR). RFLP analysis allowed to identify the genotypes and alleles of the bGH and bGHR genes; this suggests that the optimized technique is efficient and can be used to establish genotypes for the bGH-AluI and bGHR-SspI polymorphisms.

УДК 636.22/28.084

Ускова И.В., соискатель

Баймишев Х.Б., доктор биологических наук, профессор

Головкина С.А., студентка

ФГБОУ ВО «Самарский государственный аграрный университет», г. Самара, Российская Федерация

ХАРАКТЕР ТЕЧЕНИЯ ЛАКТАЦИИ У ПЕРВОТЕЛОК ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ

Аннотация

В статье рассматриваются результаты изучения характера течения лактации первотелок голштинской породы в условиях интенсивной технологии производства молока в зависимости от уровня молочной продуктивности их матерей. Для проведения исследований были сформированы две группы первотелок-аналогов с молочной продуктивностью их матерей 7560 кг (первая группа) и 8950 кг (вторая группа) по 15 голов в каждой. При подборе первотелок в группы учитывали их физиологическое состояние и возраст коров-матерей в лактациях. В результате проведенных исследований установлено, что уровень молочной продуктивности коров-матерей оказывает достоверное влияние не только на величину удоя первотелок в лактациях, а также на качественные показатели молока. Удой за лактацию у первотелок первой группы составил 7799,3 кг, что на 841,0 кг больше чем у животных второй группы, матери которых имели уровень молочной продуктивности на 1390 кг больше чем матери первотелок первой группы. Первотелки первой группы по молочному жиру в абсолютной величине превосходили своих сверстниц на 36,93 кг, разница значимо достоверна ($P < 0,05$). У животных второй группы высокий уровень продуктивности отмечался в первые 4 месяца, а у животных первой группы – в первые 5 месяцев. Однако уровень продуктивности помесных суточных удоев достоверно больше у первотелок первой группы. Физико-химический состав молока у первотелок второй группы по таким показателям как кислотность, содержание казеина, лактозы, общего кальция меньше чем у первотелок первой группы, матери которых имели молочную продуктивность 7560 кг. Полученные нами данные указывают на необходимость разработки и коррекцию алгоритмов кормления, содержания высокопродуктивных коров с учетом уровня их молочной продуктивности, продолжительности лактации с целью получения молодняка способного реализовать генетический потенциал их матерей.