

Фенотипические эффекты полиморфизмов генов соматотропинового каскада, ассоциированных с признаками мясной продуктивности относительно общей выборки у коров казахской белоголовой породы

И.С. Бейшова, к.с.-х.н., Костанайский ГУ

Мясное скотоводство является важным источником получения мяса высокого качества [1, 2]. Большой интерес для повышения мясной продуктивности крупного рогатого скота представляют гены соматотропинового 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) [3]. Следовательно, изучение полиморфизмов этих генов является перспективным с точки зрения поиска маркеров, ассоциированных с признаками и молочной, и мясной продуктивности у крупного рогатого скота.

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 [4].

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 влечёт 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 [5–7].

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 [8] и впоследствии идентифицированный как молчащая G→A замена в области шестого экзона [9]. 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 с признаками как мясной, так и молочной продуктивности у представителей разных пород [10].

Ген бычьего гормона роста (bGH или bST) картирован на 19-й хромосоме и является участником мультигенного семейства, которое включает также пролактин, и плацентарные лактогены. Его протяжённость 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.

Учитывая значительную роль в процессе роста и лактации, GH ген является потенциальным объектом для изучения ассоциации его молекулярных вариантов с признаками продуктивности крупного рогатого скота. У представителей различных пород крупного рогатого скота было описано несколько полиморфных вариантов гена соматотропина, их перечень представлен в таблице. 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. 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.

Материал и методы исследования. Объектом исследования послужили 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 применён 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.

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 мМ трисгидроксиметиламинметан, 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 HinfI. Полиморфизм обусловлен

A→G нуклеотидной заменой, не приводящей к изменению аминокислотной последовательности. Сайтом узнавания для рестриктазы HinfI является последовательность G↓ANTC. Разрезаемый в ходе ферментации фрагмент содержит нуклеотид A, соответствующий аллелю bPit-1-HinfI В. В случае присутствия G нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как bPit-1-HinfI 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 распознаёт 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 $P < 0,05$ [11].

Результаты исследования. Было установлено, что у коров казахской белоголовой породы полиморфизм *bPit-1-HinfI* ассоциирован с индексом растянутости в возрасте 24 мес. (наибольшее значение признака – генотип *bPit-1-HinfI^{BB}*, а полиморфизм

1. Условия ПЦР и последовательности праймеров

Ген/рестриктаза	Условия амплификации	Последовательности праймеров
bPit-1-HinfI	94°C – 1 мин. 95°C – 45 сек. 56°C – 60 сек. ×35 циклов 72°C – 60 сек. 72°C – 1 мин.	HinfI-F: 5'-aaccatcatctcccttctt-3' HinfI-R: 5'-atgtacaatgtcttctgag-3'
bGH-AluI	95°C – 5 мин. 95°C – 30 сек. ×35 циклов 64°C – 30 сек. 72°C – 60 сек. 72°C – 1 мин.	AluI-F: 5'-ccgtgtctatgagaagc-3' AluI-R: 5''-gttcttgagcagcgcgt-3'
bGHR-SspI	95°C – 5 мин. 95°C – 30 сек. ×35 циклов 60°C – 30 сек. 72°C – 30 сек. 72°C – 1 мин.	SspI-F: 5'-atatgtagcagtgacaatat-3' SspI-R: 5'-acgtttcactggttgatga-3'

bIGF-1-SnaBI ассоциирован с признаком живая масса в возрасте 12, 18, 24 мес. (наибольшее значение генотип *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}*, наименьшее – генотип *bIGF-1-SnaBI^{AA}*).

Данные, характеризующие продуктивность групп с генотипами *bPit-1-HinFI^{AA}*, *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}* по индексу растянутости в возрасте 24 мес., приведены в таблице 2.

Из таблицы следует, что наибольшее значение растянутости характерно для группы коров с генотипами *bPit-1-HinFI^{AB}* и *bPit-1-HinFI^{BB}*. Для них интервал медианы колеблется в пределах 125–132%. В то время как для группы коров с генотипом *bPit-1-HinFI^{AA}* этот показатель колеблется в пределах 11–141%.

Результаты интервального анализа относительно общей выборки представлены на рисунке 1.

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 генотипические эффекты находятся в пределах популяционной нормы признака.

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

Данные, характеризующие продуктивность казахских белоголовых коров по признаку живой массы в возрасте 12, 18 и 24 мес., приведены в таблице 3.

Установлено, что коровы с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{AA}* во всех возрастах характеризуются пониженной живой массой по отношению к животным с генотипами *bIGF-1-SnaBI^{AB}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}*.

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

В возрасте 18 и 24 мес. это соотношение составляло 321–387 к 365–376 кг и 363–465 к 383–425 кг соответственно.

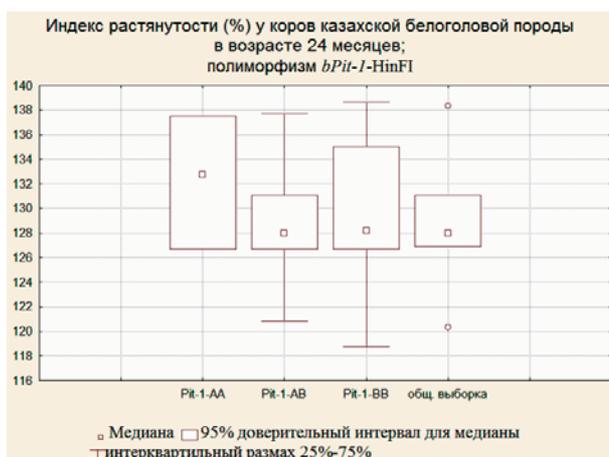


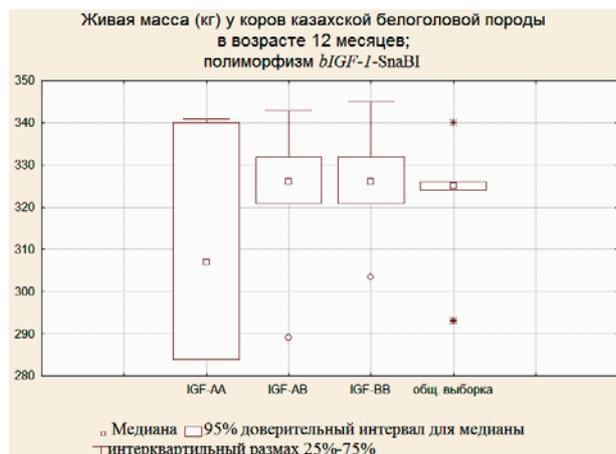
Рис. 1 – Индекс растянутости (%) у коров казахской белоголовой породы в возрасте 24 мес.; полиморфизм *bPit-1-HinFI*

2. Непараметрические характеристики индекса растянутости в группах коров казахской белоголовой породы с разными генотипами по полиморфизму *bPit-1-HinFI*

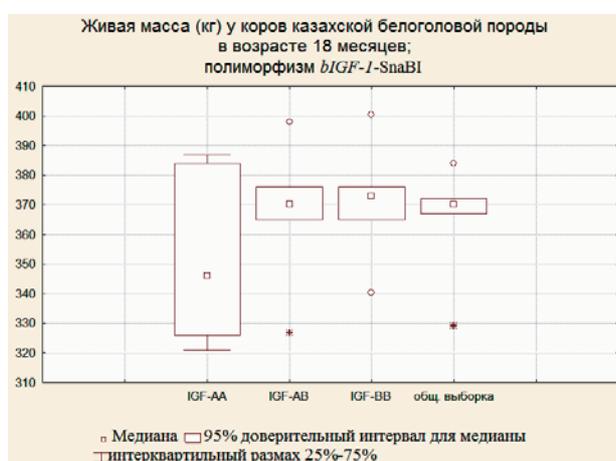
Признак/возраст	Генотип	M _c	Доверительный интервал для медианы		Интерквартильный размах, %	
			ДИ1	ДИ2	25	75
Растянутость 24 мес.	<i>bPit-1-HinFI^{AA}</i>	124,167	111,864	141,026	113,075	133,958
	<i>bPit-1-HinFI^{AB}</i>	129,364	125,000	132,787	118,817	137,705
	<i>bPit-1-HinFI^{BB}</i>	127,966	125,000	132,787	121,849	138,655
	Общая выборка	127,966	126,891	131,092	120,313	138,333

3. Непараметрические характеристики живой массы в возрасте 12, 18, 24 мес. в группах коров казахской белоголовой породы с разными генотипами по полиморфизму *bIGF-1-SnaBI*

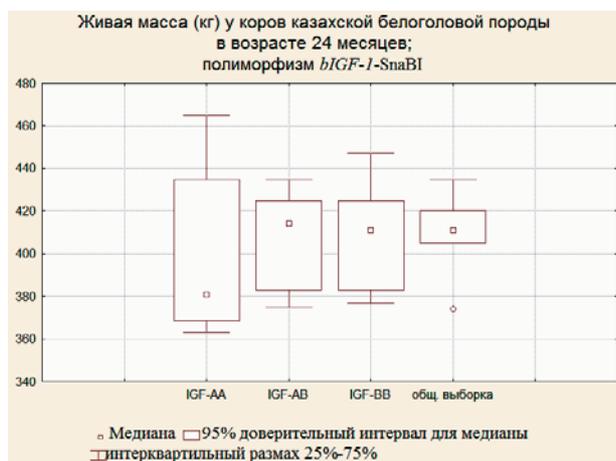
Признак/возраст	Генотип	M _c	Доверительный интервал для медианы		Интерквартильный размах, %	
			ДИ1	ДИ2	25	75
Живая масса 12 мес.	<i>bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	307	284	341	284	340
	<i>bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	326	321	332	289	343
	<i>bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	326	321	332	304	345
	Общая выборка	325	324	326	293	340
Живая масса 18 мес.	<i>bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	346	321	387	326	384
	<i>bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	370	365	376	327	398
	<i>bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	373	365	376	341	401
	Общая выборка	370	367	372	329	384
Живая масса 24 мес.	<i>bIGF-1-SnaBI^{AA}</i>	381	363	465	369	435
	<i>bIGF-1-SnaBI^{AB}</i>	414	383	425	375	435
	<i>bIGF-1-SnaBI^{BB}</i>	411	383	425	377	447
	Общая выборка	411	405	420	374	435



2а



2б



2в

Рис. 2 – Живая масса (кг) у коров казахской белоголовой породы в возрасте 12, 18 и 24 мес.; полиморфизм *bIGF-1-SnaBI*

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

По приведённым на рисунке 2 данным видно, 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 её размах признака находится за пределами и верхнего, и нижнего доверительного интервала медианы общей выборки. Причём данная тенденция прослеживается на всех возрастных категориях.

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

Литература

1. Бозымов К.К. Приоритетное развитие специализированного мясного скотоводства – путь к увеличению производства высококачественной говядины / К.К. Бозымов, Р.К. Абжанов, А.Б. Ахметалиева, В.И. Косилов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2012. № 3 (35). С. 129–131.
2. Косилов В.И., Губашев Н.М., Насамбаев Е.Г. Повышение мясных качеств казахского белоголового скота путём скрещивания // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2007. № 1 (13). С. 91–93.
3. Михайлова М.Е., Белая 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.
4. Phillips J.A. III Inherited defects in growth hormone synthesis and action. In: The metabolic and molecular basis of inherited disease / ed. by C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. 7-th Edition. // McGraw-Hill Health Professions Division. 1995. Vol. 2. P. 3023–3044.
5. Anderson B., Rosenfeld M.G. Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 29335–29338.
6. De Mattos, K.K., Del Lama, S.N., Martinez, M.L., Freitas, A.F. Association of *bGH* and *Pit-1* gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls. Braz // J. Agric. Res. 2004. № 39. P. 147–150.
7. Ingraham H.A., Chen R., Mangalam H.J., Elsholtz H.P., Flynn S.E., Lin C.R., Simmons D.M., Swanson L., Rosenfeld M.G. A tissue specific transcription factor containing a homeo domain specifies a pituitary phenotype // Cell. 1988. Vol. 55. P. 519–529.
8. Woollard, J., Schmitz C.B., Freeman A.E., Tuggle C.K. Rapid communication: *HinfI* polymorphism at the bovine *Pit1* locus // J. Anim. Sci. 1994. № 72. 3267 p.
9. Kriegesmann B. B. Baumgartner B.G., Brenig B. Dierkes Partial genomic structure of bovine *Pit1* gene and characterization of a *HinfI* transition polymorphism in exon 6 // Anim. Genet. 1998. Vol. 29. P. 398–413.
10. Renaville R., Gengler N., Vrech A., Prandi A., Massart S., Corradini C., Bertozzi, C., Mortiaux, F., Burny, A., Portetelle, D. *Pit-1* gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls // J. Dairy Sci. 1997. № 80. P. 3431–3438.
11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера. 2002. 312 с.