

УДК 575.162

О. В. Митрофанова, Н. В. Деменьтева, А. А. Крутикова, О. П. Юрченко, А. Б. Вахрамеев

Изучение полиморфизма в гене 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А-редуктазы у кур

Аннотация. С помощью метода ПЦР-ПДФ был проанализирован полиморфизм на основе однонуклеотидных замен в гене 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А-редуктазы (HMGCR). Для анализа использовали ДНК юрловской голосистой породы ($n=59$) и породы корниш ($n=6$).

Ключевые слова: полиморфизм, SNP, HMGCR, PCR-PDRF.

Авторы:

Митрофанова Ольга Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, 55а, +7 (921) 796-41-63, mo1969@mail.ru;

Деменьтева Наталия Викторовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, 55а, +7 (921) 743-07-43, dementevan@mail.ru;

Крутикова Анна Алексеевна — научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, 55а;

Юрченко Олег Павлович — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории сохранения генофонда ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, 55а;

Вахрамеев Анатолий Борисович — старший научный сотрудник лаборатории сохранения генофонда ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, 55а.

Введение. Поиск генов и полиморфных участков ДНК, которые могут быть полезны для геномной селекции, активизировался после полной расшифровки генома курицы [1]. Особый интерес направлен на изучение однонуклеотидных замен ОНП или SNP [2]. При секвенировании было выявлено несколько миллионов таких нуклеотидных полиморфизмов и данные об их числе у разных видов животных постоянно увеличивается.

Исследования последних лет показывают, что SNP могут эффективно использоваться в качестве генетических маркеров. С их помощью ведется селекция многих признаков, связанных с продуктивностью (яйценоскость, толщина скорлупы и т.д.) [3, 4]. Особый интерес прикован к SNP, которые расположены в кодирующих областях генома, поскольку есть вероятность их влияния на формирование различных признаков.

Одним из генов-кандидатов признаков, связанных с продуктивностью, является ген, кодирующий 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А-редуктазу (HMGCR). Редуктаза этого типа представляет собой мембранный белок, который локализуется в эндоплазматическом ретикулуме. Он

состоит из N-концевого мембранного домена и C-концевого домена, обладающего каталитической активностью. Этот фермент является определяющим на первой стадии синтеза холестерина. С его помощью происходит реакция превращения ацетил-КоА в мелавонат за счет двуступенчатого восстановления с участием NADH.

Этот ген активно изучается у человека, поскольку его функционирование связывают с нарушениями в работе сердечно-сосудистой системы. Появляются работы и на животных, растениях и некоторых микроорганизмах, есть несколько исследований домашней птицы. Значительная корреляция была показана у гусей между однонуклеотидным полиморфизмом (SNP) в интроне 5 гена HMGCR, отмечено влияние этого полиморфизма на качество мяса и мясную продуктивность [5].

Ген HMGCR кур расположен на хромосоме Z и содержит 20 экзонов и 19 интронов. Целью данного исследования был подбор праймеров и изучение возможности использования SNP в гене HMGCR кур для оценки полиморфизма генофондных популяций птицы.

Условия, материалы и методы исследования.

Для исследования была выделена ДНК из крови петушков юрловской породы экспериментального хозяйства ВНИИГРЖ (59 голов) и петушков породы корниш племенного хозяйства «Смена» Московской области (6 голов).

На следующем этапе работы были подобраны праймеры к двум заменам в гене HMGCR. Это замена T/G в положении g.12217 и замена T/C в положении g.12684. Для замены g.12217 это пара 5'-CAT-TGC-CTG-TGG-TCA-GGT-3' (прямой) и 5'-GCA-GTT-AGA-GCT-GCC-TAG-ATT-3' (обратный). Для замены g.12684 это пара 5'-ATG-GTC-CTC-TTG-AAA-CCT-GTC-GG-3' (прямой) и 5'-TAG-CAA-GCT-GGC-GGGCAT-TTT-CC-3' (обратный).

Общий объем реакционной смеси был 10 мкл и имел следующий состав: 10x буфер для ПЦР 2 мкл, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты по 0,125 мМ каждого, дистиллированной воды 5,8 мкл, Taq-полимеразы 2,5 ед, по 0,5 мкМ каждого праймера, 100 нг геномной ДНК.

ПЦР состояла из 30 циклов, включающих в себя последовательные этапы денатурации при 94°C в течение 30 сек, отжига праймеров при 60–62°C в течение 30 с и достройки цепи при 72°C в течение 30 с. Начальная денатурация проводилась при 95°C в течение 5 мин, а окончательное удлинение цепи при 72°C в течение 10 мин (амплификатор Thermal Cycler C1000 Touch).

Затем проводили рестрикцию в течение двух часов при 37°C. Детекцию полученных фрагментов осуществляли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем в качестве красителя бромистый этидий, при напряжении 150 В в течение 1 часа. Результаты фиксировали в системе геледокументации Кодак.

Анализ и обсуждение результатов. На первом этапе работы была проведена оптимизация условий проведения ПЦР. В ходе этого получены четкие картины амплифицированных участков. Размер

последовательности ДНК, содержащей замену g.12217 G> T, составил 162 нуклеотида. Для идентификации второй замены амплифицировали фрагмент, длина которого составила 272 нуклеотида.

Замена нуклеотида g.12217 G> T, находящаяся на участке экзона 17 гена HMGCR Z хромосомы, приводит к тому, что вместо аминокислоты глутамина идет синтез гистидина. Можно предположить, что такая замена повлечет за собой и функциональные изменения в ферменте.

При замене G на T исчезает сайт узнавания для фермента HinfI, что делает невозможным рестрикцию амплифицированного фрагмента. К сожалению, в охваченной нами популяции петушков все амплифицированные фрагменты прошли рестрикцию (рис. 1). Было проанализировано 59 особей юрловской голосистой породы и 6 — породы корниш.

Генетическая однородность популяции взаимосвязана с ее гетерозиготностью. В нашем случае у петухов-представителей юрловской породы полиморфизм по данной SNP в положении g.12217 не наблюдался.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что данный локус оказался неинформативным для петухов юрловской породы. Вероятно, стоит увеличить число проанализированных особей породы корниш, чтобы дать окончательное заключение о возможности использовать замену в положении g.12217 в гене HMGCR у сельскохозяйственной птицы.

По замене g.12684 получены только результаты оптимизации ПЦР. В дальнейшем мы надеемся оценить полиморфизм по этой замене с использованием рестриктазы Eco88I.

По сведениям, содержащихся в геномных базах данных, в гене, кодирующем фермент 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А-редуктазу найдено более 20 тыс. однонуклеотидных замен. Дальнейший поиск информативных SNP будет продолжен, чтобы выявить те полиморфизмы, которые могут оказаться пригодными для селекции.

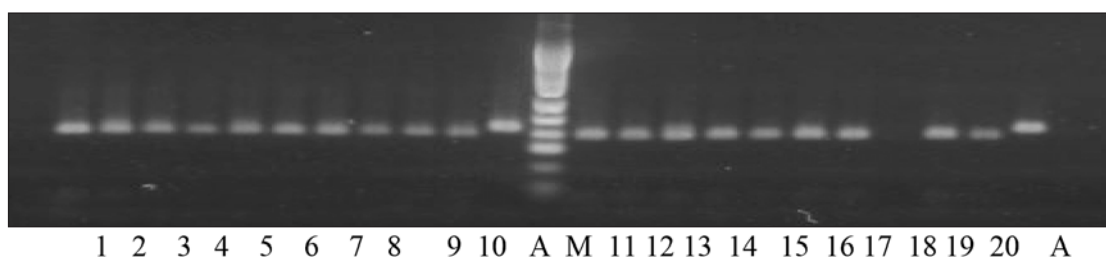


Рис. 1. Картина распределения ДНК-фрагментов для замены g.12217 G> T гена HMGCR кур. 1-20 генотипы петухов; М — маркер длин фрагментов; А — контроль

1. Митрофанова О. В. Исследование особенностей генетической гетерогенности пород и экспериментальных популяций кур на основе полиморфизма ДНК / О. В. Митрофанова, В. И. Тыщенко, Н. В. Деметьева и др. // Доклады РАСХН. — 2007. — № 6. — С. 36–38.
2. Wong G. K. International chicken polymorphism map consortium, a genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms / G. K. Wong, B. Liu, J. Wang, Y. Zhang, X. Yang, Z. Zhang, Q. Meng, J. Zhou, D. Li et al. // Nature. — 2004. — V.432. — P.717–725.
3. Fitzpatrick E. Fine mapping and SNP analysis of positional candidates at the preeclampsia susceptibility locus (PREG1) on chromosome 2 / E. Fitzpatrick, H. H. Goring, H. Liu, A. Borg, S. Forrest, D. W. Cooper, S. P. Brennecke, E. K. Moses // Hum. Biol. — 2004. — V.76. — P.849–862.
4. Meaburn E. Genotyping pooled DNA using 100K SNP microarrays: a step towards genomewide association scans / E. Meaburn, L. M. Butcher, L. C. Schalkwyk, R. Plomin // Nucleic Acids Res. — 2006. — V. 34. — P. 27.
5. Zhong L. SNP in intron 5 of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) gene and its genetic effects on important economic traits in geese / L. Zhong, C. Hong-Quan, H. Hua-Yun, Z. Li-Sha et al. // Chin. J. Agric. Biotechnol. — 2008. — V. 5. — P.127–132.

Mitrofanova O. V., Dementeva N. V., Krutikova A. A., Yurchenko O. P., Vachrameev A. B.

Study of polymorphism in a gene of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A-reductase in chicken

Abstract. *Polymorphism of single nucleotide substitutions in a gene of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase (HMGR) was analyzed by PCR-RFLP. DNA of Yurlov crower breed (n = 59) and Cornish (n = 6) was used for analysis.*

Keywords: PCR-RFLP, chickens, polymorphism, SNP, HMGR.

Authors:

Mitrofanova Olga Viktorovna — PhD (Biol.), Senior Research Scientist of Laboratory of Molecular Cytogenetics for RRIFAGB; St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601, e-mail: mo1969@mail.ru, +7 (921) 796-41-63;

Dementeva Nataliya Viktorovna — PhD (Biol.), Senior Research Scientist of Laboratory of Molecular Cytogenetics for RRIFAGB; St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 19660, e-mail: dementevan@mail.ru, +7 (921) 743-07-43;

Krutikova Anna Alexeevna — researcher RRIFAGB; St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601;

Yurchenko Oleg Pavlovich — PhD (Biol.), Research Scientist of Laboratory of Molecular Cytogenetics for RRIFAGB; St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601;

Vachrameev Anatoliy Borisovich — researcher of Laboratory for gene pool preservation for RRIFAGB; St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601.