УДК 575.162

О. В. Митрофанова, Н. В. Дементьева, В. И. Тыщенко, О. П. Юрченко, А. Б. Вахрамеев

Связь генотипов по однонуклеотидным заменам в гене миостатина с показателями живой массы у кур Пушкинской породы

Аннотация. *С помощью метода ПЦР-ПДРФ были проанализированы частоты двух SNP в гене GDF-8 у кур Пушкинской породы экспериментального хозяйства ФГУП «Генофонд». Определена взаимосвязь изученных замен с показателями живой массы курочек и петушков в 7, 49 и 110 дней.*

Ключевые слова: полиморфизм, SNP, GDF-8, PCR-RFLP.

Авторы:

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

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

Тыщенко Валентина Ивановна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики, ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, 55а;

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

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

Введение. Ген (GDF-8), или миостатин, является представителем группы трансформирующих β-факторов роста (TGF-β). Его основная задача заключается в регулировании массы скелетных мышц путем негативного воздействия [1, 2]. Впервые этот ген был обнаружен у мышей [3]. У крупного рогатого скота он был идентифицирован как ген, вызывающий гипертрофированное развитие мускулатуры (так называемая «Double muscling» у коров Бельгийской голубой породы) [4, 5, 6].

Последовательность гена MSTN определена у целого ряда животных и человека. У кур ген MSTN состоит из трех экзонов, длиной 373 п.н., 374 п.н. и 1567 п.н. соответственно [7], и двух интронов. Работы последних лет направлены на поиск однонуклеотидных замен (SNP) в кодирующей части миостатинового гена. Ряд исследователей обнаружили связь отдельных замен с хозяйственно-полезными признаками у кур [8,9,10].

Особенность селекционной работы в птицеводстве заключается в том, что идет интенсивный отбор сразу по нескольким признакам. Это позволяет рассматривать молекулярные маркеры как хорошие дополнительные помощники для успешного отбора птицы [11, 12].

Целью нашей работы было проанализировать популяцию кур Пушкинской породы ФГУП «Генофонд» на наличие полиморфизма по однонуклеотидным заменам в гене миостатина, а так же определить связь SNP с живой массой птицы в различные периоды ее жизни.

Условия, материалы и методы исследования. Материалом для наших исследований послужила ДНК, выделенная из крови кур Пушкинской породы экспериментального хозяйства ФГУП «Генофонд».

ДНК выделяли по стандартной методике, с использованием протеиназы К (Сибэнзим, Новосибирск) и фенола.

Для типирования были выбраны две пары праймеров: MSTpr (прямой 5’-AAC-CAA-TCG-TCG-GTT-TTG-AC-3’, обратный 5’-CGT-TCT-CTG-TGG-GCT-GAC-TA-3’) и MSTex1 (прямой 5’-TAG-TCA-GCC-CAC-AGA-GAA-CG-3’, обратный 5’-CGA-AAG-CAG-CAG-GGT-TGT-TA-3’). С их помощью получали два участка экзона 1 миостатинового гена (AF346599). Продукты амплификации обрабатывали с помощью рестриктаз HpaII и HinPII (Thermo). В результате, были найдены две однонуклеотидные замены (SNP). Это замена G/A в положении 2109 и замена G/C в положении 2244 миостатинового гена.

Для осуществления полимеразной цепной реакции готовили смесь из следующих компонентов: 67 mM трис -HCl pH 8,6, 2,5 mM MgCl2,

16,6 mM NHOH, 0,125 мМ каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 мкМ праймера, 50–100 нг геномной ДНК и 2,5 ед Taq-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск). Общий объем реакционной смеси составлял 10 мкл.

Реакцию проводили на амплификаторе «Biorad» (США). Использовали режим, состоящий из 35 циклов: 30 сек — 94°С, 30 сек — 60°С, 30 сек — 72°С. Для рестрикции в пробирку добавляли 0,5 мкл необходимой рестриктазы HpaII, HinPII (Thermo), перемешивали и ставили на инкубацию на 3 часа при 37°С.

Для электрофореза использовали 1,5% агарозные гели, содержащие флуоресцентный краситель бромистый этидий, и TBE-буфер (45 мМ трисборат. 1 мМ ЭДТА). Смесь после рестрикции вносили в кармашки геля. Электрофорез проводили в течение 1 часа при рабочем напряжении 150 В.

В качестве маркера, позволяющего оценить длину фрагментов ДНК на геле, использовали pUC/MspI (Fermentas). Сигнал флуоресценции фотографировали в системе гель-документации фирмы Кодак.

Анализ и обсуждение результатов. Частоты аллелей и генотипов по двум изученным заменам у кур Пушкинской породы представлены в таблице 1.

Видно, что по замене MST2109 наблюдается существенное преобладание GG генотипа с частотой встречаемости 0,81. Следовательно, при анализе частот встречаемости аллелей, мы наблюдали преимущество аллеля G (частота встречаемости 0,89). Аллель А у представителей этой породы встречался редко.

При анализе частот встречаемости различных генотипов у Пушкинских кур по замене MST2244 отмечалось значительное преобладание гомозигот СС, что привело к существенному смещению частот аллелей. Частота аллеля С составила 0,87.

Поскольку, проанализировано по данной замене было достаточно большое поголовье кур, можно говорить о направленном отборе, которому подвергалась эта порода в ходе селекции.

При анализе показателей живой массы в популяции Пушкинской птицы мы наблюдали, что в 110 дней и у курочек, и у петушков с генотипом АА по замене MST2109 этот показатель был выше, чем у птицы с другим генотипом (таблица 2). Так, курочки в этом возрасте весили 1714±87 г, а петушки — 2460±190 г**.** К сожалению, малое число проанализированных животных не позволило считать эти различия достоверными.

В таблице 3 представлены результаты связи живой массы с генотипом по замене MST 2244. И хотя по этому показателю в 110 дней значитель-

Таблица 1. **Частоты аллелей и генотипов по двум SNP, выявленным в миостатиновом гене у кур Пушкинской породы (n=139) ФГУП «Генофонд»**

SNP	Генотип	Частота генотипов	Аллели	Частота аллелей
MST2109 (n=139)	GG	0,81		
	GA	0,16		
	AA	0,03		
			G	0,89
			A	0,11
MST2244 (n=144)	CC	0,76		
	CG	0,21		
	GG	0,03		
			C	0,87
			G	0,13

Таблица 2. **Живая масса (г) курочек и петушков Пушкинской породы в зависимости от генотипа по замене MST 2109**

	AA	GA	GG	Среднее по стаду
Живая масса курочек в 7 дней	72±16 (n=2)	82±2 (n=21)	82±0,9 (n=107)	81±0,8 (n=138)
Живая масса петушков в 7 дней	89±3 (n=2)	86±2 (n=29)	89±0,9 (n=100)	88±0,8 (n=132)
Живая масса курочек в 49 дней	823±33 (n=4)	738±17 (n=21)	772±9 (n=93)	771±8 (n=125)
Живая масса петушков в 49 дней	920 (n=1)	916±20 (n=25)	914±12 (n=91)	915±10 (n=118)
Живая масса курочек в 110 дней	1714±87 (n=4)	1514±35 (n=22)	1570±15 (n=112)	1570±14 (n=142)
Живая масса петушков в 110 дней	2460±190 (n=2)	2197±37 (n=31)	2198±22 (n=102)	2201±19 (n=136)

Таблица 3. **Живая масса (г) курочек и петушков Пушкинской породы в зависимости от генотипа по замене MST 2244**

	CC	CG	GG	Среднее по стаду
Живая масса курочек в 7 дней	81±0.9 (n=105)	81±2 (n=28)	80±8 (n=2)	81±0,8 (n=107)
Живая масса петушков в 7 дней	89±0.9 (n=92)	86±2 (n=33)	89±3 (n=7)	88±0,8 (n=107)
Живая масса курочек в 49 дней	769±9 (n=91)	768±17 (n=27)	793±58 (n=4)	771±8 (n=107)
Живая масса петушков в 49 дней	912±12 (n=82)	910±20 (n=30)	964±44 (n=6)	915±10 (n=107)
Живая масса курочек в 110 дней	1572±15 (n=108)	1551±34 (n=29)	1621±98 (n=4)	1570±14 (n=107)
Живая масса петушков в 110 дней	2195±22 (n=94)	2186±35 (n=35)	2353±93 (n=7)	2201±19 (n=107)

но крупнее были и курочки (1621±98 г), и петушки (2353±93 г) с генотипом GG, но достоверные отличия не наблюдались. Это связано с тем, что среди всей популяции Пушкинских кур в экспериментальном хозяйстве нам удалось обнаружить лишь 4 курицы и 7 петушков с таким генотипом.

Выводы. 1. С помощью полимеразной цепной реакции в популяции кур Пушкинской породы были выявлены две однонуклеотидные замены в гене GDF-8 в положениях 2209 и 2244.

2. По замене MST2209 отмечается существенное преобладание особей с генотипом GG и повышенная частота аллеля G в изучаемой популяции. По замене MST2244 преобладали куры с генотипом CC, а частота аллелей значительно смещена в сторону преобладания аллеля C.

3. Достоверных отличий по показателям живой массы между представителями различных генотипов в Пушкинской породе обнаружено не было.

Литература

1. Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J. and Kambadur R. (2000). Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. J. Biol. Chem. 275, 40235–40243.
2. Mc Croskery S., Thomas M., Maxwell L., Sharma M. and Kambadur R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal, J. Cell. Biol. 162, 1135–1147.
3. Mc Pherron A. C., Lawler A. M. and Lee S. J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature. 387, 83–90.
4. Mc Pherron A. C. and Lee S. J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 12457–12461.
5. Kambadur R., Sharma M., Smith T. P. L. and Bass J. J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. Genome Res. 7, 910–915.
6. Grobet L., Poncelet D., Royo L. J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux C., Ménissier F., Zanotti M., Dunner S. and Georges M. (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double muscling in cattle. Mammal. Genome. 9, 210–213
7. Baron E. E., Wenceslau A. A., Alvares L. E., Nones K., Ruy D. C., Schmidt G. S., Zanella E. L., Coutinho L. L. and Ledur M. C. (2002). High level of polymorphism in the myostatin chicken gene. Pp. 19–23 in Proc. 7th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. Montpellier, France.
8. А. Яковлев, В. Терлецкий, Э. Сэксте и др. Влияние гена гормона роста на хозяйственные признаки птицы //Птицеводство. 2013. № 1. С. 2–4.
9. Ye X., Brown S. R., Nones K., Coutinho L. L., Dekkers J. C. and Lamont S. J. (2007). Associations of myostatin gene polymorphisms with performance and mortality traits in broiler chickens. Genet. Sel. Evol. 39, 73–89.
10. Zhiliang G., Dahai Z., Ning L., Hui L., Xuemei D. and Changxin W. (2004). The single nucleotide polymorphisms of the chicken myostatin gene are associated with skeletal muscle and adipose growth. Sci. China C. Life Sci. 47, 25–30.
11. Тыщенко В. И., Митрофанова О. В., Дементьева Н. В. Оценка генетического разнообразия в породах и экспериментальных популяциях кур с помощью ДНК-фингерпринтинга //Сельскохозяйственная биология. 2007. № 4.С.29–33.
12. Тыщенко В. И., Дементьева Н. В, Терлецкий В. П., Яковлев А. Ф. Оценка генетического разнообразия у кур на основе геномной дактилоскопии //Сельскохозяйственная биология. 2002. № 6. С–43.

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

Relationship between genotypes with single nucleotide changes in myostatin and weight in Pushkin breed chickens

Abstract. *Frequencies of two SNP in the GDF-8 gene in Pushkin chickens of experimental farm were analyzed using PCR-RFLP. The correlation of replacements with weight of males and females at 7, 49 and 110 days was shown.*

Keywords: GDF-8, PCR-RFLP, chickens, polymorphism, SNP.

Authors:

Mitrofanova Olga Victorovna — researcher, Ph.D. in Biological Sciences, Russian Research Institute for Farm Animal Genetics and Breeding, +7 (921) 796-41-63; mo1969@mail.ru;

Dementeva Natalia Victorovna — researcher, Ph.D. in Biological Sciences Russian Research Institute for Farm Animal Genetics and Breeding, +7 (921) 743-07-43; dementevan@mail.ru;

Tyschenko Valentina Ivanovna — researcher, Ph.D. in Biological Sciences, Russian Research Institute for Farm Animal Genetics and Breeding;

Yurchenko Oleg Pavlovich — researcher, Ph.D. in Biological Sciences, Russian Research Institute for Farm Animal Genetics and Breeding;

Vachrameev Anatolij Borisovich — researcher, Russian Research Institute for Farm Animal Genetics and Breeding.

О. В. Митрофанова и др. ©