

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 Юрловской голосистой породы

Аннотация. С помощью метода ПЦР-ПДРФ были проанализированы частоты двух SNP в гене миостатина у кур юрловской 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, миостатин, PCR-PDRF.

Авторы:

Митрофанова Ольга Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики ФГБНУ ВНИИГРЖ; г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а, 196601; e-mail: mo1969@mail.ru; тел.: +7-921-796-41-63;

Дементьева Наталия Викторовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики ФГБНУ ВНИИГРЖ; г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а, 196601; e-mail: dementevan@mail.ru; тел.: +7-921-743-07-43;

Тыщенко Валентина Ивановна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики ФГБНУ ВНИИГРЖ; г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а, 196601;

Юрченко Олег Павлович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики ФГБНУ ВНИИГРЖ; г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а, 196601;

Вахрамеев Анатолий Борисович — научный сотрудник лаборатории генофонда животных ФГБНУ ВНИИГРЖ; г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а, 196601.

Введение. Исследования, направленные на изучение связи полиморфизма ДНК с ростовесовыми признаками, имеют важное значение для повышения эффективности селекционной работы и рентабельности производства.

В последнее время расширяются представления о механизмах молекулярного контроля за процессами онтогенеза, изучается влияние гормонов, их рецепторов и специальных ростовых факторов на пролиферативную активность клеток различных тканей.

Ген GDF-8, или миостатин, является членом трансформирующего фактора роста-бета (TGF-бета) и оказывает негативное воздействие на рост скелетной мускулатуры у позвоночных животных и человека [1, 2, 3]. Обнаруженный впервые в 1997 году у лабораторных мышей [4], он стал затем объектом для поиска аналогичных генов и у других животных. У высших позвоночных миостатин является тканеспецифичным белком, синтез которого проходит в скелетных мышцах и оказывает именно на них влияние.

Ген миостатина очень полиморфный. Девятнадцать однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и 20 гаплотипов были обнаружены в 28 европейских породах крупного рогатого скота, некоторые из них были специфическими [5]. Эти достиже-

ния фундаментальной науки стали основой для прикладных разработок, в том числе и на сельскохозяйственных животных [6].

Ген миостатина у кур, расположенный на хромосоме 7, успешно секвенирован [7] и состоит из трех экзонов и двух интронов. Однонуклеотидные замены обнаружены в разных участках этого гена, а основная работа ведется в направлении поиска взаимосвязей хозяйственно-полезных признаков и отдельных замен [8, 9, 10]. В дальнейшем эти маркеры могут служить помощниками в отборе птицы для дальнейшего разведения с целью закрепления желательных генотипов [11, 12].

Цель работы:

1. проанализировать популяцию кур юрловской голосистой породы ФГУП «Генофонд» по двум однонуклеотидным заменам в гене миостатина;
2. определить частоты встречаемости генотипов и аллелей по каждой замене;
3. изучить связь замен с продуктивными показателями птицы в различные периоды ее жизни.

Условия, материалы и методы исследования. Материалом для исследований послужила ДНК, выделенная из крови кур Юрловской голосистой 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): 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, MgCl₂, NH₄OH, 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 «Bio-rad» (США). Использовали режим, состоящий из 35 циклов: 30 сек — 94°C, 30 сек — 60°C,

30 сек — 72°C. Для рестрикции в пробирку добавляли 0,5 мкл необходимой рестриктазы HpaII, HinPII (Thermo), перемешивали и ставили на инкубацию на 3 часа при 37°C.

Для электрофореза использовали 1,5% агарозные гели, содержащие флуоресцентный краситель бромистый этидий и ТВЕ-буфер (трис-борат. 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 геле-документации фирмы Кодак. Результаты генотипирования представлены на фото 1, 2.

Анализ и обсуждение результатов. Первоначально нами были проанализированы частоты аллелей и генотипов по двум изученным заменам у кур Юрловской голосистой породы. Результаты этого анализа представлены в таблице 1.

По замене MST 2109 наблюдается существенное преобладание GG генотипа — его частота встречаемости оказалась равной 0,88. Это дает право предполагать значительные различия в частоте встречаемости изучаемых аллелей. И, действительно, аллель А у представителей изученной популяции встречался очень редко.

Анализируя другую замену в миостатиновом гене у кур юрловской голосистой породы в положении 2244, мы также обнаружили, что гомозиготы CC значительно преобладали. Хотя количество гетерозиготной по данному SNP птицы составило приблизительно 1/5 часть от поголовья, мы наблюдали существенное преобладание одного аллеля над другим.

Поскольку в ходе работы была проанализирована значительная популяция кур, можно говорить, что полученные данные отражают общую картину полиморфизма в группе по рассмотренным заменам.

M GA AA GG AA GA GG AA AA GG GA GG M

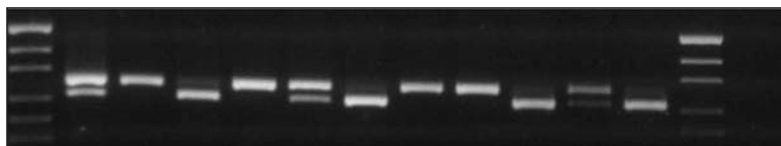


Фото 1. Детекция MST 2109 с помощью PCR-RFLP в миостатиновом гене у кур

M CC CG GG GG GG CG CG CG GG CG M

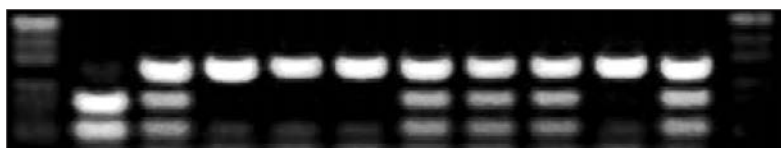


Фото 2. Детекция MST 2244 с помощью PCR-RFLP в миостатиновом гене у кур

Таблица 1. Частоты аллелей и генотипов по двум SNP у кур Юрловской голосистой породы ФГУП «Генофонд»

SNP	Генотип	Частота генотипов	Аллели	Частота аллелей
MST 2109 (n=163)	GG	0,88	G	0,93
	GA	0,09	A	0,07
	AA	0,03		
MST 2244 (n=273)	CC	0,78	C	0,88
	CG	0,21	G	0,12
	GG	0,01		

При анализе поголовья птицы Юрловской породы по замене MST 2109 достоверных различий между обладателями разных генотипов не наблюдалось (таблица 2). В то же время, сравнение животных с разными генотипами по замене MST 2244 показало, что живая масса петухов с генотипом GG в разные периоды жизни отличалась от средних показателей по стаду (таблица 3).

Выводы:

С помощью метода PCR-PDRF в популяции кур юрловской голосистой породы проанализированы две однонуклеотидные замены в экзоне 1 миостатинового гена (AF346599) G/A в положении 2209 и G/C в положении 2244.

По замене MST 2209 отмечена следующая картина: преобладали особи с генотипом GG, вслед-

ствие чего отмечалось смещение в частотах аллелей в сторону преимущественного распространения аллеля G в изучаемой популяции. По замене MST 2244 также выявлено преобладание особей с генотипом CC и повышенная частота встречаемости в популяции аллеля C.

Петухи юрловской голосистой породы с генотипом GG по SNP MST 2244 достоверно (с вероятностью >0,95) превосходили средние показатели по стаду по живой массе в 7, 49 и 110 дней.

Две генотипированные SNP MST 2109 и MST 2244 в экзоне 1 были синонимичными заменами. Таким образом, эти два SNP могут быть только генетическими маркерами и, вероятно, это не причинные мутации для признаков.

Таблица 2. Живая масса (г) курочек и петухов Юрловской голосистой породы в зависимости от генотипа по замене MST 2109

Показатели	AA	GA	GG	Среднее по стаду
Живая масса курочек в 7 дней, г	78 (n=2)	81±4 (n=6)	86±0,8 (n=104)	85±0,8 (n=112)
Живая масса петушков в 7 дней, г		90±2 (n=17)	90±1 (n=70)	90±0,8 (n=88)
Живая масса курочек в 49 дней, г	855±95 (n=2)	728±40 (n=5)	823±8 (n=99)	819±8 (n=106)
Живая масса петушков в 49 дней, г		955±28 (n=15)	970±13 (n=64)	967±12 (n=79)
Живая масса курочек в 110 дней, г	1706±95 (n=4)	1636±56 (n=10)	1727±13 (n=161)	1721±13 (n=175)
Живая масса петушков в 110 дней, г		2238±44 (n=19)	2194±23 (n=79)	2202±20 (n=99)

Таблица 3. Живая масса (г) курочек и петухов Юрловской голосистой породы в зависимости от генотипа по замене MST 2244

Показатели	CC	CG	GG	Среднее по стаду
Живая масса курочек в 7 дней, г	85±0,9 (n=88)	86±1,6 (n=24)		85±0,8 (n=112)
Живая масса петушков в 7 дней, г	90±0,9 (n=70)	90±2,3 (n=17)	98±2,3 (n=3)	90±0,8 (n=88)
Живая масса курочек в 49 дней, г	826±9 (n=84)	791±19 (n=22)		819±8 (n=106)
Живая масса петушков в 49 дней, г	961±14 (n=63)	976±22 (n=16)	1051±9 (n=2)	967±12 (n=79)
Живая масса курочек в 110 дней, г	1734±14 (n=135)	1669±26 (n=38)	1767±163 (n=2)	1721±13 (n=175)
Живая масса петушков в 110 дней, г	2191±23 (n=77)	2212±52 (n=18)	2361±45 (n=4)	2202±20 (n=99)

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. Kambadur R., Sharma M., Smith T.P.L. and Bass J. J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7, 910–915.
4. 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.
5. Dunner S. M., Miranda E., Amigues Y., Cacyn J., Georges M., Hanset R., Williams J., Ménissier F., Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds, *Genet. Sel. Evol.* 35 (2003) 103–118.
6. Proudfoot C1, Carlson D.F., Huddart R, Long C. R., Pryor J. H., King T. J., Lillico S. G., Mileham A. J., McLaren D. G., Whitelaw C. B., Fahrenkrug S.C. (2015) Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res.* Feb; 24(1):147–153.

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., Tyshhenko V. I., Yurchenko O. P., Vakhrameev A. B.

Relationship of snp genotypes in myostatin gene with carcass weight trait in Yurlov chicken breed

Abstract. *Using PCR-RFLP technique the frequency at two SNPs in myostatin gene of Yurlov chicken breed bred at the experimental farm «Genofond» has been analysed. Relationship between SNPs and traits of live weight in hens and cocks at the age of 7, 49 and 110 days has been determined.*

Key words: polymorphism, SNP, GDF-8, myostatin, PCR-RFLP.

Authors:

Mitrofanova Olga Victorovna — 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 Natalia Victorovna — 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;

Tyschenko Valentina Ivanovna — PhD (Biol.), Senior Research Scientist of Laboratory of Molecular Cytogenetics for RRIFAGB; St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601;

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

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