

**Поиск ассоциации замены rs29005090
и анализ транскрипционной активности гена G0S2 с отложением абдоминального жира и массой
тела у кур породы пушкинская.
к.б.н. Баркова О.Ю.**

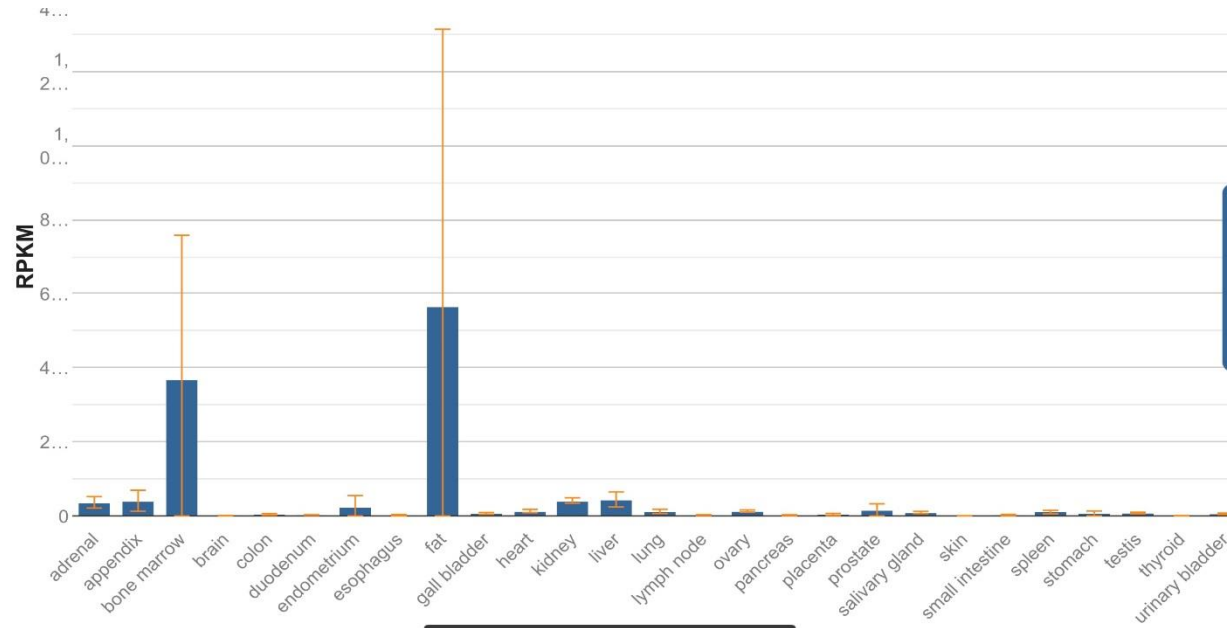
Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», Санкт-Петербург, Россия, 196601 Московское шоссе, 55а,



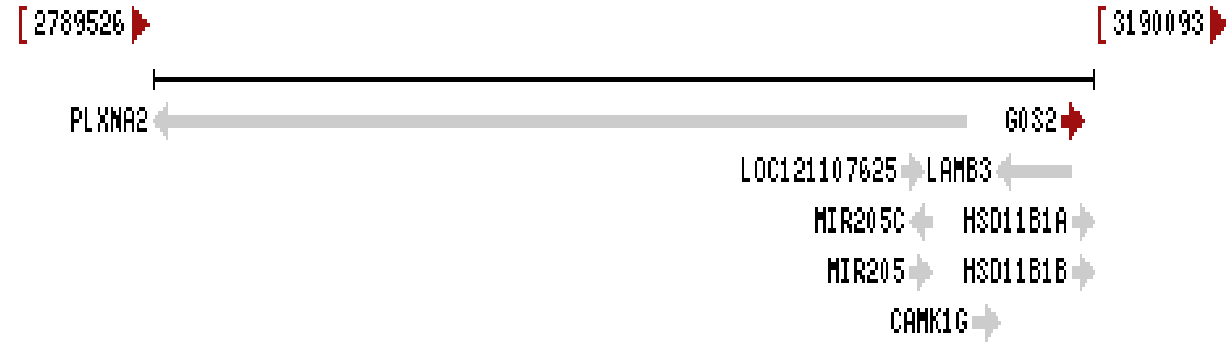
Исследование выполнено в рамках государственного задания 0445-2021-0011с использованием популяций кур из биоресурсной коллекции ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, Пушкин).

GOS2 G0/G1 switch 2 Gallus gallus

Gene ID: 419860



Chromosome 26 - NC_052557.1



Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
106	current	bGalGal1.mat.broiler.GRCg7b (GCF_016699485.2)	26	NC_052557.1 (3176431..3177334)
106	current	bGalGal1.pat.whiteleghornlayer. GRCg7w (GCF_016700215.2)	26	NC_052598.1 (3146726..3147623)

Цель

Изучить влияние генотипов по замене rs 29005090 гена GOS2 на массу тела кур породы пушкинская. Проверить транскрипционную активность гена GOS2 в жировой и мышечной тканях. Оценить связь транскрипционной активности в зависимости от генотипа, массы тела и массы абдоминального жира у кур породы пушкинская биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ.

Задачи исследования

1. Провести секвенирование кодирующих областей гена GOS2 и выявить моноклеотидный полиморфизм в их пределах.
2. Генотипирование 106 кур породы пушкинская для выявления гомозигот и гетерозигот по замене rs 29005090 гена GOS2.
3. Изучить влияние генотипов rs 29005090 гена GOS2 на массу тела кур породы пушкинская.
4. Проведение анализа экспрессии по гену GOS2 в жировой и мышечной тканях кур породы пушкинская.
5. Сравнение уровней экспрессии гена GOS2 в зависимости от генотипа и массы птицы, проведение корреляционного анализа уровня относительной экспрессии гена GOS2 с признаками тушки кур породы пушкинская.

Материалы

Материалом для секвенирования послужила ДНК 23 кур породы пушкинская. Для проведения экспериментов использовано 106 кур породы пушкинская. Все куры содержались на базе биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких исчезающих пород кур» (г. Пушкин, Санкт-Петербург). Для выделения матричной РНК использованы свежие ткани грудной мышцы и абдоминального жира 25 кур из 106 генотипированных, с контрастным проявлением признака масса тела и разными генотипами. У вышеперечисленных кур отобрана кровь для выделения ДНК, измерена масса тела.

Методы

Секвенирование по Сенгеру проводилось на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 с применением коммерческого набора "BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" согласно протоколу изготовителя. Выравнивание сиквенсов проводилось с помощью программы MEGA6 (https://www.megasoftware.net/web_help_10/index.htm#t=Citing_MEGA_In_Publications.htm) для выявления однонуклеотидных замен

Дизайн аллелеспецифических олигонуклеотидов-праймеров для генотипирования по аллелям SNP для РТ-ПЦР в реальном времени гена GOS2 у кур проводили на основании информации баз данных сети интернет (www.nlm.ncbi.nih.gov) при помощи компьютерной программы PRIMER_3 (www.genome.wi.mit.edu).

Выделение матричной РНК проводился с помощью набора реактивов Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Kit (o-Rad, США). Синтез кДНК. Синтез однокитевой кДНК проводили при помощи обратной транскриптазы Mint (Евроген) тщательно следуя указаниям производителя.

Реакции ПЦР в реальном времени для каждого образца проводили в трех повторениях. Для последующих расчетов использовали среднее арифметическое значение. Расчет изменений экспрессии отдельных молекул РНК выполняли методом $-2\Delta Ct$ (delta Cycle threshold) и амплификатора CFX-96 (Bio-Rad). Генотипирование по идентификации замены SNPs гена GOS2 проводили при помощи аллелеспецифических праймеров и амплификатора IQ-5 (Bio-Rad).

Статистическую обработку данных проводили в программе SIGMAPLOT 14 с применением ANOVA by ranks и критерия Крускала–Уоллиса, Спирмена.

Однонуклеотидные замены в локусах гена G0S2

SNP	Положение	Замена	Тип мутации	
rs29005090	26: 3177302	A>G	3 prime UTR variant	
rs10725377	26: 3176848	G>A (GCG>GCA)	synonymous variant	
rs10730877	26: 3176856	C>T (GGC>GGT)	synonymous variant	
rs315411255	26: 3177001	G>A (TCG>TCA)	synonymous variant	
rs10722764	26: 3177130	A>G	3 prime UTR variant	
rs317858728	26: 3177190	A>G	3 prime UTR variant	
rs314854834	26:3177367	C>T	intron variant	

Разработанные тест-системы для детекции выявленных полиморфизмов гена G0S2

Полиморфизм, локус	Метод	Праймеры	Длина амплификата температура отжига
rs 29005090	PCR	F: AGTGCAGGACTTGAAAGAAAGGAA F: AGTGCAGGACTTGAAAGAAAGGAG R: ACTCATCTGCAAACCCGTCAT	Длина амплификата 121 температура отжига 60
rs10725377	PCR	F: ACGTGCTGGGCAGCGTGCTGGCG F: ACGTGCTGGGCAGCGTGCTGGCA R: ATCTGCGAGCTGGTGTAAAGG	Длина амплификата 248 температура отжига 60.00
rs10730877	PCR	F: AGCGTGCTGGCGTTCCTCGGC F: AGCGTGCTGGCGTTCCTCGGT R: AGGAGGAGAGCAAGAGAGGG	Длина амплификата 905 температура отжига 60.00
rs315411255	PCR	F: TTGGAGCAGAGCAAGAAGTCCG F: TTGGAGCAGAGCAAGAAGTCA R: AGGAGGAGAGCAAGAGAGGG	Длина амплификата 761 температура отжига 60.00
rs10722764	PCR	F: AGCGATGGTGGTTCAGTGG F: AGCGATGGTGGTTCAGTGA R: AGGAGGAGAGCAAGAGAGGG 632	Длина амплификата 632 температура отжига 60.00
rs317858728	PCR	F: CAGGACTTGAAAGAAAGGAA F: CAGGACTTGAAAGAAAGGAG R: ACTCATCTGCAAACCCGTCAT	Длина амплификата 321 температура отжига 60.00
rs314854834	PCR	F: AGCTGCATTCATTTATGGAC F: AGCTGCATTCATTTATGGAT R: AGGAGGAGAGCAAGAGAGGG	Длина амплификата 395 температура отжига 60.00

Результаты

1. Генотипировано 106 кур породы пушкинская для выявления гомозигот и гетерозигот по замене rs 29005090 гена GOS2, проведен ассоциативный анализ с массой тела.
2. Проведен анализ экспрессии по гену GOS2 в жировой и мышечной тканях у 25 кур породы пушкинская.
3. Проведено сравнение уровней экспрессии гена GOS2 в зависимости от генотипа и признаков мясной продуктивности птицы и анализ корреляционных связей Спирмена.

Ассоциация rs29005090 гена GOS2 с признаками масса птицы и масса абдоминального жира кур породы пушкинская

Признак	Генотип	N	Среднее значение массы±ошибка среднего (гр)	Медиана	Стандартное отклонение	Эффект замещения аллелей(гр.)	P
Масса птицы Dunn's Method P = 0,004	AG	60	2532,250±41,20	2467,5	319,165	AG-AA 275,14гр.	0,017
	AA	14	2257,143±68,01	2282,5	254,503	AA-GG 351,795 гр	0,003
	GG	32	2608,938±58,47	2572,5	330,797	AG-GG	0,919

Частота генотипов полиморфного варианта rs29005090 гена GOS2 кур породы пушкинская

Полиморфизм	генотип	N	частота генотипов	частота аллелей	
rs29005090	AG	60	0,566	G	124(0,585)
	GG	32	0,301		
	AA	14	0,132	A	88 (0,415)

Ассоциация rs29005090 гена GOS2 с признаками птицы кур породы пушкинская

Признак	Генотип	N	Среднее значение массы±ошибка среднего (гр)	Медиана	Стандартное отклонение	Эффект замещения аллелей (гр.)	P
Масса грудной мышцы P =0,041	AG	13	238,269± 16,169	230,700	58,297	AG-AA	0,263
	GG	6	309,700± 21,413	306,850	52,451	AG-GG	0,038
	AA	6	268,600± 16,755	258,650	41,042	AA-GG.	0,355
Масса сердца P = 0,014	AG	13	8,454± 0,347	8,300	1,249	AG-AA	0,613
	GG	6	10,333±0,622	10,350	1,524	AG-GG	0,018
	AA	6	8,117± 0,539	8,100	1,321	AA-GG.	0,026
Масса печени P =0,839	AG	13	43,215± 2,920	44,900	10,528	AG-AA	0,839
	GG	6	49,433±5,283	44,600	12,941	AG-GG	0,355
	AA	6	50,417± 6,021	47,350	14,749	AA-GG.	0,905
Масса желудка железистого P = 0,430	AG	13	6,792±0,247	6,600	0,892	AG-AA	0,101
	GG	6	7,000±0,286	6,900	0,701	AG-GG	0,430
	AA	6	6,950± 0,182	6,950	0,446	AA-GG.	0,305
Масса желудка мышечного P = 0,220	AG	13	23,977±0,756	23,400	2,725	AG-AA гр.	0,997
	GG	6	27,050±1,765	27,600	4,324	AG-GG	0,075
	AA	6	23,983±1,905	23,350	4,667	AA-GG.	0,305

Ассоциация rs29005090 гена GOS2 с признаками масса птицы и масса абдоминального жира кур породы пушкинская

Признак	Генотип	N	Среднее значение массы±ошибка среднего (гр)	Медиана	Стандартное отклонение	Эффект замещения аллелей (гр.)	P
Масса абдоминального жира.	AG	13	135,682 ±20,505	132	73,930	AG-AA.	0,519
	AA	6	180±20,665	167	50,620	AA-GG.	0,173
	GG	6	159,633±23	29,963	73,394	AG-GG	0,392
Масса тушки без крови P =0,003	AG	13	2010,154±81,253	1965,000	292,962	AG-AA	0,345
	GG	6	2520,167±113,999	2505,50	279,240	AG-GG	0,002
	AA	6	2136,833±67,717	2090,000	165,872	AA-GG.	0,041
Масса тушки товарной P =0,004	AG	13	1201,154±55,056	1117,00	198,509	AG-AA	0,616
	GG	6	1527,667±64,208	1503,500	157,276	AG-GG	0,003
	AA	6	1245,167±51,227	1220,50	125,479	AA-GG.	0,021
Масса тушки без перьев P =0,003	AG	13	1908,385±80,581	1853,000	290,538	AG-AA гр.	0,349
	GG	6	2409,667±113,812	2385,000	278,781	AG-GG	0,003
	AA	6	2033,333±68,330	1968,500	167,373	AA-GG.	0,044
Масса бедра P =0,006	AG	13	76,123± 4,289	72,800	15,464	AG-AA гр.	0,349
	GG	6	97,650±3,735	96,750	9,150	AG-GG	0,003
	AA	6	74,933±3,923	74,000	9,610	AA-GG.	0,044
Масса голени P = 0,005	AG	13	62,723±2,903	62,500	10,467	AG-AA гр.	0,748
	GG	6	78,200±3,178	79,250	7,784	AG-GG	0,005
	AA	6	61,08±3,826	59,700	9,372	AA-GG.	0,006

Анализ корреляционных связей уровня относительной экспрессии гена G0S2 с признаками тушки кур породы пушкинская.

Признаки	Экспрессия в мышечной ткани		Экспрессия в жировой ткани	
	R, Спирмена	p	R, Спирмена	P
Тушка без крови	0,441	0,0275	0,0185	0,928
Тушка товарн	0,387	0,0556	0,00231	0,990
Масса сердца	0,0362	0,861	0,106	0,612
Масса печень	0,143	0,491	0,0877	0,673
Масса тушки без перьев	0,412	0,0404	0,0581	0,778
Масса селезенки	-0,0979	0,638	-0,278	0,175
Масса желудок железистый	0,365	0,0723	0,240	0,245
Масса желудок мышечный	0,136	0,512	0,0496	0,809
Нога бедро+голень	0,317	0,120	0,0208	0,919
Живая масса	0,435	0,0299	0,0423	0,838
Бедро	0,217	0,294	0,0523	0,801
Голень	0,315	0,123	0,00500	0,978
Масса грудной мышцы	0,550	0,00455	0,111	0,594
Масса абдоминального жира	0,102	0,625	0,303	0,139

Различия уровня экспрессии кур с генотипов AA, AG, GG в тканях грудной мышцы и жировой ткани

Генотип	N	Среднее значение массы±ошибка среднего	Стандартное отклонение	Медиана	P
Уровень экспрессии в жировой ткани					
AG	12	1,451±0,511	1,769	0,833	0,403
GG	6	3,507±3,040	7,446	0,288	
AA	6	62,533±52,318	128,153	1,101	
Уровень экспрессии в грудной мышце					
AG	13	7,997±5,699	20,548	0,569	0,767
GG	6	1,546±0,448	1,098	1,875	
AA	6	6,368±4,026	9,863	0,981	

Выводы. Полученные данные подтверждают предыдущее исследование, в котором была выявлена достоверная ассоциация rs29005090 гена G0S2 с признаками масса птицы и кур породы царскосельская и бройлеров кросса «Иза Хаббард Ф-15». Куры имеющие генотип GG достоверно имели большую массу тела и массу грудной мышцы, особи с генотипом AA имели достоверно наименьшую массу тела. Наиболее благоприятным генотипом выявлен генотип GG, мононуклеотидная замена GG может быть рекомендована для селекции с помощью маркеров для увеличения привесов птицы и уменьшения абдоминального жира тушки курицы в мясном птицеводстве. Наибольший уровень экспрессии был зафиксирован для генотипа AA в жировой ткани кур породы пушкинская, а наименьший для генотипа GG (по медиане). В грудной мышце кур породы пушкинская по среднему значению признака наибольшую экспрессию имели куры с генотипом AG, а по медиане куры с генотипом GG. Анализ корреляционных связей Спирмена выявил положительную среднюю корреляцию с признаками массы тела и массой грудной мышцы на достоверном уровне. При проведении анализа в жировой ткани, корреляционная связь наблюдалась только для признака масса абдоминального жира на недостоверном уровне (0,303, P=0,139).

- Спасибо за внимание!