



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, Пушкин



*Лаборатория молекулярной генетики*

# **ПОИСК АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ GOS2 И CLSPN С ОТЛОЖЕНИЕМ ЖИРА И МЫШЕЧНОЙ МАССОЙ У КУР ЦАРСКОСЕЛЬСКОЙ ПОРОДЫ**

**к.б.н. Баркова О.Ю.**

**Работа выполнена в рамках государственного задания 124020200114-7 с использованием популяций кур из биоресурсной коллекции ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, Пушкин).**

г. Луга, ЛГУ имени А.С. Пушкина (филиал)

22 мая 2024 г.

## **Цель исследования**

Поиск мононуклеотидных полиморфизмов гена-кандидата G0S2 участвующего в метаболизме липидов и гена-кандидата CLSPN регулирующего репликацию ДНК во время нормальной S-фазы. Изучение их связи с содержанием абдоминального жира и массы тела у кур породы царскосельская.

## **Задачи исследования**

Провести секвенирование кодирующих областей гена G0S2 и выявить мононуклеотидный полиморфизм в их пределах.

Создание тест -системы для детекции полиморфных вариантов генов кандидатов G0S2 и CLSPN

Проанализировать распространение мутаций генов G0S2 и CLSPN у кур породы царскосельская.

Изучить влияние генотипов по генам G0S2 и CLSPN на признаки кур породы царскосельская.

## Материалы

В экспериментах использованы куры породы царскосельская (85 особей) в возрасте 475 дней. Материалом для секвенирования послужила ДНК 23 кур породы пушкинская. Все куры содержались на базе биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких исчезающих пород кур» (г. Пушкин, Санкт-Петербург).

## 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](https://www.megasoftware.net/web_help_10/index.htm#t=Citing_MEGA_In_Publications.htm)) для выявления однонуклеотидных замен.

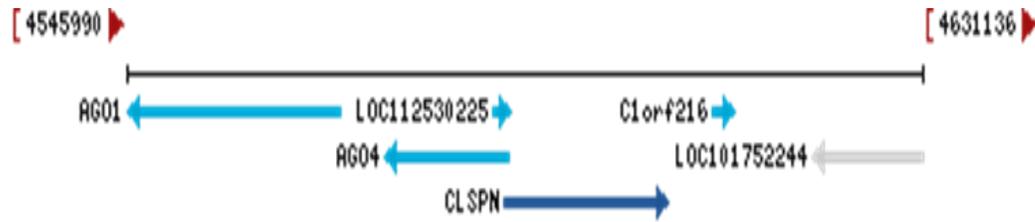
Дизайн аллелеспецифических олигонуклеотидов-праймеров для генотипирования по аллелям SNP гена GOS2 у кур проводили на основании информации баз данных сети интернет ([www.nlm.ncbi.nih.gov](http://www.nlm.ncbi.nih.gov)) при помощи компьютерной программы PRIMER\_3 ([www.genome.wi.mit.edu](http://www.genome.wi.mit.edu)).

Генотипирование по идентификации замены SNPs гена GOS2 проводили при помощи аллелеспецифических праймеров и амплификатора IQ-5 (Bio-Rad), для гена CLSPN проводили при помощи флуоресцентных зондов и амплификатора CFX-96 (Bio-Rad) в реальном времени.

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

# CLSPN claspin Gallus gallus

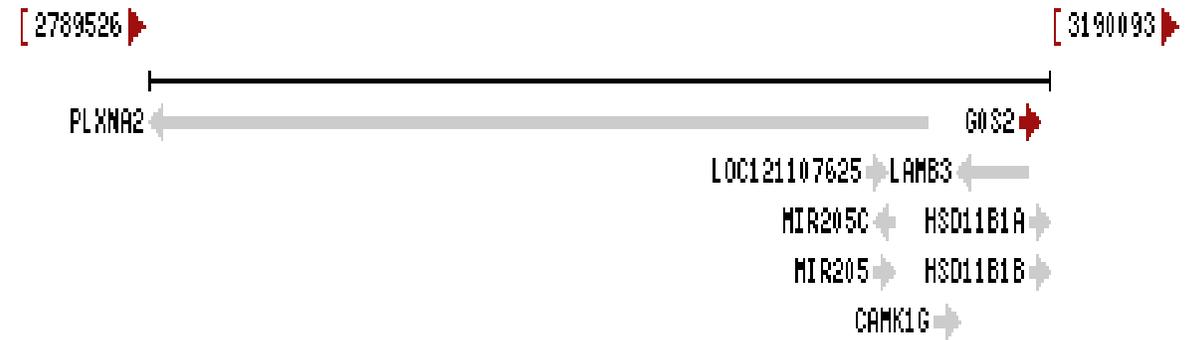
Gene ID: 428223, updated on 3-Apr-2024



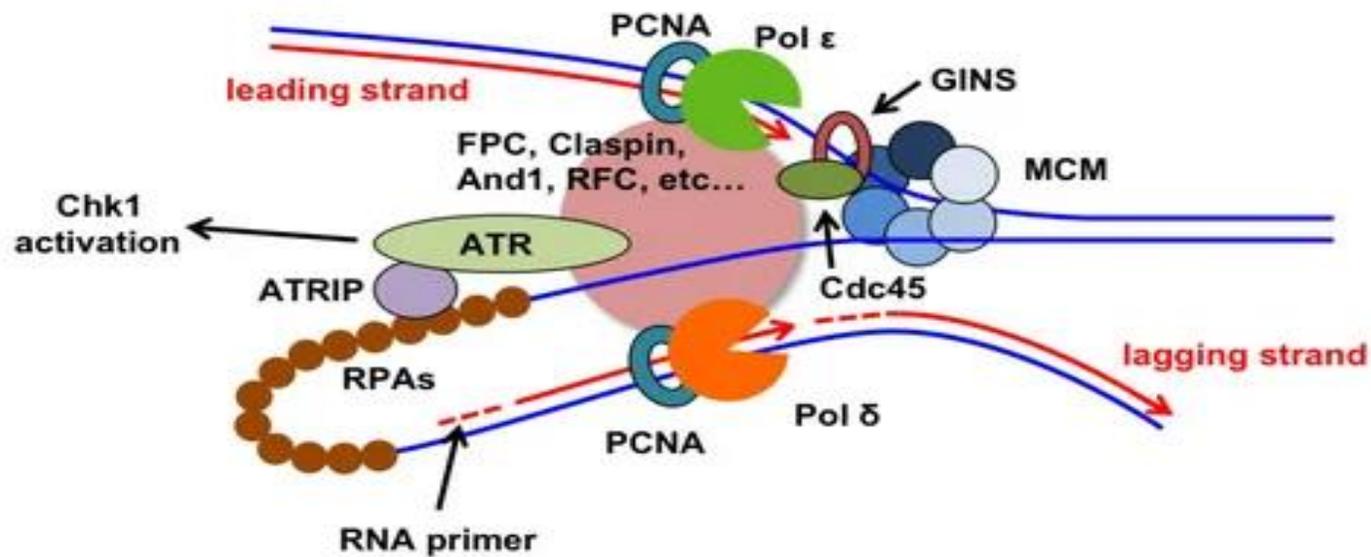
# G0S2 G0/G1 switch 2 Gallus gallus

Gene ID: 419860

Chromosome 26 - NC\_052557.1



Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location	Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
<a href="#">106</a>	current	bGalGal1.mat.broiler.GRCg7b ( <a href="#">GCF_016699485.2</a> )	23	NC_052554.1 (4586408..460381)	<a href="#">106</a>	current	bGalGal1.mat.broiler.GRCg7b ( <a href="#">GCF_016699485.2</a> )	26	NC_052557.1 (3176431..317734)
<a href="#">106</a>	current	bGalGal1.pat.whit eleghornlayer.GRCg7w ( <a href="#">GCF_016700215.2</a> )	23	NC_052595.1 (4349919..436738)	<a href="#">106</a>	current	bGalGal1.pat.whit eleghornlayer.GRCg7w ( <a href="#">GCF_016700215.2</a> )	26	NC_052598.1 (3146726..3147623)



Leman AR, Noguchi E. The replication fork: understanding the eukaryotic replication machinery and the challenges to genome duplication. *Genes (Basel)*. 2013 Mar 1;4(1):1-32. doi: 10.3390/genes4010001.

Поиск геномных ассоциаций (GWAS) с признаками продуктивности кур породы царскосельская.

Показатель	SNP	Локализация	Ген-кандидат	ID гена
Живая масса*	rs15204278	Intron variant	<b>CLSPN</b>	ENSGALG00000002346
Тушка без крови	rs15204278	Intron variant	<b>CLSPN</b>	ENSGALG00000002346
Товарная тушка	rs15204278	Intron variant	<b>CLSPN</b>	ENSGALG00000002346
Тушка без пера*	rs15204278	Intron variant	<b>CLSPN</b>	ENSGALG00000002346

[\*] – выделены SNP, которые относятся к SUGGESTIVE.

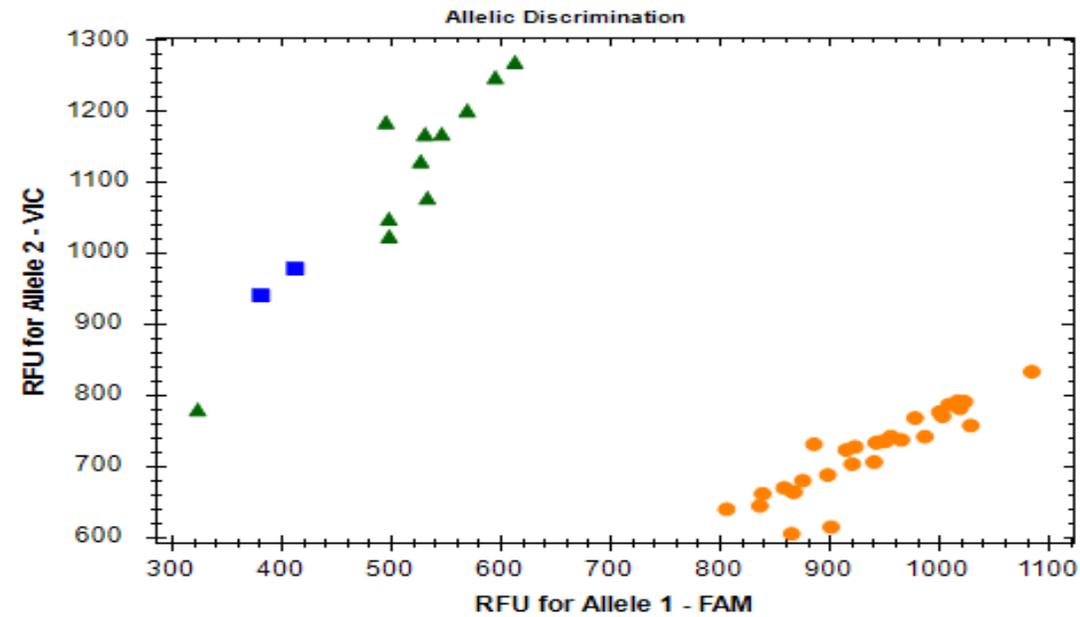
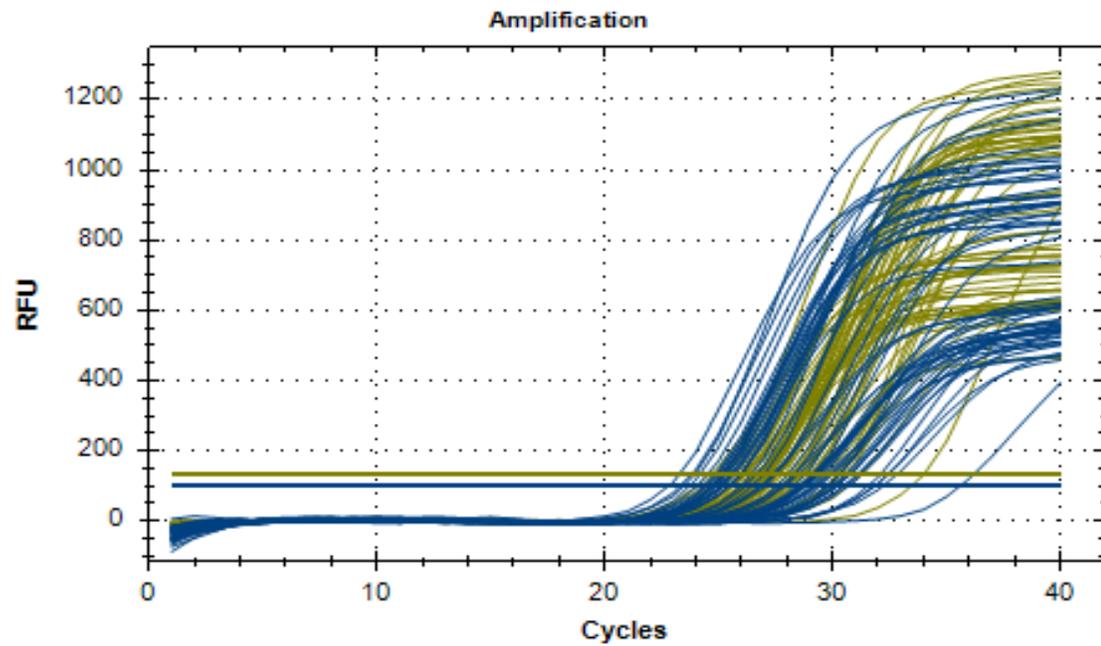


Таблица 2 – Ассоциация 15204278 гена CLASPN признаком масса птицы кур породы пушкинская

Признак	Генотип	Количество особей	Среднее значение массы $\pm$ ошибка среднего (гр)	Медиана	Стандартное отклонение	Эффект замещения аллелей (г.)	P
Масса птицы Dunn's Method P = 0,011	AG	65	1468,738 $\pm$ 26,637	1299,000	214,753	AG-AA 166 г.	<0,01
	AA	38	1302,605 $\pm$ 20,538	1360,000	126,604	AA-GG	
	GG	58	1367,534 $\pm$ 18,671	1414,000	142,193	AG-GG 115 г.	0,054



## 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 GOS2

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

Анализ распределения частот генотипов по замене rs317858728, rs29005090 гена GOS2 и rs15204278 гена CLASPN у кур породы царскосельская

	генотип	n	частота генотипов	частота аллелей	
<b>rs29005090 гена GOS2</b>					
порода царскосельская	AA	21	0,253	A	84 (0,506)
n=83	AG	42	0,5	G	82 (0,49)
	GG	20	0,24		
<b>rs317858728 гена GOS2</b>					
порода царскосельская	AA	8	0,096	A	57 (0,344)
n=83	AG	41	0,493	G	109 (0,656)
	GG	34	0,409		
<b>15204278 гена CLASPN</b>					
порода царскосельская	AA	38	0,234	A	141 (0, 437)
n = 161	AG	65	0,404	G	181 (0,563)
	GG	58	0,360		

Ассоциация rs29005090 гена G0S2 с признаками масса птицы и масса абдоминального жира кур породы царскосельская

Признак	Гено тип	Количество особей	Среднее значение массы±ошибка среднего (гр)	Медиана	Стандартное отклонение	Эффект замещения аллелей (гр.)	P
Масса птицы	AG	39	2833±73,4	2739	458,3	AG-AA	0,83
	AA	21	2757±56,8	2786	260,3	AA-GG 524,1 гр.	< 0,01
	GG	20	3281,2±138,6	3424	106,1	AG-GG 591,1 гр.	< 0,01
Масса абдоминального жира.	AG	42	138,2±14,6	132	88,62	AG-AA 41,56 гр.	0,024
	AA	21	179,76±14	166,7	64,4	AA-GG 92,3гр.	<0,001
	GG	20	87,468±23,2	57,3	106,3	AG-GG 50,74 гр.	0,005

Ассоциация rs317858728 гена G0S2 с признаками масса птицы и масса абдоминального жира кур породы царскосельская

Признак	генотип	Количество особей	Среднее значение массы(гр)	Медиана	Стандартное отклонение	Эффект замещения аллелей (гр.)	P
Масса птицы	AG	39	2927,9±101,3	2786	477,7	AG-AA	0,230
	AA	7	3161±146,5	3049	387,7	AA-GG 284 гр.	0,067
	GG	33	2877,6±97,4	2688	559,6	AG-GG	0,32
Масса абдоминального жира.	AG	41	165,8±17,1	141,5	109,4	AG-AA	0,17
	AA	8	109,6±29,7	109,6	84,1	AA-GG 4,95	0,061
	GG	34	114,6±12,4	116,6	72,3	AG-GG	0,89

## Заключение.

- В результате проведенных исследований был секвенирован наиболее протяженный и информативный регуляторный участок гена G0S2. Выявлено семь вариантов генетического полиморфизма (SNP), разработаны тест-системы для семи полиморфных локусов. Проведены расчеты встречаемости в анализируемых породах царскосельской rs 2900509, rs317858728 гена G0S2 и 15204278 гена CLASPN
- Выявлен достоверный эффект замещения аллелей AA-GG мононуклеотидной замены 15204278 гена CLASPN с признаками масса птицы кур породы царскосельская.
- Выявлен близкий к достоверному эффект замещения аллелей AA-GG мононуклеотидной замены rs317858728 гена G0S2 с признаками масса птицы и масса абдоминального жира кур породы царскосельская.
- Выявлена достоверная ассоциация rs29005090 гена G0S2 с признаками масса птицы и масса абдоминального жира кур породы царскосельская. Наибольший вес тела и абдоминального жира наблюдался у кур с генотипом GG. Данная замена относится к мажорным, поскольку эффект замещения аллелей составляет более 0,6–1,5 сигмы.
- Мононуклеотидная замена GG rs29005090 может быть рекомендована для селекции с помощью маркеров для увеличения привесов птицы и уменьшения абдоминального жира тушки курицы в мясном птицеводстве.

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!

