

УДК 636.2.034:636.2.082.2

ПОЛИМОРФИЗМ ПО ГЕНАМ СОМАТОТРОПИНА, ПРОЛАКТИНА, ЛЕПТИНА, ТИРЕОГЛОБУЛИНА БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

© 2012 г. С.В. Тюлькин^{1,2}, Т.М. Ахметов¹, Э.Ф. Валиуллина^{1,2}, Р.Р. Вафин³

¹ ФГОУ ВПО Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, Казань, Республика Татарстан, Россия, e-mail: tulsv@mail.ru;

² ФГБУ Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория, Казань, Республика Татарстан;

³ ГНУ Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХН, Казань, Республика Татарстан, Россия

Поступила в редакцию 15 ноября 2011 г. Принята к публикации 26 декабря 2011 г.

Целью данной работы было изучение полиморфизма генов соматотропина (*GH*), пролактина (*PRL*), лептина (*LEP*), тиреоглобулина (*TG*) у чистопородных и помесных по голштинской породе быков-производителей. Полученные нами результаты соответствуют литературным данным, опубликованным ранее, при этом частота встречаемости аллелей у быков-производителей составила: L – 0,86 и V – 0,14 по гену *GH*; A – 0,87 и B – 0,13 по гену *PRL*; C – 0,59 и T – 0,41 по гену *LEP*; C – 0,81 и T – 0,19 по гену *TG*.

Ключевые слова: бык-производитель, полиморфизм, ПЦР, ДНК, генотип, ген, соматотропин, пролактин, лептин, тиреоглобулин.

ВВЕДЕНИЕ

Достижения современной молекулярной генетики позволяют исследовать гены, связанные с хозяйственно полезными признаками сельскохозяйственных животных. Определение аллельных вариантов генов позволит дополнительно к традиционному отбору животных проводить селекцию непосредственно на уровне ДНК. Преимущество ДНК-анализа заключается в том, что можно определить генотип животного независимо от пола, возраста и физиологического состояния, что является важным фактором в селекционной работе.

В качестве потенциальных маркеров молочной и мясной продуктивности крупного рогатого скота могут рассматриваться аллели генов соматотропина (*GH*), пролактина (*PRL*), лептина (*LEP*), тиреоглобулина (*TG*).

Это подтверждается данными многих исследований (De *et al.*, 2004; Хабибрахманова, 2009). Так, наибольший удой, выход молочного жира и белка отмечен у коров холмогорской и

черно-пестрой пород с генотипами *VV* гена *GH* и *BB* гена *PRL*, при этом животные холмогорской породы с генотипами *LL* (*GH*) и *AB* (*PRL*) отличались наибольшим содержанием белка в молоке (Хабибрахманова, 2009).

Аллельный полиморфизм генов *GH*, *LEP*, *TG* влияет на качество мяса, а также на толщину жировой прослойки между волокнами мышечной ткани у крупного рогатого скота (De *et al.*, 2004).

Все выше сказанное говорит о важности изучения полиморфизма генов *GH*, *PRL*, *LEP*, *TG* у крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в племенном хозяйстве «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан. Для проведения ДНК-диагностики по генам *GH*, *PRL*, *LEP*, *TG* у 70 чистопородных и помесных по голштинской породе быков-производителей отобраны пробы крови.

Кровь, полученную из яремной вены животных, вносили в пробирки с 100 мМ ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ.

ДНК из крови выделяли комбинированным щелочным способом. 100 мкл крови смешивали с 1 мл дистиллированной воды и центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а к осадку добавляли 50 мкл 0,2 М NaOH и **тщательно встряхивали** смесь на вортексе при комнатной температуре до просветления суспензии. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 60 °С в течение 10 мин. К лизату добавляли равный объем (50 мкл) 1 М Трис-НСl (рН = 8,0) и **тщательно** встряхивали смесь на вортексе при комнатной температуре. К полученному гомогенату добавляли 500 мкл 96 %-го этанола и выдерживали полученную смесь при –20 °С в течение 30 мин. Нуклеопротеидный комплекс осаждали центрифугированием при 12 тыс. об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок высушивали при 60 °С в течение 12 мин с открытой пробиркой. К высушенному осадку добавляли 100 мкл 10 %-го аммиака, **тщательно встряхивали** смесь на вортексе при комнатной температуре и выдерживали в термостате при 60 °С в течение 10 мин, затем повторно встряхивали на вортексе и выдерживали в термостате при 60 °С в течение 10 мин. Полученный гомогенат выдерживали в термостате при 95 °С в течение 15 мин с открытой пробиркой.

Генотипирование быков по генам *GH*, *PRL*, *TG*, *LEP* проводили методом ПЦР-ПДРФ и АС-ПЦР соответственно. ПЦР проводили на программируемом термоциклере «Терцик» (Россия) в объеме 20 мкл, содержащем буфер (60 мМ трис-НСl (рН 8,5), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ меркаптоэтанол; 0,1 мМ тритон X-100), 0,25 мМ dNTP, 0,2 мкл Taq ДНК полимеразы, праймеры: по 0,5 мкМ (*GH5F* и *GH5R*), (*PRL1* и *PRL2*), (*TG5-F* и *TG5-R*), по 0,25 мкМ (*LEP-F1* и *LEP-R1*), по 1 мкМ (*LEP-F2* и *LEP-R2*) и 1 мкл ДНК-пробы.

Для амплификации фрагментов генов *GH*, *PRL*, *LEP*, *TG* использовали следующие праймеры:

GH5F: 5'-GCT-GCT-CCT-GAG-GGC-CCT-TC-3',

GH5R: 5'-CAT-GAC-CCT-CAG-GTA-CGT-CTC-CG-3' (Gordon *et al.*, 1983);

PRL1: 5'-CGA-GTC-CTT-ATG-AGC-TTG-ATT-CTT-3',

PRL2: 5'-GCC-TTC-CAG-AAG-TCG-TTT-GTT-TTC-3' (Dybus *et al.*, 2005);

LEP-F1: 5'-GAC-GAT-GTG-CCA-CGT-GTG-GTT-TCT-TCT-GT-3',

LEP-R1: 5'-CGG-TTC-TAC-CTC-GTC-TCC-CAG-TCC-CTC-C-3',

LEP-F2: 5'-TGT-CTT-ACG-TGG-AGG-CTG-TGC-CCA-GCT-3',

LEP-R2: 5'-AGG-GTT-TTG-GTG-TCA-TCC-TGG-ACC-TTT-CG-3' (Corva *et al.*, 2009);

TG5-F: 5'-GGG-GAT-GAC-TAC-GAG-TAT-GAC-TG-3',

TG5-R: 5'-GTG-AAA-ATC-TTG-TGG-AGG-CTG-TA-3' (De *et al.*, 2004).

Амплификаты генов *GH*, *PRL* и *TG* расщепляли эндонуклеазами: *GH* – *AluI*, *PRL* – *RsaI*, *TG* – *BstX2I*.

Для визуализации фрагментов ДНК пробы вносили в лунки 2,5–4,0 % агарозного геля с содержанием этидия бромид (0,5 мкг/мл) и проводили горизонтальный электрофорез при 15 В/см в течение 40 мин в 1 × ТБЕ буфере. После электрофореза гель просматривали в УФ-трансиллюминаторе при длине волны 310 нм. Идентификацию генотипов определяли по количественным и качественным признакам.

В работе наряду с экспериментальными материалами использовались данные зоотехнического и племенного учета этого хозяйства, т. е. племенные карточки (форма 1-МОЛ), а также каталоги и племенные свидетельства быков-производителей.

Частоту встречаемости генотипов определяли по формуле:

$$p = n/N,$$

где p – частота определения генотипа, n – количество особей, имеющих определенный генотип, N – число особей.

Частоту отдельных аллелей определяли по формуле:

$$P_A = (2nAA + nAB) : 2N,$$

$$q_B = (2nBB + nAB) : 2N,$$

где P_A – частота аллеля А, q_B – частота аллеля В, N – общее число аллелей.

По закону Харди–Вайнберга (Жигачев и др., 1985) рассчитывали ожидаемые результаты частот генотипов в исследуемой популяции.

Полученные результаты в ходе научных исследований обработаны биометрическим методом (Меркурьева, 1970). Уровень достоверности полученных результатов определяли по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ДНК-диагностики быков-производителей по локусу гена *GH* выявилось, что из 70 быков 50 (71,4 %) имели генотип *LL*; 20 (28,6 %) – *VL* и не обнаружилось ни одного животного с генотипом *VV*. При этом частота аллеля *L* составила 0,86, а аллеля *V* – 0,14 (табл.).

Анализ быков-производителей по локусу гена *PRL* показал, что из 70 быков 53 (75,7 %) имели генотип *AA*; 16 (22,9 %) – *AB* и 1 (1,4 %) – *BB*. При этом частота аллеля *A* составила 0,87, а аллеля *B* – 0,13.

Исследования быков-производителей по гену *LEP* показали следующие результаты:

так, у 70 быков распределение генотипов было следующим: *CC* – 23 (32,9 %), *CT* – 37 (52,8 %) и *TT* – 10 (14,3 %). При этом частота аллелей *C* и *T* соответственно составила 0,59 и 0,41.

Среди исследованных 70 быков-производителей по гену *TG* распределение генотипов было следующим: *CC* – 44 (62,9 %), *CT* – 25 (35,7 %) и всего 1 (1,4 %) бык с генотипом *TT*. Частота аллеля *C* была на уровне 0,81, тогда как аллеля *T* – 0,19.

Определению полиморфизма гена *GH* у крупного рогатого скота посвящен ряд исследований (Lee *et al.*, 1996; Хабибрахманова, 2009). Частота встречаемости аллеля *L* гена *GH* у разных пород крупного рогатого скота варьирует в пределах от 0,520 до 0,867. Причем в таких породах, как черно-пестрая, холмогорская, ярославская, симментальская, частота аллеля *V* ниже, чем в голштинской. Полученные нами результаты соответствуют опубликованным данным и находятся на верхней границе диапазона исследуемого показателя, т. е. частота встречаемости аллеля *L* в стаде чистопородных и помесных по голштинской породе быков-производителей составила 0,86.

Частота встречаемости аллеля *A* гена *PRL* в стадах крупного рогатого скота черно-пестрой, джерсейской, холмогорской, ярославской, симментальской пород составила 0,3081–0,8533 (Dybus *et al.*, 2005; Хабибрахманова, 2009). Более высокая частота встречаемости аллеля *A* гена *PRL* отмечалась среди коров черно-пестрой породы 0,8533, при этом наименьшая частота аллеля *A* была у животных джерсейской породы – 0,3081 (Dybus *et al.*, 2005). В проведенных нами исследованиях частота встречаемости аллелей *A* и *B* гена *PRL* среди чистопородных и помесных по голштинской породе быков-производителей составила соответственно 0,87 и 0,13.

Изучение полиморфизма гена *LEP* показало, что в вагью × лимузинской (De *et al.*, 2004), англусской, шароле, герфордской, симментальской породах (Buchanan *et al.*, 2002) крупного рогатого скота частота аллеля *C* составила 0,42–0,68, частота аллеля *T* соответственно 0,32–0,58. Причем наибольшая частота аллеля *C* отмечена среди животных пород вагью × лимузинской (0,68), симментальской (0,68) и шароле (0,66), тогда как наименьшая частота аллеля *C* была у особей англусской породы (0,42). В наших исследованиях

Таблица
Полиморфизм генов *GH*, *PRL*, *LEP*, *TG*
у быков-производителей

Генотип	<i>n</i>	Частота генотипов, %		Частота аллелей	χ^2
		наблюдаемая	ожидаемая		
Генотип по гену <i>GH</i>					
<i>LL</i>	50	71,4	74,3	<i>L</i> -0,86 <i>V</i> -0,14	1,61
<i>VL</i>	20	28,6	24,3		
<i>VV</i>	0	0	1,4		
Генотип по гену <i>PRL</i>					
<i>AA</i>	53	75,7	75,7	<i>A</i> -0,87 <i>B</i> -0,13	0
<i>AB</i>	16	22,9	22,9		
<i>BB</i>	1	1,4	1,4		
Генотип по гену <i>LEP</i>					
<i>CC</i>	23	32,9	34,3	<i>C</i> -0,59 <i>T</i> -0,41	0,64
<i>CT</i>	37	52,8	48,6		
<i>TT</i>	10	14,3	17,1		
Генотип по гену <i>TG</i>					
<i>CC</i>	44	62,9	65,7	<i>C</i> -0,81 <i>T</i> -0,19	1,0
<i>CT</i>	25	35,7	31,4		
<i>TT</i>	1	1,4	2,9		

частота аллелей *C* и *T* гена *LEP* была средней и составила соответственно 0,59 и 0,41.

Изучение аллельного полиморфизма гена *TG* показало, что в стаде помесного вагью × лимузинских скота частота аллеля *C* составила 0,61, аллеля *T* – 0,39 (De *et al.*, 2004). Среди помесей чешских пестрых × черно-пестрых голштинских и красно-пестрых голштинских животных частота аллеля *C* составила 0,77, аллеля *T* – 0,23 (Kaplanová *et al.*, 2009). Схожие результаты получены в исследованиях E. Casas с соавт. (2007) крупного рогатого скота герефордской, ангусской, норвежской красной, шведской красной и белой, фризской и вагью пород, где частота аллеля *C* составила 0,69–0,80 и аллеля *T* – 0,20–0,31.

Аналогичные результаты получены и в наших исследованиях. Так, частота аллелей *C* и *T* гена *TG* среди чистопородных и помесных по голштинской породе быков-производителей составила соответственно 0,81 и 0,19.

Таким образом, исследования показали, что у чистопородных и помесных по голштинской породе быков-производителей в ГУП головном племенном предприятии «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан преобладал аллель *L* и генотип *LL* гена *GH*, аллель *A* и генотип *AA* гена *PRL*, аллель *C* и генотип *CT* по гену *LEP*, а также аллель *C* и генотип *CC* гена *TG*. При этом частота аллеля *L* гена *GH*, аллеля *A* гена *PRL* и аллеля *C* гена *TG* находилась на верхней границе, а аллеля *C* гена *LEP* на среднем уровне аналогичных показателей литературных данных.

ЛИТЕРАТУРА

- Жигачев А.И., Петухов В.Л., Назарова Г.А. Ветеринарная генетика. М.: Колос, 1985. 369 с.
- Меркурьева Е.К. Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных. М.: Колос, 1970. 424 с.
- Хабибрахманова Я.А. Полиморфизм генов молочных белков и гормонов крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. ВНИИплем. Лесные Поляны Московской обл., 2009. 19 с.
- Buchanan F.C., Futzsimmons C.J., Van Kessel A.G. *et al.* Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels // Genet. Sel. Evol. 2002. V. 34. P. 105–116.
- Casas E., White S.N., Shackelford S.D. *et al.* Assessing the association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass traits in beef cattle // Anim. Sci. 2007. V. 85. P. 2807–2814.
- Corva P.M., Macedo G.V.F., Soria L.A. *et al.* Effect of leptin gene polymorphisms on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers // Genet. Mol. Res. 2009. V. 8. No. 1. P. 105–116.
- De S., MacNeil M.D., Wu X.L. *et al.* Detection of quantitative trait loci for marbling and backfat in wagyu × limousin F₂ crosses using a candidate gene approach // Amer. Soc. Anim. Sci. 2004. V. 55. P. 95–98.
- Dybus A., Grzesiak W., Kamieniecki H. *et al.* Association of genetic variants of bovine prolactin with milk production traits of Black-and-White and Jersey cattle // Arch. Tierz. 2005. V. 48. No. 2. P. 149–156.
- Gordon D.F., Quick D.P., Erwin C.R. *et al.* Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene // Mol. Cell. Endocrinol. 1983. V. 33. P. 81–95.
- Kaplanová K., Dvořák J., Urban T. Association of single nucleotide polymorphisms in *TG*, *LEP* and *TFAM* genes with carcass traits in cross-breed cattle // MendelNet Agro. 2009. P. 139.
- Lee B.K., Lin G.F., Crooker B.A. *et al.* Association of somatotropin (*bst*) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows // Domestic Anim. Endocrinol. 1996. V. 13. No. 4. P. 373–381.

**POLYMORPHISM OF GENES FOR SOMATOTROPIN, PROLACTIN,
LEPTIN, AND THYROGLOBULIN IN STUD BULLS**

S.V. Tjulkin^{1,2}, T.M. Ahmetov¹, E.F. Valiullina^{1,2}, R.R. Vafin³

¹ Bauman Kazan State Academy of Veterinary Medicine, e-mail: tulsv@mail.ru;

² Tatar Interregional Veterinary Laboratory;

³ Tatar Agriculture Research Institute, Russian Academy of Agricultural Sciences

Summary

We have studied the polymorphism of genes for somatotropin (GH), prolactin (PRL), leptin (LEP), and thyroglobulin (TG) in thoroughbred and hybrid Holstein stud bulls. Our results are in agreement with data from the literature. The frequencies of alleles in the bulls examined are: L = 0.86 and V = 0.14 in GH, A = 0.87 and B = 0.13 in PRL, C = 0.59 and T = 0.41 in LEP, C = 0.81 and T = 0.19 in TG.

Key words: stud bull, polymorphism, PCR, DNA, genotype, gene, somatotropin, prolactin, leptin, thyroglobulin.