

МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА ТА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ

БЕЛАЯ Е. В., МИХАЙЛОВА М.Е., ВОЛЧОК Н.М., КАМЫШ Н.А.

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
Республика Беларусь, 220027, г. Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: L.Belaya@jgc.bas-net.by

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА ГОРМОНА РОСТА, АССОЦИИРОВАННОГО С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ И ДНК-ДИАГНОСТИКА МУТАЦИИ VLAD В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ КРС

В условиях современной селекции, особую актуальность приобретают, как вопросы комплексной оценки генотипов и генофонда стад в целом, так и контроль за распространением скрытых генетических аномалий в популяциях сельскохозяйственных животных. Новейшее направление в селекции, а именно, маркер-сопутствующая селекция (MAS – marker assisted selection)» позволяет наряду с отбором по фенотипу вести селекцию по выявлению предпочтительных вариантов генов хозяйственно-полезных признаков животных.

Примером такого гена-маркера является ген, протяженностью примерно 1800 пар оснований, состоящий из пяти экзонов, ассоциированный с участком хромосомы 19q26-qter и отвечающий за синтез структурного белка гормона роста GH. Известно, что ген гормона роста (GH), контролирует уровень метаболизма белков, связанных с мясной и молочной продуктивностью крупного рогатого скота. Продукт его экспрессии — гормон роста является представителем семейства белковых гормонов, участвующих в инициации и поддержании лактации у млекопитающих. Пептид состоит из 190-191 аминокислот.

В гене GH было идентифицировано несколько различных мутаций [1]. Но влияние на продуктивные признаки было наиболее изучено для одной из них, описанной Lусу и соавт. [2], находящейся в пятом экзоне. Данная мутация представляет собой C→G трансверсию в нуклеотидной последовательности 2141, приводящую к замене аминокислоты лейцин (L) на валин (V) в 127 позиции полипептида. Этот одиночный нуклеотидный полиморфизм приводит к двум аллелям: L-GHI и V-GHI.

Данные по влиянию V-аллеля на фенотипическое проявление количественных признаков продуктивности различны и в некоторых случаях противоречивы Zwerzchowski et. al.[3], Pawar. et. al.[4].

С точки зрения контроля за распространением наследственных заболеваний, пристальное внимание вызывает такое наследственное заболевание, как VLAD (бычий дефицит лейкоцитарной адгезии) — синдром, встречающийся в породах черно-пестрого корня благодаря широкому использованию выдающегося голштинского быка Осборндейла Айвенго, имевшего эту мутацию в скрытом виде.

Молекулярной основой VLAD является точечная замена (аденин-гуанин) в положении 383 кДНК CD18 (VLAD), что приводит к аминокислотной замене в последовательности соответствующей белковой молекулы гликопротеида В-интегрин и потере данным белком способности к участию в формировании иммунного ответа. Следствием этого является гибель гомозиготных по данному признаку животных в первые недели постнатального периода развития от различных инфекций.

Целью нашего исследования было:

— выяснить влияние полиморфных вариантов гена гормона роста GH-I на такие признаки, как общий удой молока за 305 суток, содержание жира и белка в молоке в % у КРС и проанализировать частоту предпочтительных генотипов для выявления наиболее перспективных из них для маркер-сопутствующей селекции у представителей разных линий белорусской популяции.

— проанализировать частоту встречаемости мутации BLAD у представителей этих линий для предотвращения дальнейшего распространения мутации в популяции крупного рогатого скота в Беларуси.

Материалы и методы

Объектом исследования были быки-производители Госплемпредприятий Гомельской, Витебской и Минской областей Республики Беларусь. ДНК из образцов свежзамороженной спермы выделяли методом солевой экстракции.

ДНК-типирование полиморфных вариантов гена гормона роста *GH1* проводили методом амплификации с дальнейшим анализом полиморфизма длин рестриктных фрагментов. Для амплификации использовали праймеры:

G-GH S: 3- ttc ggc ctc tct gtc tct ccc t-5 G-GH R: 3-agg cgg cgg cac ttc atg ac-5

Длина амплифицированного фрагмента составляет 208 пн. Рестрикция проводилась с использованием рестриктазы *Alu I*. Продукты рестрикции разделяли в 2% агарозном геле. Результаты генотипирования хорошо видны на электрофореграмме (Рис.1а).

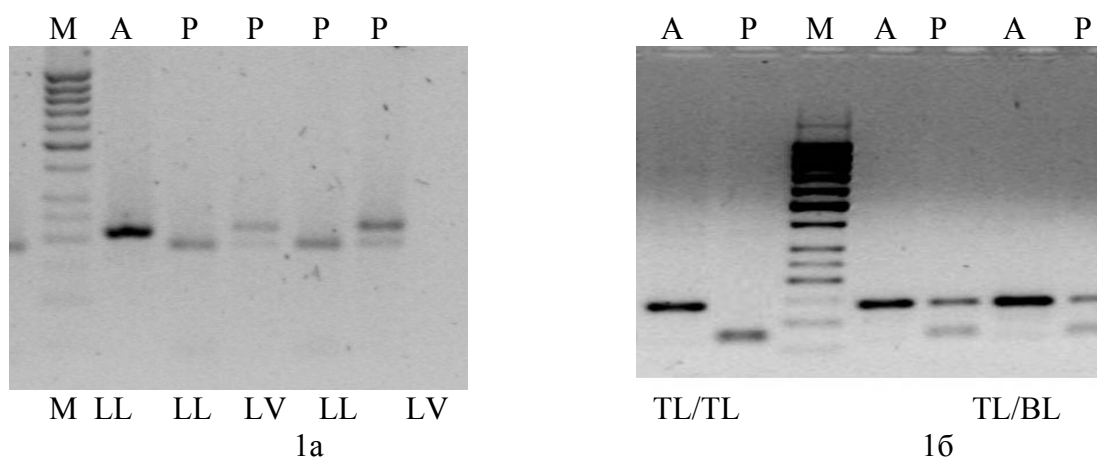


Рисунок 1 — Электрофореграммы результатов генотипирования.

1а. Электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции локусов гормона роста (*GH1*) в 2% агарозном геле. Условные обозначения: маркер 50 br DNA Lader (Fermentas); А–продукты амплификации, Р–продукты рестрикции, VV-, LV-, LL – генотипы.

1б. электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции в 2% агарозном геле по гену *CD18* (BLAD). Условные обозначения: маркер 50 br DNA Lader (Fermentas); А–продукты амплификации, Р–продукты рестрикции, – TL/TL , TL/BL генотипы.

Для амплификации фрагмента гена *CD18* (BLAD) использовали праймеры [5]:

BL-1: 5'- tga gac cag gtc agg cat tgc gtt ca-3', BL-2: 5'-ccc cca gct tct tga cgt tga cga cga ggt-3.

Длина амплифицированного фрагмента составляет 132 пн. В норме он расщепляется рестриктазой *TagI* на два фрагмента длиной 71 и 61 пн. (гомозиготный генотип TL/TL). Мутация, в данном случае, сопровождается исчезновением сайта узнавания для рестриктазы, и на электрофореграмме визуализируется одна яркая полоса длиной 132 пн, (гомозиготный генотип BL/BL). У особи с гетерозиготным генотипом TL/BL присутствуют два аллеля — нормальный (N аллель) и мутантный (B аллель) и на электрофореграмме гетерозигота TL/BL имеет три полосы длиной 132, 71 и 61 пн (Рис. 1 б).

Для выяснения ассоциации полиморфных вариантов гена *GH-1* с продуктивными признаками КРС, нами были определены генотипы животных, проведена теоретическая оценка животных по данным признакам на основании племенных карт. Теоретическая оценка представляла собой математический расчет племенной ценности по женским линиям предков по трем показателям: «Общий удой за 305 сут.» (в дальнейшем удой), «Содержание жира в молоке», «Содержание белка в молоке». Для этого, на основании

информации, содержащейся в племенных картах животных, средний показатель данного признака в пределах линий рассчитывался по формуле:

$$\text{СПЖ} = (2\text{М} + \text{ММ} + \text{МО} + \text{МММ} + \text{МММ} + \text{МММ} + \text{МММ}) / 8$$

Полученные результаты были проанализированы и сопоставлены. Достоверность полученных результатов была проверена с помощью статистических методов оценки достоверности.

Результаты и обсуждение

Нами были определены генотипы 181 животного, линий Аннас Адема (Ан. Ад), Вис Айдиала 933122 (В.Айд), Монтвик Чифтейна 95679 (Мон. Чиф), Пабст Говернера 882933 (П. Говернера), Рефлексн Соверинга 198998 (Р. Сов.), Рутьес Эдуарда 31646 (Рут. Эд.), Силинг Трайджун Рокит 252803 (С. Т. Р.), Хильтьес Адема 37910 (Хил.Ад.).

Методом ДНК-типирования было выявлено 130 животных с генотипом LL, 43 LV и 8 VV (табл. 1).

Таблица 1

Связь аллельных вариантов гена *GH1* с молочной продуктивностью (удой молока) крупного рогатого скота голштинского и черно-пестрого корня

| Линия / порода | Выборка, (n) | удой за 305 сут. | Частота генотипа <i>GH1</i> (%) | | | Частота аллелей <i>GH1</i> (%) | | |
|-----------------|--------------|------------------|---------------------------------|-------|-------|--------------------------------|-------|-------|
| | | | n LL | n LV | n VV | %L | %V | |
| Ан. Ад. 30587 | 8 | 8202,37 | 87,5 | 0 | 12,5 | 87,5 | 12,5 | |
| В.Айд | голшт | 13 | 11951,97 | 76,9 | 23,1 | 0 | 88,46 | 11,53 |
| | ч.-п. | 26 | 9414,81 | 57,7 | 38,46 | 3,84 | 76,92 | 23,07 |
| Мон. Чиф | голшт | 4 | 11092,78 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| | ч.-п. | 37 | 9731,43 | 70,27 | 29,73 | 0 | 85,13 | 14,86 |
| П. Говернера | 16 | 9014,05 | 62,5 | 37,5 | 0 | 81,25 | 18,75 | |
| Р. Сов. | голшт | 12 | 12008,15 | 83,3 | 16,7 | 0 | 91,66 | 8,33 |
| | ч.-п. | 34 | 9968,45 | 82,35 | 17,65 | 0 | 91,17 | 8,8 |
| Рут. Эд. 31646 | 10 | 8059,32 | 50 | 20 | 30 | 60 | 40 | |
| С. Т. Р. 252803 | 11 | 8366,88 | 72,72 | 18,18 | 9,1 | 81,81 | 18,18 | |
| Хил.Ад.37910 | 10 | 8424,73 | 70 | 10 | 20 | 75 | 25 | |

Для каждой группы генотипов было рассчитано среднее значение таких показателей, как «Удой», «Содержание жира в молоке», «Содержание белка в молоке». Было определено, что статистически достоверными являются различия в показателях общего удоя между генотипом VV и генотипами LL и LV. Причем, различия генотипов LL и LV между собой, статистически не достоверны. Статистически достоверных различий между генотипами LL, LV и VV по показателям содержания в молоке жира и общего белка выявлено не было.

Для межлинейного анализа средние значения удоя были рассчитаны отдельно для представителей каждой породы в пределах этих линий (табл.1) и сопоставлены с данными по среднему показателю удоя для каждой линии. Отмечено, что наибольший показатель удоя определен для линий, у которых низкая частота аллеля V. Причем, линии, представленные животными голштинского и черно-пестрого корня при совокупном и раздельном анализе показывают самые высокие показатели по удою, так же как и линии голштинского корня. В линиях черно-пестрой породы показатели по удою молока более низкие.

ДНК-диагностика популяции быков-производителей выявил троих носителей мутации VLAD. Все они являются представителями линии Монтвик Чифтейна, что несомненно следует учитывать при закреплении этих животных за селекционным стадом.

Выводы

Полиморфные варианты гена гормона роста *GH-1* статистически достоверно влияют на общий удой молока за 305 суток. Наиболее высокий показатель по данному признаку демонстрируют животные с генотипами LL и LV. Присутствие аллеля V в генотипе в гомозиготном состоянии снижает показатель общего удоя молока. Достоверных различий по данному параметру между обладателями генотипов LL и LV не выявлено, что позволяет предположить его рецессивный характер по отношению к L аллели. Наши данные согласуются с таковыми Renek P., Kmet I et.al. [6], Przadec J et.al. [7], Sirotkin A.V. et.al. [8] и др.

Из исследованных селекционных линий КРС, наиболее низкая частота нежелательного аллеля V и самые высокие показатели общего удоя характерны для линий голштинского корня Рефлекшн Соверинга 198998, Монтвик Чифтейна 95679 и Вис Айдиала 933122. Из линий черно-пестрого корня несомненное лидерство принадлежит линии Рефлекшн Соверинга 198998, затем можно выделить линии Аннас Адема, Пабст Говернера 882933 и Силинг Трайджун Рокит 252803.

Наличие носителей мутации BLAD среди представителей линии Монтвик Чифтейна 95679 должно быть учтено при разработке схем скрещиваний для предотвращения дальнейшего распространения мутации в популяции.

Литература

- 1 *Jianbo Yao, Samuel E. Aggrey, David Zadworny, J. Flan Hayes and Urs Kuhnlein* Sequence Variations in the Bovine Growth Hormone Gene Characterized by Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis and Their Association with Milk Production Traits in Holsteins //Genetics- 2004.-144: 1809-1816.
- 2 *Lucy M.C., Hauser S.D., Eppard P.J., Krivi G.G., Clark J.H., Bauman D.E.,* Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production.// Domestic Animal Endocrinology -1993- 10, 325-333.
- 3 *Zwierzchowski L., Dymnis E., Dzierzbicki P.,* An association of growth hormone, κ-casein, p-lactoglobulin, leptin and Pit-I loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle. //Animal Science Papers and Reports- 2001 -19, 65-78.
- 4 *Pawar R. S. Joshi C. G., Rank D. N.,* Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle.//Indian Journal of Animal Sciences 2007-11 (9): 884--888, September.
- 5 *Anderson, D. C, and T. A. Springer.* Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and pi50,95 glycoproteins.//Annu. Rev. Med.1987.-38:175-194.
- 6 *Renek P., Kmet I, Sacowski T., Vasicek T., Huba I, Chrenec I,* Relationships of growth hormone genotype with meat production traits of Slovak Pied bulls.//Czech Journal of Animal Science -1998 - 43, 541-544.
- 7 *Przadec J., Dymniski E., Zierzchowski L., Lukashevich M.,* The effect of growth hormone (GH), κ-casein (CASK) and b-lactoglobulin (BLG) genotype on carcass traits in Friesian bulls. //Animal Science Papers and Reports-1999 - 17, 85-92.
- 8 *Sirotkin A.V., Chrenec P., Makarevich A.V., Bulla J.,* Interrelationships between breed, growth hormone genotype, plasma IGF-I level and meat performance in bulls of different ages.// Archives of Animal Breeding-2000 - 43, 591-596.

Резюме

Изучена ассоциация полиморфных вариантов гена гормона роста *GHI* с признаками молочной продуктивности КРС. Показана ассоциация генотипа с показателями общего удоя. Определена частота L и V аллелей гена *GHI*, а так же частота носительства мутации BLAD в различных линиях голштинского и черно-пестрого КРС в белорусской популяции быков-производителей.

Association of polymorphic variants of growth hormone gene *GHI* with traits of cattle milk productivity was studied. Genotype association with total milk productivity was shown. The frequency of L and V alleles of *GHI* gene as well as the frequency of BLAD mutation was determined in different lines of Holstein and black-and white cattle in Belarusian sires population.

**ЖАРИКОВА Н.В., КОРОБОВ В.В., АНИСИМОВА Л.Г., ЯСАКОВ Т.Р.,
ЖУРЕНКО Е.Ю., МАРКУШЕВА Т.В.**

Институт биологии УНЦ РАН,

Россия, 450054, Уфа, ул. Проспект Октября, 61, e-mail: tvmark@anrb.ru

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НОВОЙ ПЛАЗМИДЫ ДЕГРАДАЦИИ ХЛОРФЕНОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ

Известно, что в биоценозах, подвергающихся длительному воздействию синтетических химических соединений, формируются микроорганизмы, способные использовать молекулы ксенобиотиков в качестве источников питания и энергии. Генетические детерминанты, контролирующие катаболизм таких соединений часто располагаются на автономно реплицирующихся элементах (плазмидах), которые способны передаваться различным членам популяции, обеспечивая перестройку генофонда консорциума в целом. Генетический обмен между организмами может потенциально увеличивать способность популяции к выживанию и адаптации к техногенным факторам окружающей среды (Cohan, 1996).

Плазмиды согласно способности к переносу делятся на конъюгативные (самотрансмиссибельные) и мобилизуемые (трансмиссибельные в присутствии дополнительных конъюгационных факторов). Конъюгативные плазмиды - это, как правило, плазмиды большого размера, несущие набор генов (*tra*), кодирующих систему переноса и специфический сайт *oriT*, с которого начинается трансфер. Проблема переноса неконъюгативных плазмид, не обладающих набором *tra* генов, решается посредством генетических систем мобилизации. Перенос плазмид небольших размеров обеспечивается специфическими белками мобилизации, кодируемыми областью мобилизации (*mob*) и областью начала переноса (*oriT*). Как оказалось, именно мобилизуемые плазмиды имеют огромное значение в процессах поддержания и распространения экофизиологических признаков, в частности, способности к деградации современных ксенобиотиков.

Вместе с тем следует отметить, что анализ разнородности и разнообразия мобилизуемых плазмид проведен в меньшей степени, чем это сделано для конъюгативных плазмид. Поэтому исследования особенностей строения мобилизуемых плазмид, включая области репликации, становятся особенно актуальным. Изучение молекулярных структур мобилизуемых плазмид позволяет раскрыть особенности эволюции и установить филогенетические отношения среди членов различных таксонов штаммов-деструкторов. Привлечение ресурсов современных баз данных для изучения структурных особенностей генов мобилизации позволяет предложить их классификацию в семействах и подсемействах, а описание генетической организации каждого семейства, их характерных черт и отношений среди кодируемых ими белков определяет подход к характеристике глобального генного пула мобилизуемых плазмид.

Материалы и методы

Объектом исследования служила плазида рАН 36-4CPA штамма *Citrobacter hydrophyla* IBRB-36 4CPA, выделенного из образцов почв промзоны г. Уфы.

Плазмидную ДНК выделяли щелочным лизисом по методу Бирнбойма-Доли (Birnboim & Doly, 1979). Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили с