

Полиморфизм соматотропного гормона у локальных пород крупного рогатого скота Украины

С. Б. Зеленый*, И. Л. Лисовский, В. И. Глазко

Институт агроэкологии и биотехнологии УААН
252143 Киев, ул. Метрологическая, 12

Исследован полиморфизм локуса соматотропного гормона некоторых пород крупного рогатого скота Украины (Бурой карпатской и Серой украинской) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выявлены породоспецифические особенности распределения аллельных вариантов С и D локуса соматотропного гормона. Уровень гетерозиготности был во все высоком у локальных пород (Бурой карпатской и Серой украинской) по сравнению с широко распространенной породой черно-пестрых голштинов.

Введение. Соматотропный гормон (СТГ), или гормон роста, является одним из основных стимуляторов пролиферации клеток у животных и человека. Его образование и секреция передней долей гипофиза у млекопитающих регулируется двумя гипоталамическими пептидами — соматолиберином, индуцирующим эти процессы, и соматостатином — ингибирующим их. Кроме того, синтез СТГ в клетках гипофиза активирует инсулин, тиреоидные гормоны и глюкокортикоиды.

Полипептидная цепь СТГ у исследованных видов животных и человека состоит из 189—191 аминокислотного остатка и содержит два дисульфидных мостика. СТГ разных видов животных высококонсервативен. Так, например, СТГ крупного рогатого скота (КРС), лошадей и свиней различается не более чем на 5 % аминокислотных остатков, тогда как в случае СТГ человека подобные различия превышают 30 %. Известен делеционный вариант человеческого СТГ, у которого отсутствует участок между 32-м и 46-м аминокислотными остатками, что приводит к снижению его молекулярной массы с 22 до 20 кДа. Несмотря на это, он идентичен нормальному СТГ по вторичной и третичной структуре отдельных участков и сохраняет биологическую активность. По данным зарубежных авторов, существуют четыре варианта полипептидного полиморфизма соматотропного гормона КРС [1—3]. Эти варианты возникли из замен двух возможных N-терминальных аминокислот (аланин или фенилаланин) и комбинации двух аминокислот в положении 127 цепи бычьего соматотропного полипептида (лейцин или валин). Вариации N-терминальных участков бычьего соматотропного гормона были определены рестрикционным анализом сигнальных пептидов в терминальной области бычьего соматотропного гормона — аланин в позиции 190 и фенилаланин в позиции 191. Нуклеотидные замены, ответственные за вариабельность данного района, пока неизвестны.

*Correspondence address.

В отличие от этого, описаны генетические аллельные варианты, ответственные за полиморфизм молекулы бычьего соматотропина в 127-м положении (лейцин или валин). Это является следствием замены кодона CTG на GTG, т. е. лейцинового кодона на валиновый в гене бычьего СТГ.

При введении молочному скоту рекомбинантных форм бычьего соматотропина молочная продуктивность возрастала у тех коров, в гене СТГ которых в 127-м положении содержался валин по сравнению с коровами, имеющими лейцин в этом положении. То есть выявленный полиморфизм гена бычьего гормона роста ассоциирован с молочной продуктивностью лактирующих коров [3].

В последнее время значительно возрос интерес к исследованию ДНК-полиморфизма генов, кодирующих те или иные белки (соматотропин, лактотропин, каппа-казеин и др.), а также к закономерностям их локализации в различных группах сцепления и их межлокусным взаимодействиям. Нуклеотидные замены могут приводить к различным вариантам полиморфизма ДНК, например, к конформационному полиморфизму. На основании изменчивости ДНК разрабатываются маркерные системы, базирующиеся на конформационном либо рестриктивном выявлении полиморфизма [2, 4].

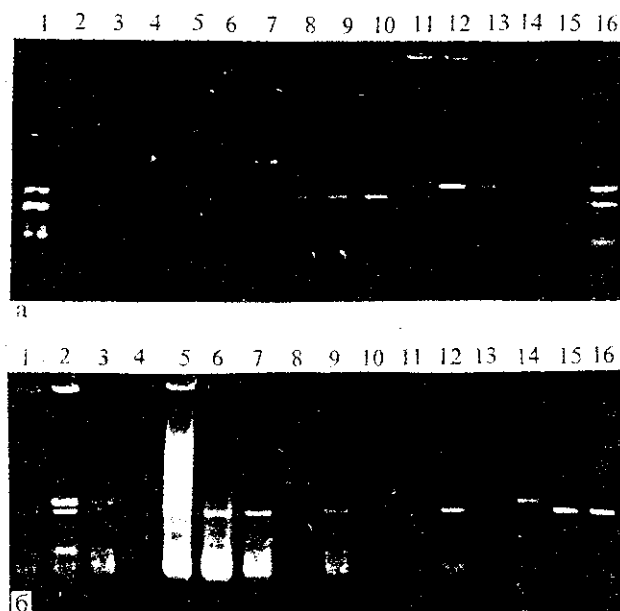
В зарубежной и отечественной литературе все больше внимания уделяется данным, прямо или косвенно связывающим полиморфизм различных структурных генов с изменчивостью продуктивности у крупного рогатого скота. Поэтому настоящая работа направлена на изучение полиморфизма гена соматотропина методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующим рестрикционным анализом продукта амплификации у двух пород крупного рогатого скота, представляющих собой локальные породы Украины и являющихся носителями уникального генофонда — Бурой карпатской и Серой украинской.

Материалы и методы. Образцы крови животных Бурой карпатской и Серой украинской пород получены в одном из хозяйств Веловецкого района. Для анализа отбирали животных, у которых по родословным отсутствовали представители других пород до 4-го поколения. ДНК образцов крови Бурой карпатской и Серой украинской пород выделяли двумя методами, которые обеспечивали достаточно высокую концентрацию и чистоту выделенной ДНК. Первая методика заключалась в выделении и очистке ДНК с использованием перхлората натрия. Для этого лизированные лейкоциты обрабатывали раствором, содержащим 50 мМ перхлорат натрия, pH 7,5, 10 мМ ЭДТА и 10 % DS-Na, и переосажденную 96 %-м этанолом ДНК растворяли в ТЕ-буфере (10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА). Вторая методика состояла в выделении ДНК и ее очистке с помощью смеси фенол—хлороформ. Для этого клетки обрабатывали лизирующим буфером (320 мМ сахараза, 1 %-й Тритон X-100, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-HCl, pH 7,6), осажденные центрифугированием ядра ресуспендировали в буфере (25 мМ ЭДТА, pH 8,0, 75 мМ NaCl) с добавлением протеиназы К (0,1 мг/мл) и обрабатывали смесью фенол:хлороформ (1:1). Осажденную ДНК растворяют в ТЕ-буфере.

ПЦР-анализ. Для анализа полиморфизма гена соматотропина использовали олигонуклеотидные затравки, синтезированные, как описано ранее [5]. 10 × ПЦР-буфер содержал 670 мМ трис-HCl, 160 мМ аммоний сернокислый, 0,1 %-й Твин-20. Хлорид магния добавляли в ПЦР-смесь до конечной концентрации 2 мМ. В работе использовали термостабильную ДНК-полимеразу, выпускаемую фирмой «Бион» (Москва).

Амплификацию осуществляли, как описано в [5], после чего продукты ПЦР переосаждали 96 %-м этанолом и растворяли в бидистиллированной воде. Затем растворенные продукты ПЦР рестрицировали эндонуклеазой *MspI*. Продукты рестрикции разделяли в 2,0 %-м агарозном геле.

Результаты и обсуждение. ПЦР-продукты (891 п. н.), содержащие С-аллели (гомозиготы), имели фрагменты рестрикции размером 526, 193, 109 и 63 пары нуклеотидов (п. н.). ПЦР-продукты, включающие D-аллели (гомозиготы), содержали фрагменты рестрикции длиной 635, 193 и 63 п. н. CD-аллели (гетерозиготы) имели фрагменты рестрикции длиной 635, 526, 193, 109 и 63 п. н. (рисунок).



Распределение генотипов по локусу гормона роста у Бурой карпатской (а) и Серой украинской (б) пород крупного рогатого скота: а (маркеры молекулярной массы *pUC19* + *HaeIII* — дорожка 1; *pUC19* + *Sau3a* — 7; *pUC19* + *AluI* — 16): 2, 3, 6, 8 — 10, 15 — CC; 4, 5, 11, 13, 14 — CD; 12 — DD; б (маркер молекулярной массы *pUC19* + *Sau3a* — дорожка 8): 1, 6, 7, 9 — 13, 15, 16 — CC; 2, 4, 5 — CD; 3, 14 — DD

Породы КРС различной продуктивности, по литературным данным, имеют следующие особенности по частотам встречаемости аллельных вариантов СТГ (С- и D-варианты, связанные с наличием либо отсутствием дополнительного сайта при рестрикции эндонуклеазой *MspI* продукта амплификации). Так, мясная порода герефордов (35 голов) была идентифицирована по аллельному варианту С. Специализированная молочная порода голштинов оказалась полиморфной с относительно высокой частотой встречаемости аллельного варианта D (qD-0.26). Следует отметить, что в наших исследованиях среди 15 голов голштинов, полученных от скрещивания отечественного черно-пестрого скота и импортных (немецких) черно-пестрых голштинов, не удалось выявить полиморфизма по указанному локусу. Все 15 голов были гомозиготами по С-аллели. Это может быть обусловлено либо ограниченным количеством исследованных животных, либо отличиями между описанными в литературе и в настоящей работе продуктивными качествами животных.

Бурая карпатская — локальная порода, высокоадаптированная к разведению в условиях Карпат. В настоящее время численность чистопородных представителей этой породы быстро уменьшается и, очевидно, для разработки методов эффективного сохранения ее уникального генофонда необходимо выявление породоспецифичного распределения аллельных вариантов по разным локусам.

Серая украинская порода представляет собой ветвь самой древней породы — европейского серого скота, который обладает рядом уникальных

фенотипических характеристик (выносливость, устойчивость к ряду заболеваний и др.) и находится в тесных генеалогических взаимосвязях с некоторыми другими породами КРС, разводимыми в Украине, например, с Красной степной, поголовье которой также резко сокращается.

Таким образом, Бурая карпатская и Серая украинская породы являются локальными породами Украины — носителями уникального генофонда, нуждающимися в разработке специальных генетически обоснованных программ по их сохранению. Вкладом в изучение породоспецифических особенностей и являются выполненные нами исследования распределения аллельных вариантов у этих пород по соматотропному гормону.

При скрининге образцов Бурой карпатской и Серой украинской пород КРС частоты встречаемости аллелей распределены следующим образом: соответственно qC — 0,740 и 0,674; qD — 0,260 и 0,326; количество гомозигот составило 57,00 и 69,56 %; гетерозигот — 43,00 и 30,44 %.

Вполне возможно, что относительно высокая частота встречаемости аллеля qD (0,260; 0,326), а также большее количество гетерозигот являются отличительными чертами аборигенных и локальных пород КРС на территории Украины в отличие от коммерческих пород КРС, что может быть использовано для последующих работ по выведению новых высокопродуктивных пород КРС.

С. Б. Зеленый, І. Л. Лісовський, В. І. Глазко

Поліморфізм соматотропного гормону у локальних порід великої рогатої худоби України

Резюме

Досліджено поліморфізм локусу соматотропного гормону деяких порід великої рогатої худоби України (Бурій карпатській та Сірій українській) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Виявлено породоспецифічні особливості розподілу алельних варіантів С і D локусу соматотропного гормону. Рівень гетерозиготності був вищим у локальних порід (Бурій карпатській та Сірій українській) у порівнянні з широко розповсюдженою породою чорно-рябих голштинів.

S. B. Zeleny, I. L. Lysovsky, V. I. Glazko

The cattle somatotropin locus polymorphism in local breeds in Ukraine

Summary

The polymorphism of somatotropin locus with use of PCR in some Ukrainian cattle breeds was investigated. The breed-specific patterns of distribution of C and D allelic variants of somatotropin locus were observed. The level of heterozygosity of somatotropin locus was more high in local breeds (Brown Carpathian, Ukrainian Grey), than in wide used Black and White Holstein.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gordon D. F., Quick C. R., Erwin C. R. et al. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene // *Mol. and Cell. Endocrinol.*—1993.—33.—P. 81.
2. Kirkpatrick B. W., Huff B. M., Casas-Carillo E. Double-strand DNA conformation polymorphisms as a source of highly polymorphic genetic markers // *Animals Genet.*—1993.—24.—P. 155—161.
3. Luci M. C., Hauser S. D., Eppard P. J. et al. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production // *Domestic Animal Endocrinol.*—1993.—10 (4).—P. 325—333.
4. Parks J. S., Abdul-Latif H., Kinoshita E. et al. Genetics of growth hormone gene expression // *Horm. Res.*—1993.—40.—P. 54—61.
5. Zhang H. M., Brown D. R., DeNise S. K., Ax R. L. Polymerase chain reaction — restriction fragment length polymorphism analysis of the bovine somatotropin gene // *J. Anim. Sci.*—1993.—71.—P. 2276.