

УДК 636.52/.58:575.113/.118

*Р.А. КУЛИБАБА, кандидат сільськогосподарських наук, завідувач лабораторією профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики
Інститут тваринництва НААН України*

SacI-поліморфізм гена гормону росту в популяціях кур порід білий плімутрок, борковська барвиста та полтавська глиниста

Вивчено генетичну структуру популяцій курей порід білий плімутрок, бірківська барвиста та полтавська глиниста за локусом гормону росту. За результатами розподілу частот алелів показано відмінності генетичної структури ліній курей різних напрямів продуктивності. Частота алелю А у популяції курей породи білий плімутрок становила 0,03; алелю В – 0,97; у популяції курей породи бірківська барвиста частота алелю А – 0,48; В – 0,52; у популяції курей породи полтавська глиниста частота алелю А – 0,04; В – 0,96. В усіх алелях гену гормону росту (серед вивчених популяцій курей) є один мономорфний сайт рестрикції для SacI, у той час як у алелю А є також додатковий поліморфний сайт.

Полімеразна ланцюгова реакція, рестрикція, кури, поліморфізм, ген гормону росту

На сучасному етапі розвитку генетики птиці все більше розповсюдження набувають молекулярно-генетичні методи досліджень, засновані на полімеразній ланцюговій реакції [7]. Практика вивчення генетичної мінливості, заснована на групах крові та поліморфізмі білків, практично вичерпана, в даний час, за рідкісним винятком, повністю замінена методами молекулярної біології. Варто зазначити, що лише невелика частка генів в геномі кодує білки, при цьому не менш важливим є наявність некодируючих елементів в самих структурних генах – інтрони, 5'UTR та 3'UTR ділянки тощо. Все це робить методи біохімічної генетики некорисними для аналізу мінливості на рівні спадкового матеріалу безпосередньо (методи біохімічної генетики в обмеженому варіанті можна використовувати тільки для аналізу "структури" генних продуктів, тобто білків). Використання різних типів ДНК-маркерів (такі як RAPD, STS, STR, ISSR, SNP тощо) дозволило показати практично нескінченне різноманітність варіантів нуклеотидних послідовностей різних ділянок геному, підкреслив, тим самим, найвищу варіабельність генетичного матеріалу в цілому. Однонуклеотидний поліморфізм (ОНП, SNP) належить до одного з найбільш перспективних типів молекулярно-генетичних маркерів [9].

Показано, що SNP зустрічається з частотою один випадок на одну тисячу пар основ в усьому геномі, тобто в середньому в геномі людини, міститься близько 3 мільйонів SNP. При цьому 50% SNP розташовані в некодируючих ділянках, 25% – призводять до миссенс-мутацій, 25% – до мовчазних мутацій

ям. Ці мовчазні SNP також називаються синонімічними, тобто вони не призводять до зміни кодуваної триплетом амінокислоти внаслідок мінливості генетичного коду. Як правило, синонімічні SNP не призводять до зміни функцій гена та його продукту, а отже, не піддаються впливу відбору (селективно нейтральні). Несинонімічні SNP (змінюють кодувану триплетом амінокислоту), навпаки, можуть мати різко виражений ефект. SNP виникають внаслідок транзицій або трансверсій, що призводить до зміни азотистого основи, але не їх загальної кількості в гені або в його фрагменті. Варто зазначити, що однонуклеотидні вставки та делеції не належать до SNP.

Навряд чи некодируючі ділянки геному SNP можуть локалізуватися в генах, що безпосередньо призводять до утворення їх різних алельних варіантів, а також, що не менш важливо, можуть призводити до зміни функцій. Крім того, SNP, локалізовані в некодируючих ділянках генів, можуть змінювати характер експресії генів, впливати на сплайсинг первинних транскриптів тощо. Для потреб сучасної селекції в тваринництві, найбільш перспективними генами-кандидатами є гени, продукти яких безпосередньо пов'язані з забезпеченням основних фізіологічних функцій організму [9, 10]. До таких генів належить ген гормону росту.

Гормон росту бере участь в регуляції великої кількості функцій організму, так або інакше пов'язаних з ростом та диференціюванням [5]. В своєму функціонуванні він тісно взаємодіє з іншими гормонами, формуючи, тим самим, соматотропну вісь регу-

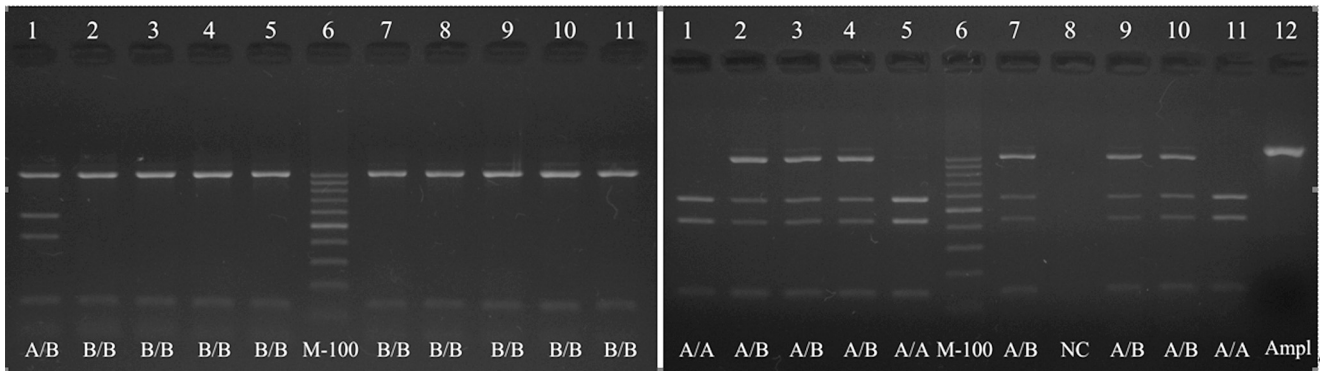


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции (SacI) 4 интрона гена гормона роста
 1 – 12 – номера лунок; M-100 – молекулярный маркер; A/A, A/B, B/B – соответствующие генотипы;
 NC – отрицательный контроль; Ampl – исходный ампликон.

Генетическая структура линий кур разного направления продуктивности по локусу гормона роста (4 интрон, SacI)

Генотипы	Белый плимутрок			Борковская барвистая			Полтавская глинистая		
	О	Е	χ^2	О	Е	χ^2	О	Е	χ^2
A/A	0	0,04	0,043	10	11,52	0,74	0	0,08	0,086
A/B	3	2,91		28	24,96		4	3,84	
B/B	47	47,05		12	13,52		46	46,08	
аллели	частоты аллелей								
A	0,03			0,48			0,04		
B	0,97			0,52			0,96		

Примечание: О – фактически выявленное количество особей данного генотипа; Е – теоретически ожидаемое количество особей данного генотипа.

ляции. Ген гормона роста у кур является одним из наиболее перспективных генов-кандидатов для изучения связи его аллельных вариантов с продуктивными признаками [3, 6]. Состоит из 4,35 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов), содержит в своем составе 5 экзонов и 4 интрона. Расположен на 27 хромосоме. Показано наличие в его структуре полиморфных сайтов для MspI и SacI. Аллельные варианты, возникающие в результате наличия/отсутствия сайтов рестрикции, связаны с целым рядом различных хозяйственно полезных признаков. Так, например, полиморфизм по первому интрону коррелирует с яичной продуктивностью, по третьему – с накоплением абдоминального жира, по четвертому – с устойчивостью к заболеваниям. Как было показано в ряде исследований, SacI полиморфизм по 4 интрону гена гормона роста предположительно связан с резистентностью к болезни Марека [4]. Таким образом, **цель данной работы** – изучение SacI-полиморфизма гена гормона роста (четвертый интрон) в популяциях кур украинской селекции разного направления продуктивности.

Материал и методы исследований. Исследования проводили в лаборатории профилактики заболеваний птицы и молекулярной диагности-

ки Института животноводства НААН Украины.

Для проведения исследований была использована птица отечественной селекции – куры мясо-яичные породы белый плимутрок, линия Г-2 (n=50), куры яичные породы борковская барвистая линия А (n=50), куры яично-мясные породы полтавская глинистая, линия 14 (n=50). От каждой особи был отобран биологический материал (кровь) на экспериментальной птицеферме “Сохранение государственного генофонда Института животноводства Национальной академии аграрных наук Украины”.

Кровь отбирали из гребня с помощью скарификатора на стерильную фильтровальную бумагу. Каждый образец подсушивали, маркировали и индивидуально упаковывали для предотвращения контаминации. Выделение ДНК из опытных образцов проводили с помощью коммерческого набора реагентов “ДНК-сорб-В” (“АмплиСенс”, Россия). Эффективность выделения ДНК определяли с помощью электрофореза в 0,7% агарозном геле при 200 V в течение 5 мин.

Для проведения ПЦР использовали праймеры: *forward* 5’-CTAAAGGACCTGGAAGAAGGG-3’; *reverse* 5’-AACTTGTCTAGGTGGGTCTG-3’ [2, 8, 10]. ПЦР

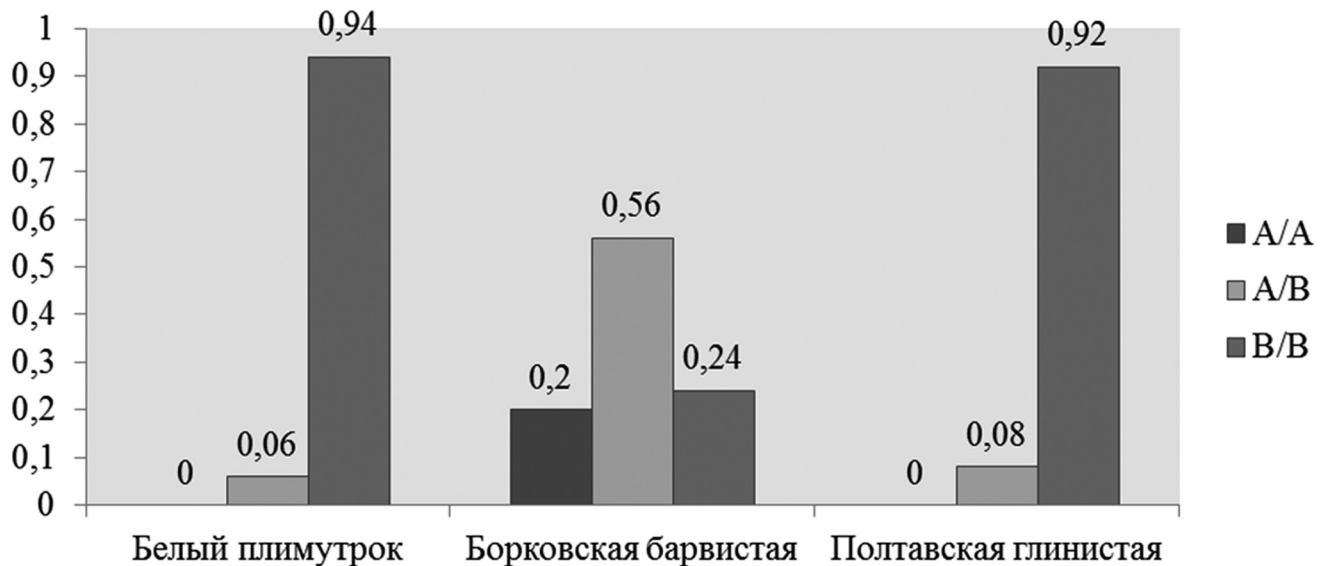


Рис. 2. Соотношение частот генотипов GH в исследуемых линиях кур

проводили с помощью реагентов DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific) с использованием программируемого термоциклера "Терцик" ("ДНК-технология", Россия) по соответствующей программе: 1 цикл – денатурация 94 °C 5 мин; 35 циклов – денатурация 94 °C 45 сек, отжиг 56 °C 45 сек, элонгация 72 °C 60 сек; 1 цикл – финальная элонгация 72 °C 10 мин. Объем конечной смеси составил 20 μL, концентрация праймеров – 0,2 μM соответственно.

Обработку амплифицированных фрагментов эндонуклеазой рестрикции SacI проводили согласно стандартной методике (FastDigest SacI, Thermo Scientific). Продукты рестрикции разделяли в 1,5% агарозном геле при напряжении 150 V в течение 40 мин. Визуализацию проводили с использованием бромистого этидия в ультрафиолетовом спектре. Размер рестриционных фрагментов определяли с использованием маркера молекулярных масс M-100.

На основе полученных данных рассчитывали фактическое и теоретическое распределение генотипов, частоты генотипов и аллелей, соответствие генетическому равновесию популяции по Харди-Вайнбергу методом χ^2 по общепринятым методикам.

Результаты исследований. На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов рестрикции 4-го интрона гена гормона роста.

По результатам проведенных исследований показано, что ген гормона роста (SacI-полиморфизм четвертого интрона) во всех изученных линиях кур является полиморфным. На представленных электрофореграммах показаны все три встречаемых генотипа – A/A, A/B и B/B (рис. 1).

Генотип A/A представлен на электрофореграмме в виде 3 фрагментов ДНК размером около 584, 440 и 144 п.н.; генотип A/B – 1024, 584, 440 и 144 п.н.; генотип B/B – 1024 и 144 п.н.; исходный ампликон – 1168 п.н.

Генетическая структура линий кур представлена в



таблице.

В линиях кур пород белый плимутрок и полтавская глинистая отсутствуют особи гомозиготные по аллелю A, в тоже время как гомозиготные особи по аллелю B преобладают в популяциях обеих пород (47 и 46). В то же время в линии A породы борковская барвистая присутствуют особи всех трех возможных генотипов. По соотношению частот генотипов линии кур пород белый плимутрок и полтавская глинистая практически одинаковы, однако существенно отличаются от линии кур породы борковская барвистая (рис. 2).

Для популяций кур мясо-яичного и яично-мясного направлений продуктивности характерна повышенная частота аллеля B (0,97 и 0,96). В тоже время в популяции яичных кур гораздо большее количество гетерозигот, однако частоты аллелей A и B практически идентичны (0,48 vs 0,52). Все изученные линии кур находятся в состоянии генетического равновесия.

У кур локальных популяций Ирана [2] частота аллеля A составила 0,798; аллеля B – 0,202; однако, в отличие от иранских исследований, в нашем случае в каждом из аллелей (A и B) присутствует

общий сайт рестрикции для *SacI*, в результате которого на электрофореграмме в каждом генотипе имеется в наличии фрагмент размером 144 п.н. (рис. 1). Подобная картина предположительно соответствует паттернам рестрикции для *SacI* в работе других авторов [1], однако для строгого соответствия необходимо точное определение размеров рестриционных фрагментов, т.к. разрешающей способности применяемого в данной работе агарозного геля для этих целей недостаточно. Однако наличие сайта рестрикции для *SacI* в обоих аллелях в трех линиях кур отечественной селекции не подлежит сомнению (что, как уже было сказано выше, приводит к образованию соответствующих рестриционных фрагментов в каждом случае). Таким образом, во всех аллелях гена гормона роста (среди изученных популяций кур) имеется один мономорфный сайт рестрикции для *SacI*, в то время как в аллеле А содержится также дополнительный полиморфный сайт.

Выводы

1. В популяциях кур пород белый плимутрок, борковская барвистая и полтавская глинистая ген гормона роста является полиморфным (*SacI*-полиморфизм 4-го интрона).

2. Частота аллеля А в популяции кур породы белый плимутрок составила 0,03; аллеля В – 0,97; в популяции кур породы борковская барвистая частота аллеля А – 0,48; В – 0,52; в популяции кур породы полтавская глинистая частота аллеля А – 0,04; В – 0,96.

3. Во всех аллелях гена гормона роста (среди изученных популяций кур) имеется один мономорфный сайт рестрикции для *SacI*, в то время как в аллеле А

содержится также дополнительный полиморфный сайт.

Изучена генетическая структура популяций кур пород белый плимутрок, борковская барвистая и полтавская глинистая по локусу гормона роста. По результатам распределения частот аллелей показано различие генетической структуры линий кур разных направлений продуктивности. Частота аллеля А в популяции кур породы белый плимутрок составила 0,03; аллеля В – 0,97; в популяции кур породы борковская барвистая частота аллеля А – 0,48; В – 0,52; в популяции кур породы полтавская глинистая частота аллеля А – 0,04; В – 0,96. Во всех аллелях гена гормона роста (среди изученных популяций кур) имеется один мономорфный сайт рестрикции для *SacI*, в то время как в аллеле А содержится также дополнительный полиморфный сайт.

Полимеразная цепная реакция, рестрикция, куры, полиморфизм, ген гормона роста

The genetic structure for growth hormone gene of three Ukrainian chicken selected lines is described. The difference in genetic structure of chicken population with various direct of productivity is shown. Frequencies of the A allele in White Plymouth Rock, Borkovskaya Barvistaya and Poltava Clay breeds were 0,03; 0,48 and 0,04 and frequencies of B allele were 0,97; 0,52 and 0,96 respectively. All alleles of growth hormone gene contain monomorphic *SacI* site and allele A contain one polymorphic *SacI* site additionally.

Polymerase chain reaction, restriction, hens, polymorphism, growth hormone gene

Литература

1. DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene: association with egg production / N. Kansaku, A. Nakada, H. Okabayashi [et al.] // J. Anim. Sci. – 2003. – Vol.74. – P. 243 – 244.

2. Enayati B. Genomic growth hormone, growth hormone receptor and transforming factor β -3 gene polymorphism in breeder hens of Mazandaran native fowls / B. Enayati, G. Rahimi-Mianji // African journal of biotechnology. – 2009. – Vol. 8 (14). – P. 3154 – 3159.

3. Growth hormone gene polymorphism and its correlation with different traits in Bantam and Leghorn chicken / S. Shahnaz, F. Shadma, D.N. Rank [et al.] // Indian journal of poultry science. – 2008. – Vol. 43 (2). – P. 123 – 127.

4. Growth hormone interacts with the Marek's disease virus SORF2 protein and is associated with disease resistance in chicken / H. Liu, H. Kung, J. Fulton [et al.] // PNAS. – 2001. – Vol.98 (16). – P. 9203 – 9208.

5. High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits / Q. Nie, B. Sun, D.Zhang [et al.] // Journal of heredity. – 2005.

– Vol. 96 (6). – P. 698 – 703.

6. Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography / Q. Nie, M. Lei, J. Ouyang [et al.] // Genet. Sel. Evol. – 2005. – Vol. 37. – P. 339 – 360.

7. Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualisation / Duran C., Appleby N., Edwards D. [et al.] // Current bioinformatics. – 2009. – Vol. 4. – P. 16 – 27.

8. New variations in intron 4 of growth hormone gene in Chinese native chickens / Q. Nie, S.C. Ip, X. Zang [et al.] // The journal of heredity. – 2002. – Vol. 93 (4). – P. 277 – 279.

9. Teneva A. Molecular markers in animal genome analysis / A. Teneva // Biotechnology in Animal Husbandry. – 2009. – Vol. 25. – P. 1267 – 1284.

10. Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a White Leghorn strain / X.P. Feng, U. Kuhnlein, S.E. Aggrey [et al.] // Poultry science. – 1997. – Vol. 76. – P. 1770 – 1775.