

УДК 575.174.015.3:577.2.08:636.22/.28:637.5.053

Колісник О.І., кандидат с-г. наук
e-mail: agro_svitanok@ukr.net
Харківська державна зооветеринарна академія

ОСОБЛИВОСТІ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ ЗРАЗКІВ ДНК ЩОДО НАЯВНОСТІ ПОЛІМОРФІЗМУ 316 C/G ГЕНУ CAPN 1 ТА 282C/G (AY008267) ГЕНУ CAST ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛР

Проведено аналіз генетичної структури тварин великої рогатої худоби щодо наявності поліморфізму 316 C/G гену CAPN 1 та 282C/G (AY008267) гену CAST за допомогою ПЛР з використанням генетичних маркерів. Вивчено особливості генетичної структури тварин, встановлено наявність комерційно-бажаних алелів за маркерами CAPN1 і CAST.

Ключові слова: ДНК, ПЛР, поліморфізм, ген CAPN1, ген CAST.

Постановка проблеми. Виробництво якісної яловичини є одним з пріоритетних завдань м'ясного скотарства в Україні. Тому важливе значення набуває оцінка генетичної структури порід та розведення поголів'я враховуючи особливості генетичних ресурсів тварин [1]. У зв'язку з цим особливої уваги заслуговують молекулярно-генетичні дослідження. Найбільш перспективним та інформативним методом виявлення маркерів генів є метод ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) [2].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Завдяки використанню ДНК-технологій існує можливість провести прижиттєву оцінку тварин за якісними показниками м'ясної продуктивності, вивчити різноманітність фенотипічних форм та виявити бажані [3]. Молекулярно-генетичний аналіз на основі ПЛР дозволяє вивчити маркери тварин, які контролюють такі важливі функції, як ріст, рівень продуктивності, а також жирність молока та ніжність м'яса [2].

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття. Кількісною характеристикою ніжності м'яса є поперечна пружність м'язового волокна, яку пов'язують з дією трьох генів, що відповідають за синтез міостатину, кальпаїну та кальпастатину [4, 5].

Кальпаїни є кальцій залежними протеїназами, що складаються із цілого ряду протеїназ: μ -кальпаїн (CAPN1), m -кальпаїн (CAPN2) та інші [2].

Ген кальпаїну - CAPN1, модифікує м'язову тканину під час після забійного дозрівання м'яса. У кодуючій частині цього гену можуть відбуватись дві заміни (C/G), які призводять до змін у амінокислотній послідовності в положеннях 316 (гліцин на аланін) та 530 (валін на ізолейцин), що проявляється в отриманні більш ніжного м'ясу. Бажаними алельними формами, що забезпечують отримання м'яса більшої ніжності, є C316 і G530, та тварини, гомозиготні за цими алелями, представляють найбільший інтерес [2, 4]

Кальпастатин – інгібітор, який специфічно пригнічує протеолітичну активність μ - і m -кальпаїнів [6] та регулює протеоліз. У кодуючій частині гену CAST може відбуватись заміна (C/G), між екзонами 5 та 6, що призводить до змін у амінокислотній послідовності-цитозинуна гуанін [7]. Збільшення післязабійної активності гену, що продукує кальпастатин призводить до зменшення ніжності м'яса. Тварини з генотипом CC мають більш ніжне м'ясо, ніж гетерозиготи CG та гомозиготи GG [8, 9].

Мета досліджень Дослідження зразків ДНК щодо наявності поліморфізму 316 C/G гену CAPN 1 та 282C/G (AY008267) гену CAST за допомогою ПЛР з використанням

генетичних маркерів для аналізу.

Об'єкти та методика дослідження. Для проведення досліджень використовували 89 зразків стабілізованої крові корів абердин - ангуської м'ясної породи АФ «Агро-Новоселівка-2009» Нововодолазького району Харківської області.

Ізоляцію сумарної ДНК проводили за допомогою комерційного набору для екстракції нуклеїнових кислот «NeoPrepDNA» виробництва Neogene (Україна) згідно з рекомендаціями виробника. Реакцію ампліфікації проводили за допомогою комерційного набору «GenPak PCR Master Mix Core» виробництва фірми IsoGene (Російська Федерація) за обраними програмами (табл. 1, 2) та систем праймерів:

CAPN1_F:5'-CCAGGGCCAGATGGTGAA-3'

CAPN1_R: 5'-CGTCGGGTGTCAGGTTGC-3'

CAST_F:5'-AAGTAAAGCCAAAGGAACACACA-3'

CAST_R:5'-AGGCTTTTGGCTGAAAACA-3'

Таблиця 1

Реакція ампліфікації з використанням праймерів CAST_F/R

Номер циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	94°C	2 хв.	1
2	94°C	1 хв.	40
	58°C	30 сек.	
	72°C	1 хв.	
3	72°C	2 хв.	1
4	10°C	10 год.	1

Таблиця 2

Реакція ампліфікації з використанням праймерів CAPN_F/R

Номер циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	94°C	2 хв.	1
2	94°C	1 хв.	45
	65°C	30 сек.	
	72°C	1 хв.	
3	72°C	5 хв.	1
4	10°C	10 год.	1

Рестрикційний аналіз проводили з використанням буферів та ендонуклеаз *btgl* та *rsal* фірми SibEnzyme (Російська Федерація) згідно з рекомендаціями виробника. Електрофоретичний аналіз проведений за допомогою набору для електрофорезу виробництва фірми АмпліСенс (Російська Федерація). Концентрація агарози в гелі 2,5 % напруга 10 В на 1 см гелю.

Фактичну частоту генотипів розраховували за формулою: $p = n/N$, де p – частота генотипу, n – кількість тварин, які мають певний генотип, N – кількість тварин [2].

Залежність частоти алелей від частоти генотипів розраховували наступним чином: $P = pp + 1/2N$, де P – частота алеля, pp – частота індивідуумів, гомозиготних заданим алелем, N – частота гетерозигот [10].

Основні результати дослідження. Методом ПЛР було досліджено наявність поліморфізму С316G гена CAPN1 та 282C/G (AY008267) гену CAST, частоту алелей та генотипів у обраних зразках.

Нижче наведено фрагменти електрофоретичного аналізу ампліконів, що утворилися в результаті проведення ампліфікації з праймерами CAST_F/R, CAPN_F/R та рестрикції.

Облік результатів проводили наступним чином: яскраві полоси на електрофореграмі і продуктів ПЛР, отриманих з використанням праймеру CAPN_F/ R, на рівні 88, 250 та 371 п.н. виявляють гомозигот по алелю С; 88 та 621 (709) п.н. – гомозигот по алелю G; 88, 250, 371 та 621 (709) п.н. – гетерозигот CG (рис. 1)

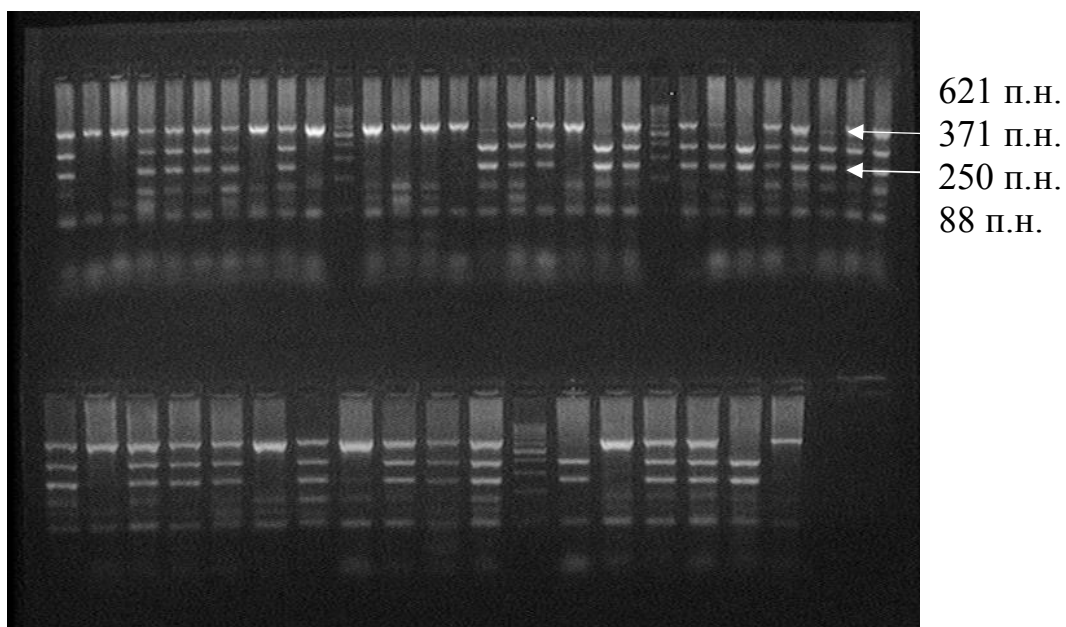


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР специфічної послідовності ДНК, генотипованої за поліморфізмом 316C/G гену CAPN1.M – маркер молекулярної маси із кроком 100 бр, 1-45 – досліджувані зразки

Продукти ПЛР, отримані під час ампліфікації з використанням праймеру CAST_F/ R, що на електрофореграмі дають яскраві, чіткі полоси на рівні 433 п.н. виявились гомозиготами по алелю С; та 265 п.н. – гомозиготами по алелю G; 168, 265 та 433 п.н. – гетерозиготами CG (рис. 2).

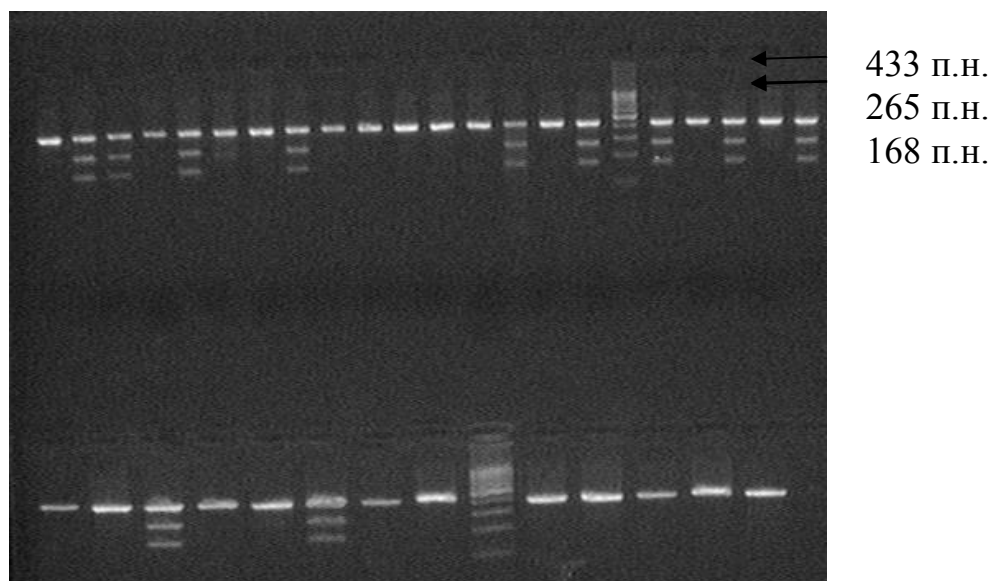


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР специфічної послідовності ДНК, генотипованої за поліморфізмом 282C/G (AY008267) гену CAST.M – маркер молекулярної маси із кроком 100 бр, 1-34 – досліджувані зразки

Молекулярно-генетичний аналіз ДНК дозволив виявити фактичну частоту генотипів у досліджуваних тварин. При цьому з 89 досліджуваних тварин: 33 голови приходилось на абердин-ангуську м'ясну породу британської селекції, 32 – на місцевий скот та 24 – на нову(створювану) українську ангуську м'ясну породу. Було розраховано, що серед 89 зразків від ВРХ, в яких досліджували наявність поліморфізму гену CAPN 1, 12 тварин (13,5%) мають генотип CC, 30 (33,7%) – генотип GG та 47 (52,8%) – гетерозиготи.

Результати досліджень зразків, що були генотиповані за поліморфізмом 282C/G (AY008267) гену CAST, показали, що 57 тварин (64%) є гомозиготними за алелем С, 2 (2,3%) – гомозиготними за алелем G та 30 (33,7%) – гетерозиготами(табл. 3).

Таблиця 3

Результати досліджень щодо наявності поліморфізмів у генах CAPN1 та CAST

№ п/п	Інвентарний номер	Назва породи	Результат 316C/G	Результат 282C/G
1	2579	Н	CG	CG
2	2904	А	GG	CC
3	4567	М	GG	CC
4	4254	М	CG	CG
5	4027	М	CG	CC
6	3974	А	CG	CC
7	2848	А	CG	GG
8	3849	А	GG	CC
9	4188	А	CG	CC
10	1844	А	GG	CC
11	4012	М	GG	CG
12	2547	Н	GG	CG
13	4986	М	GG	CC
14	4204	Н	GG	CC
15	1059	А	CC	CC
16	4130	М	CG	CC
17	5947	А	CG	CC
18	4168	М	GG	CC
19	4230	А	CC	CG
20	3948	М	CG	CG
21	3783	А	CG	CG
22	3786	М	CC	CC
23	4206	Н	CG	CC
24	4033	М	CC	CC
25	4196	М	CG	CG
26	2041	Н	CG	CC
27	4069	М	CC	CG
28	3930	А	CG	CC
29	2046	М	CG	GG
30	9267	А	CG	CC
31	4129	М	GG	CC
32	4120	А	CG	CG
33	2843	А	CG	CC
34	7266	А	CG	CG

Продовження таблиці 3

№ п/п	Інвентарний номер	Назва породи	Результат 316С/G	Результат 282С/G
35	1021	А	GG	CG
36	0838	М	CG	CG
37	3769	М	GG	CC
38	2066	М	CG	CG
39	4980	А	CG	CC
40	4241	А	GG	CC
41	0562	А	CG	CC
42	4207 _М	Н	CC	CG
43	2061	А	GG	CC
44	4207	Н	CG	CC
45	1937	М	CG	CC
46	3783	А	CC	CG
47	6180	А	GG	CC
48	4261	М	GG	CC
49	4264	М	CG	CG
50	3917	М	CG	CG
51	4242	А	GG	CC
52	4216	А	CG	CG
53	3982	А	CC	CC
54	4082	Н	GG	CC
55	3898	А	CG	CC
56	2900	А	CG	CG
57	2113	А	CG	CC
58	4568	А	CG	CC
59	4224	М	GG	CC
60	4056	Н	GG	CC
61	2067	М	CG	CC
62	3878	А	CG	CG
63	4116	М	CC	CC
64	4208	Н	CG	CG
65	0821	Н	CG	CC
66	4200	Н	CG	CC
67	2512	Н	CC	CG
68	2566	Н	CG	CC
69	1936	М	CG	CG
70	7238	А	CG	CG
71	3950	А	CG	CG
72	4189	Н	GG	CG
73	4226	М	GG	CG
74	3273	Н	GG	CC
75	3234	Н	CG	CC
76	4184	Н	GG	CC
77	4028	М	CG	CC
78	3977	М	GG	CG

Продовження таблиці 3

№ п/п	Інвентарний номер	Назва породи	Результат 316C/G	Результат 282C/G
79	3919	Н	CG	CC
80	2055	М	CG	CC
81	4138	М	GG	CG
82	4262	А	GG	CC
83	8406	Н	GG	CC
84	0160	Н	GG	CC
85	0168	М	CC	CC
86	0175	М	CC	CC
87	0169	Н	CG	CC
88	0167	Н	CG	CC
89	3919	Н	GG	CC

Примітка: А – абердин-ангуська м'ясна порода британської селекції; М – місцевий скот; Н – нова (створювана) українська ангуська м'ясна порода.

Також за допомогою даних частоти генотипів були розраховані частоти алелей для кожного гену. Частота алелей С таG у зразках генотипованих за поліморфізмом 316C/G гену CAPN1 склала 0,399 та 0,601 відповідно. Частота алелей С таG у зразках, які досліджували на наявність поліморфізму генуCAST – 0,809 та 0,192 відповідно.

Крім того проводилась оцінка очікуваної гетерозиготності по частотам алелей для обох генів за допомогою співвідношення Харді Вайнберга. На основі проведених досліджень встановлено, що очікувана гетерозиготність за геном CAPN1 складає 0,48. Зміщення фактичної гетерозиготності порівняно з очікуваною складає 0,048.

Очікувана гетерозиготність за геном CAST складає 0,31, тоді як фактична частота гетерозигот була 0,337, а різниця між цими показниками – 0,027.

Висновки й перспективи подальших наукових досліджень. Під час проведених досліджень було виявлено незначне порушення генетичної рівноваги через зміщення фактичної та очікуваної кількості гетерозигот за обома генами. За допомогою методу ПЛР було вивчено наявність поліморфізмів 316 C/G гену CAPN 1 та 282C/G (AY008267) гену CAST. Це дало змогу виявити перспективних тварин для подальшої селекції з заданим генотипом (316 C/C гену CAPN 1 та 282C/C гену CAST) та вивчити їх генетичні особливості.

Список використаної літератури

1. Копилова К.В. Генетична структура різних порід великої рогатої худоби за молекулярно-генетичними маркерами [Текст] / К.В. Копилова, А.В. Шельов, О.В. Березовський, К.В. Копилов, В.І. Россоха // Науково-технічний бюлетень. – 2013. – № 110. – С. 76-83.
2. Косян Д.Б. Использование метода ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по гену CAPN1 с использованием генетических маркеров [Текст] / Д.Б. Косян, Е.А. Русакова, О.В. Кван, Л.Г. Сурундаева, Л.А. Маевская // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – № 6. – С. 26-30.
3. Добрянська М.Л. Генетична структура м'ясних порід великої рогатої худоби за різними типами ДНК-маркерів [Текст]: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: спец. 03.00.15 «Генетика» / М.Л. Добрянська. – Чубинське, 2013. – 20 с.
4. Сурундаева Л.Г. Ранняя диагностика аминокислотного состава мяса крупного рогатого скота по носительству мутации гена CAPN1 [Текст] / Л.Г. Сурундаева, Д.Б. Косян, Е.А. Русакова, О.В. Кван, Е.В. Шейда // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2.

5. Добрянська М.Л. Генетична структура м'ясних порід великої рогатої худоби південна м'ясна, симентальська та абердин-ангуська за різними типами днк-маркерів [Текст] / М.Л. Добрянська, К.В. Копилов, Ю.В. Подоба, Ю.В. Вдовиченко, К.В. Копилова // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького. – 2011. – Т. 13, № 4(3). – С. 112-117.
6. Канцерова Н.П. Особенности структуры и свойств внутриклеточных кальцийактивируемых протеиназ у беспозвоночных животных [Текст] / Н.П. Канцерова, Л.А. Лысенко, Н.Н. Немова // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов Том I. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Сборник научных статей – Петрозаводск: Кар НЦРАН. –2010. – С. 68-73.
7. Curi R.A. Assessment of GH1, CAPN1 and CASTpolymorphisms as markers of carcass and meattraits in Bosindicus and Bostaurus-Bosindicuscross beef cattle [Text] / R.A. Curi, L.A. Chardulo, J.Giusti, A.C. Silveira, C.L.Martins // Meat Science– 2010. – № 86(4).– P. 915-920.
8. Schenkel F.S. Associationof a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle [Text] / F.S. Schenkel, S.P. Miller, Z.Jiang, I.B. Mandell et al. // JournalofAnimalScience. – 2006. – № 84(2). – P. 291-299.
9. Casas E. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits [Text] / E. Casas, S.N.White, T.L. Wheeler, S.D.Shackelford, M. Koohmaraie, D.G.Riley, C.C. Jr.Chase, D.D.Johnson, T.P.Smith // JAnimScience – 2006. – 84(3).–P. 520-525.
10. Морозов Е.И. Генетика в вопросах и ответах [Текст] / Е.И. Морозов, Е.И. Тарасевич, В.С.Анохина // 2-е изд., перераб. и доп. – Мн.: Университетское, 1989. – 288 с.

References

1. Kopilova K.V. Genetichna struktura riznih porid velikoyi rogotoyi hudobi za molekulyarno-genetichnimi markerami [Tekst] / K.V. Kopilova, A.V. Shelov, O.V. Berezovskiy, K.V. Kopilov, V.I. Rossoha / Naukovo-tehnichniy byuletен. – 2013. – № 110. – S. 76-83.
2. Kosyan D.B. Ispolzovanie metoda PTsR dlya genotipirovaniya krupnogo rogotogo skota po genu CAPN1 s ispolzovaniem geneticheskikh markerov [Tekst] / D.B. Kosyan, E.A. Rusakova, O.V. Kvan, L.G. Surundaeva, L.A. Maevskaya // Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. – 2012. – № 6. – S. 26-30.
3. Dobryanska M.L. Genetichna struktura m'yasnih porid velikoyi rogotoyi hudobi za riznimi tipami DNK-markeriv [Tekst]: avtoref. dis. na zdobuttya nauk. stupenya kand. s.-g. nauk: spets. 03.00.15 «Genetika» / M. L. Dobryanska. – Chubinske, 2013. – 20 s.
4. Surundaeva L.G. Rannyaya diagnostika aminokislotnogo sostava myasa krupnogo rogotogo skota po nositelstvu mutatsii gena CAPN1 [Tekst] /L.G. Surundaeva, D.B.Kosyan, E.A.Rusakova, O.V. Kvan, E.V.Sheyda // Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. – 2014. – № 2.
5. Dobryanska M.L. Genetichna struktura m'yasnih porid velikoyi rogotoyi hudobi pivdenna m'yasna, simentalska ta aberdin-anguska za riznimi tipami dнк-маркерів [Текст] / М.Л. Добрянська, К.В. Копилов, Ю.В. Подоба, Ю.В. Вдовиченко, К.В. Копилова // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького. – 2011. – Т. 13, – № 4(3). – С. 112-117.
6. Kantserova N.P. Osobennosti struktury i svoystv vnutrikletochnyh kaltsiyaktiviruemyh proteinaz u bespozvonochnyh zhivotnyh [Tekst] / N.P. Kantserova, L.A. Lysenko,

- N.N. Nemova // *Sovremennye problemy fiziologii i biohimii vodnyh organizmov Tom I. Ekologicheskaya fiziologiya i biohimiya vodnyh organizmov. Sbornik nauchnyh statey* – Petrozavodsk: Kar NTsRAN. – 2010. – С. 68-73
7. Curi R.A. Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphisms as markers of carcass and meat traits in Bos indicus and Bos taurus-Bos indicus cross beef cattle [Text] / R.A. Curi, L.A. Chardulo, J. Giusti, A.C. Silveira, C.L. Martins // *Meat Science* – 2010. – № 86(4). – P. 915-920.
8. Schenkel F.S. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle [Text] / F.S. Schenkel, S.P. Miller, Z. Jiang, I.B. Mandell et al. // *Journal of Animal Science*. – 2006. – № 84(2). – P. 291-299.
9. Casas E. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits [Text] / E. Casas, S.N. White, T.L. Wheeler, S.D. Shackelford, M. Koohmaraie, D.G. Riley, C.C. Jr. Chase, D.D. Johnson, T.P. Smith // *J Anim Science* – 2006. – 84(3). – P. 520-525.
10. Morozov E.I. *Genetika v voprosah i otvetah* [Tekst] / E.I. Morozov, E.I. Tarasevich, V.S. Anohina // 2-e izd., pererab. i dop. – Mn.: Universitetskoe, 1989. – 288 s

УДК 575.174.015.3:577.2.08:636.22/.28:637.5.053

Колесник О.І., кандидат с-х. наук

e-mail: agro_svitanok@ukr.net

Харьковская государственная зооветеринарная академия

ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ОБРАЗЦОВ ДНК ПРИ НАЛИЧИИ ПОЛИМОРФИЗМА 316 C/G ГЕНА CAPN 1 И 282C/G (AY008267) ГЕНА CAST С ПОМОЩЬЮ ПЦР

Проведен анализ генетической структуры животных крупного рогатого скота по поводу наличия полиморфизма 316 C/G гена CAPN 1 и 282C/G (AY008267) гена CAST с помощью ПЛР с использованием генетических маркеров. Изучены особенности генетической структуры животных, установлено наличие коммерчески-желаемых аллелей по маркерам CAPN1 и CAST.

Ключевые слова: ДНК, ПЦР, полиморфизм, ген CAPN1, ген CAST.

UCC 575.174.015.3:577.2.08:636.22/.28:637.5.053

Kolisnyk O.I., candidate of agricultural science

e-mail: agro_svitanok@ukr.net

Kharkiv State Zooveterinary Academy

GENETIC STRUCTURE PECULIARITIES OF DNA SAMPLES AS FOR POLYMORPHISM OF 316 C/G GENE CAPN 1 PRESENCE AND GENE 282C/G (AY008267) CAST WITH THE HELP OF PCR

The analysis of genetic structure of animals of Aberdeen Angus breed as for polymorphism 316 C/G gene CAPN 1 and 282C/G (AY008267) gene CAST presence with the help of PCR using the genetic markers have been conducted. The genetic structure peculiarities and commercially desirable alleles for markers CAPN1 and CAST have been studied.

Key words: DNA, PCR, polymorphism, gene CAPN1, gene CAST.

*Рецензент: Хохлов А.М., доктор с.-г. наук, профессор
Харківська державна зооветеринарна академія*