

УДК 636.2.034.082: 575.17

ГОРОДНА О.В., канд. біол. наук, зав. наук.-дослід. лабораторії  
«Молекулярної біології та генетики»

ННЦ «Інститут біології» КНУ ім. Тараса Шевченка

КАРАТЄЄВА О.І., аспірант

Миколаївський державний аграрний університет

## ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ДНК-ПОЛІМОРФІЗМУ

## СТРУКТУРНИХ ГЕНІВ ГОРМОНУ РОСТУ ТА ЛЕПТИНУ

## У КОРІВ РІЗНИХ ТИПІВ ФОРМУВАННЯ ОРГАНІЗМУ

Вивчено порівняльний аналіз ДНК-поліморфізму структурних генів *LEP* і *GH* та їх вплив на ознаки молочної продуктивності залежно від інтенсивності формування організму тварини. Встановлено можливість застосування генетичних маркерів в селекції корів різних порід молочного напрямку продуктивності.

**Ключові слова:** інтенсивність формування організму, поліморфізм, локус, лептин, соматотропін.

**Постановка проблеми.** Розвиток молекулярної генетики дав можливість ідентифікувати гени, які тим чи іншим чином пов'язані з господарсько корисними ознаками [2, 4]. Це дає змогу у певний спосіб вести селекцію безпосередньо на рівні ДНК, тобто поряд з відбором за фенотипом виявляти бажані господарсько цінні комбінації генів [4].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** На сьогодні існує величезна кількість методик, які дозволяють виявити гени, що асоційовані з продуктивними ознаками [6-13]. У великої рогатої худоби встановлено найбільшу кількість таких генетичних маркерів, що відкриває широкий спектр можливостей прогнозувати і покращувати продуктивність тварин [1, 4, 5]. Одними з таких маркерів є: лептин (*LEP*) – гормональний білок, який синтезуючись в адіпоцитах відповідає за регуляцію маси тіла тварини, споживання нею корму та її жирові відкладення, а також бере участь у синтезі жирів молока [5, 6, 9, 12, 13] та соматотропін (*GH*) – крім функції соматичного регулятора росту тварини він володіє лактогенною, інсуліноподібною, діабетогенною, жиромобілізуючою і нейротропною дією [5, 7, 8, 10].

**Мета досліджень** – дослідити вплив названих вище поліморфних структурних генів на молочну продуктивність тварин різної швидкості раннього постнатального росту та виявити можливість використання генетичних маркерів на практиці.

**Матеріал і методика дослідження.** Дослідженню підпадали 134 тварини (n=134): червоної степової (ЧС; n=45), української чорно-рябої молочної (УЧРМ; n=44), української червоної молочної (УЧМ; n=45) порід, які належать двом господарствам Миколаївської області: перші дві – ДП ПР «Степовий», а остання – ПСПП «Козирське». В межах кожної породи було сформовано дві групи тварин – з помірним та швидким типом інтенсивності формування організму, використавши при цьому індекс інтенсивності формування організму (*Δt*) згідно з методикою В.П. Коваленка [3]. Кров для досліджень брали з яремної вени з наступною консервацією гепарином (у розрахунку 25 МО препарату на 1 мл крові). Електрофоретичні дослідження проводили методами горизонтального крохмального (14 %) і вертикального поліакриламідного (12 %) електрофорезів з наступним гістохімічним фарбуванням за загальноприйнятими методиками [11] із власними модифікаціями в умовах лабораторії Інституту рибного господарства НААН України м. Київ. Сумарну ДНК виділяли із клітин периферійної крові в представників зазначених вище порід за наведеною нижче методикою. До 200 мкл гепаринізованої цільної крові додавали 1 мл деіонізованої H<sub>2</sub>O, далі зразок заморожували-відтаювали. Центрифугували 5 хв за 7 тис. об/хв. Супернатант зливали, додавали 1 мл деіонізованої H<sub>2</sub>O, струшували на вортексі й повторювали процедуру до появи безбарвного осаду. Останній суспензували в 500 мкл розчину, що містить 25 мм ЕДТА, рН 8,0 і 75 мм NaCl. Зразок інкубували 120 хв за t+56 °С, струшуючи кожні 30 хв на вортексі, після чого суміш екстрагували рівним обсягом хлороформу й знову інкубували 30 хв за кімнатної температури. Центрифугували 5 хв при 14 тис. об/хв. З водної фази ДНК здійснювали преципітацію 2,5 обсягами 96 % етанолу або рівним обсягом ізопропанолу. Зразок витримували від 30 до 60 хв за t 20 °С і центрифугували 15 хв за 14 тис. об/хв. ДНК-осад промивали 70 % етанолом, підсушували за кімнатної температури й розчиняли в 50 мкл деіонізованої H<sub>2</sub>O. Для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використали стандартну реакційну суміш обсягом 10 мкл: H<sub>2</sub>O деіонізованої – 4,3 мкл; буфер ПЛР – 5-х (15 м Mg 1,0 мол) 2,0 мкл; *DNTP*

суміш 10-х (2 мм кожного) – 0,8 мкл; два праймери (70 ng кожного) – 0,8 мкл; *Taq*-полімераза (1мл/1000 U) – 0,1 мкл; *DNA* 50-100 ng – 2,0 мкл. Для проведення ПЛР використали ампліфікатор фірми «Eppendorf» (Німеччина). Електрофорез проводили в 2 % агарозному гелі з використанням 1х *Tve* буфера; зони ДНК типували в ультрафіолетовому світлі після фарбування гелю бромистим етідієм. Для ПЛР-ампліфікації поліморфізму гена соматотропного гормону (*GH*), фрагмента гена лептину (*LEP*) використали спеціально підібрані праймери. Умови ПЛР для гена соматотропного гормону включали початкову денатурацію 95 °С – 2 хв, наступні 35 циклів: 95 °С – 20 с, 62 °С – 20 с, 72 °С – 40 с, і кінцевий синтез – 72 °С – 5 хв. У цих умовах ампліфікувався фрагмент 5-го екзону *GH* довжиною в 223 п.н. [7-8]. За використання рестриктази *Alu I* у цій ділянці виявлено два алельні варіанти, позначені як *L* (лейцин у позиції 127) і *V* (валін у цій же позиції). У носіїв *LL* після рестрикції виявляються два фрагменти довжиною 171, 52 п.н., а в *VV* сайт рестрикції відсутній і виявляється нерестриктний фрагмент довжиною в 223 п.н. [9-10]. Умови ПЛР для гена лептину містили в собі початкову денатурацію 95 °С – 2 хв, наступних 35 циклів: 95 °С – 20 с, 62 °С – 20 с, 72 °С – 40 с, і кінцевий синтез 72 °С – 5 хв. Аналіз поліморфізму за локусом *LEP* проводили шляхом оцінки довжин рестрикційних фрагментів, одержуваних після обробки продукту ампліфікації (1830 п.н.) рестриктазою *Sau3AI*. За допомогою електрофорезу в агарозному гелі розподіляли продукти рестрикції, фарбували бромистим етідієм та здійснювали візуалізацію результатів під УФ променями за довжини хвилі 380 нм [6, 9, 11-13]. Визначали розміри рестриктів за допомогою маркера молекулярної ваги 0,1-kb *DNA Ladder (Gibco BRL)*. Біометричну обробку даних здійснено на ПЕОМ за допомогою програм MS Office.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Останніми роками велика увага приділяється крім основних білків молока і поліморфним системам гормонів і гормональним білкам. Так, за локусом лептину, який відповідає за масу тіла тварини, жировідкладення і сприяє синтезу жирів молока винайдено понад 20 його поліморфних сайтів, з яких тільки шість знаходяться в екзонах, але лише два з них призводять до амінокислотних змін [13].

Дослідженнями поліморфізму гена *LEP* у дослідних групах встановлено, що худоба певних груп характеризувалася явною перевагою за частотою алеля *S*. Найбільшу частоту бажаного алеля *T* виявлено в межах ЧС худоби повільної інтенсивності формування організму і УЧРМ протилежного типу – 0,413, в інших дослідних групах частота повторюваності не на стільки висока і найменша в УЧРМ генотипах повільної швидкості росту – 0,341 (табл. 1).

Таблиця 1 – Генетична структура груп корів різних типів формування організму за геном *LEP* та їх молочна продуктивність за вищу лактацію

Тип формування організму	Генотип	n	f	Частота алеля	He	Надій, кг	Жирність молока	
							%	кг
ЧС								
Швидкий	<i>CC</i>	8	0,348	<i>C</i> -0,587 <i>T</i> -0,413	0,485	4736±232	3,72±0,02	176±8
	<i>CT</i>	11	0,478			4487±211	3,72±0,02	167±7
	<i>TT</i>	4	0,174			4835±415	3,74±0,03	181±15
Повільний	<i>CC</i>	7	0,318	<i>C</i> -0,636 <i>T</i> -0,364	0,463	4190±205	3,71±0,03	155±7
	<i>CT</i>	14	0,636			4282±105	3,71±0,02	159±4
	<i>TT</i>	1	0,045			3917	3,70	145
У середньому	<i>CC</i>	15	0,356	<i>C</i> -0,622 <i>T</i> -0,378	0,470	4481±167	3,72±0,02	167±6
	<i>CT</i>	25	0,533			4372±109	3,72±0,01	162±4
	<i>TT</i>	5	0,111			4651±370	3,73±0,02	174±14
УЧМ								
Швидкий	<i>CC</i>	7	0,304	<i>C</i> -0,630 <i>T</i> -0,370	0,466	3622±96	3,68±0,05	129±3
	<i>CT</i>	15	0,652			3674±95	3,67±0,03	135±4
	<i>TT</i>	1	0,043			4070	3,58	146
Повільний	<i>CC</i>	8	0,364	<i>C</i> -0,636 <i>T</i> -0,364	0,463	3924±168	3,74±0,04	146±5
	<i>CT</i>	12	0,545			3765±132	3,68±0,05	139±5
	<i>TT</i>	2	0,091			4198±117	3,9±0,04	164±7
У середньому	<i>CC</i>	15	0,333	<i>C</i> -0,633 <i>T</i> -0,367	0,464	3783±105	3,71±0,03	138±4
	<i>CT</i>	27	0,600			3715±78	3,67±0,03	137±3
	<i>TT</i>	3	0,067			3963±175	3,73±0,09	148±9
УЧРМ								
Швидкий	<i>CC</i>	7	0,304	<i>C</i> -0,587 <i>T</i> -0,413	0,485	5433±197	3,87±0,02	210±8
	<i>CT</i>	13	0,565			5130±128	3,94±0,04	202±5
	<i>TT</i>	3	0,130			5356±295	3,88±0,04	208±14
Повільний	<i>CC</i>	7	0,364	<i>C</i> -0,659 <i>T</i> -0,341	0,449	4848±226	3,99±0,07	193±8
	<i>CT</i>	13	0,591			5146±144	3,93±0,04	202±6
	<i>TT</i>	1	0,045			6037	4,00	241
У середньому	<i>CC</i>	14	0,333	<i>C</i> -0,622 <i>T</i> -0,378	0,470	5141±165	3,93±0,04	202±6
	<i>CT</i>	26	0,578			5138±95	3,94±0,03	202±4
	<i>TT</i>	4	0,089			5526±269	3,91±0,04	216±13

Високою очікуваною гетерозиготністю відмічаються тварини з прискореним темпом росту ЧС та УЧРМ порід, які мають тотожні значення 0,485, при чому в першому випадку фактична гетерозиготність майже відповідає очікуваній – 0,478, а в другому, остання поступається значенням фактичної. Рівень продуктивності серед тварин дослідного поголів'я в більшості випадків збільшується у гомозиготних генотипів *CC* та *TT*.

Характеризуючи розподіл частот алелів гена соматотропіну можна констатувати, що серед дослідних груп частка бажаного алеля *L* значно вища і сягає до 69,6 % серед представниць швидкої інтенсивності розвитку і до 70,5 % у аналогів протилежного типу, частота алеля *V* у цих тварин удвічі менша (табл. 2). У представниць ЧС худоби швидкого типу росту організму особини гомозиготи *VV* зовсім відсутні, а в інших групах їх становить від 8,7 до 18,2 %. Висока фактична гетерозиготність характерна худобі з підвищеним процесом росту УЧРМ та УЧМ – 0,435 та 0,522 відповідно, а найвища у першій групі ЧС генотипу. По перших двох породах вона значно вища, ніж очікувана гетерозиготність, в той час як по останній групі швидкого темпу росту очікувана вища за фактичну. Зіставлення надоїв і частоти алелів дає підставу стверджувати, що в більшості випадків генотипи *LL* та *LV* мають вищі надої порівняно з *VV*, хоча по УЧМ худобі переважають саме тварини з генотипом *VV*.

Таблиця 2 – Генетична структура груп корів різних типів формування організму за геном *GH* та їх молочна продуктивність за вищу лактацію

Тип	Генотип	n	f	Частота алеля	He	Надій, кг	Жирність молока	
							%	кг
ЧС								
Швидкий	<i>LL</i>	9	0,391	<i>L</i> -0,696 <i>V</i> -0,304	0,423	4737±251	3,72±0,02	176±9
	<i>LV</i>	14	0,609			4568±178	3,73±0,02	170±6
	<i>VV</i>	0						
Повільний	<i>LL</i>	9	0,409	<i>L</i> -0,614 <i>V</i> -0,386	0,474	4289±164	3,70±0,02	159±6
	<i>LV</i>	9	0,409			4290±152	3,71±0,03	159±6
	<i>VV</i>	4	0,182			3993±56	3,74±0,02	150±3
У середньому	<i>LL</i>	18	0,400	<i>L</i> -0,667 <i>V</i> -0,333	0,444	4513±155	3,71±0,01	168±6
	<i>LV</i>	23	0,533			4513±155	3,71±0,01	168±6
	<i>VV</i>	4	0,067			3993±56	3,74±0,02	150±3
УЧМ								
Швидкий	<i>LL</i>	9	0,391	<i>L</i> -0,652 <i>V</i> -0,348	0,454	3751±256	3,65±0,10	137±13
	<i>LV</i>	12	0,522			3587±95	3,68±0,04	132±4
	<i>VV</i>	2	0,087			3875±195	3,60±0,01	140±6
Повільний	<i>LL</i>	10	0,455	<i>L</i> -0,682 <i>V</i> -0,318	0,434	3610±83	3,62±0,06	131±4
	<i>LV</i>	10	0,455			3805±142	3,74±0,04	142±5
	<i>VV</i>	2	0,091			3893±212	3,79±0,03	147±8
У середньому	<i>LL</i>	19	0,422	<i>L</i> -0,667 <i>V</i> -0,333	0,444	3628±219	3,56±0,11	130±12
	<i>LV</i>	22	0,489			3843±106	3,71±0,03	142±4
	<i>VV</i>	4	0,089			3722±76	3,70±0,02	136±3
УЧРМ								
Швидкий	<i>LL</i>	9	0,391	<i>L</i> -0,609 <i>V</i> -0,391	0,476	5037±139	3,89±0,02	196±6
	<i>LV</i>	10	0,435			5457±172	3,90±0,05	213±6
	<i>VV</i>	4	0,174			5220±150	3,94±0,03	206±5
Повільний	<i>LL</i>	11	0,500	<i>L</i> -0,705 <i>V</i> -0,295	0,268	5155±189	3,92±0,04	202±7
	<i>LV</i>	8	0,409			4811±130	3,98±0,06	191±6
	<i>VV</i>	2	0,091			5836±201	4,07±0,06	237±4
У середньому	<i>LL</i>	20	0,444	<i>L</i> -0,644 <i>V</i> -0,356	0,458	5102±119	3,90±0,03	199±4
	<i>LV</i>	18	0,400			5170±134	3,94±0,04	204±5
	<i>VV</i>	6	0,156			5425±169	3,98±0,04	216±7

**Висновки та перспективи досліджень.** Вивчені поліморфні системи локусів гормонів корів молочних порід мають різну активність щодо росту організму тварин цих порід, кількість створюваного ними молока та його насиченість молочним жиром, в чому і проявляється

диференціація порід залежно від індивідуальних особливостей їх організму. Частка бажаної *T*-форми гена лептину в середньому становить 37,8 %, здебільшого на користь тварин швидкої інтенсивності формування організму. Бажаний алель *L*, гена гормону росту становить більше 60 %, при чому по ЧС породі більша частка припадає на представниць швидкої інтенсивності формування організму, в той час коли у УЧМ та УЧРМ групах вищі його значення відмічаються у аналогів повільної швидкості росту, що і відобразилось на продуктивних якостях цих тварин.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бірюкова О.Д. Прикладні аспекти використання геномної селекції в стаді української червоно-рябої молочної породи / О.Д. Бірюкова, К.В. Копилова // Зб. наук. праць ПДАТУ. – Кам'янець-Подільський, 2012. – Вип.20. – С. 23–25.
2. Драгулян М.В. Вплив поліморфізму генів *ESR* та *PRLR* на відтворювальні якості свиноматок української м'ясної та уельської порід / М.В. Драгулян, С.О. Костенко, О.В. Сидоренко // Зб. наук. праць ВНАУ. – Вінниця, 2012. – Вип.3(61). – С. 88–95.
3. Коваленко В.П. Молочна продуктивність корів в залежності від інтенсивності їх росту / В.П. Коваленко // Науково-технічний бюлетень. – Харків, 2001. – №30. – С. 71–73.
4. Лобан Н.А. Метод повышения продуктивных качеств свиней с использованием маркерных генов / Н.А. Лобан // Вестник аграрной науки Причерноморья. – Николаев: МДАУ, 2010. – Ч.1, Вип.3(55), Т.2. – С. 117–128.
5. Поліморфізм генів, асоційованих з господарсько корисними ознаками у великої рогатої худоби / К. В. Копилова, К. В. Копилов, С. І. Тарасюк, О. І. Метлицька // Вісник аграрної науки : Науково-теоретичний журнал НААН України. – 2006. – №10 (642). – С. 52–58.
6. An association of growth hormone, *K*-casein,  $\beta$ -lactoglobulin, leptin and *Pit-1* loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle / [L. Zwierzchowski, J. Oprzadek, E. Dymnicki, P. Dzierzbicki] // Animal Science Papers and Reports – 2001. – V.19. – P. 65–78.
7. Di Stasio L. Lack of association of *GHI* and *Pouflf* gene variants with meat production traits in Piemontese cattle / L. Di Stasio, S. Saratore, A. Alberta // Animal Genetics. – 2002. – V.33. – P. 61– 64.
8. Dybus, A. Associations of growth hormone (*Gh*) and prolactin (*Prl*) genes polymorphisms with milk production traits in Polish black-and-white cattle / A. Dybus // Anim. Sci. Papers Reports. – 2002. – Vol.20. – P. 203–212.
9. Effects of polymorphism of growth hormone (*GH*), *Pit-1* and leptine (*LEP*) genes, cow's age, lactation stage, and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black and White cows / [L. Zwierzchowski, J. Krzyzewski, N. Strzalkowska et al.] // Animal science. – 2002. – №4., Vol.20. – P. 213–227.
10. Fontanesy L. Investigation of allele frequencies of the growth hormone receptor (*GHR*) *F279Y* mutation in dairy and dual purpose cattle breeds / L. Fontanesy // Ital. J. Anim. Sci. – 2007. – Vol.6. – P. 415–420.
11. Harris H. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics / H. Harris, D.A. Hopkinson. – Amsterdam : North-Holland Publ. Comp., 1976. – 680 p.
12. Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism / [D. Pomp, T. Zou, A.C. Clutter, W. Barendse] // J Anim Sci. – 1997. – №5. – P. 1427.
13. Sadeghi, M. Effect of leptin gene polymorphism on the breeding value of milk production traits in Iranian Holstein / M. Sadeghi, M. Moradi Shahr Babak, G. Rahimi // Animal. – 2008. – № 7, V.2. – P. 999–1002.

#### **Вариабельность ДНК-полиморфизма структурных генов гормона роста и лептина у коров разных типов формирования организма**

**А.В. Городна, Е.И. Каратеева**

Изучено сравнительный анализ ДНК-полиморфизма структурных генов *LEP*, *GH* и их влияние на признаки молочной продуктивности в зависимости от интенсивности формирования организма животного. Установлена возможность применения генетических маркеров в селекции коров разных пород молочного направления продуктивности.

**Ключевые слова:** интенсивность формирования организма, полиморфизм, локус, лептин, соматотропин.

#### **Comparative analysis of dnc polymorphism of the structural genes of growth hormone and leptin in cows different types of forming organism**

**A. Gorodna, O. Karateeva**

Studied comparative analysis of DNC polymorphism of structural genes *LEP*, *GH* and their effect on milk yield signs, depending on the intensity of the formation of the animal. The possibility of the use of genetic markers in breeding cows of different breeds of dairy production.

**Key words:** the intensity of the formation of the body, polymorphism, locus, leptin, growth hormone.