

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО ГЕНУ *CAPN1* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

В статье представлены данные экспериментальных исследований по использованию современных ДНК-технологий в животноводстве на основе молекулярно-генетических методов, которые позволяют тестировать животных любого возраста и пола, оценивать и прогнозировать их продуктивность. Выявлено, что наиболее желательным является СС аллельная форма гена *CAPN1*, отвечающего за формирование нежности мяса.

Ключевые слова: ДНК, молекулярная генетика, полимеразная цепная реакция (ПЦР-PCR), ПЦР в реальном времени (PCR-RT), ген *CAPN1*, генотип.

Последние десятилетия ознаменовались изменением в подходах к совершенствованию домашних животных. Традиционно данные работы включали, как правило, многолетние наблюдения за продуктивными качествами отдельных особей с выявлением улучшителей и использование их в селекции. С развитием ДНК-технологий и накоплением фактического материала стало возможным через оценку генотипа в рамках концепции ген-маркеров признаков изучить все многообразие фенотипических форм и выявить желательные [1].

Наиболее перспективным методом выявления маркеров различных генов оказался метод полимеразной цепной реакции (Polymerase chain reaction-PCR). ПЦР – это метод, который позволяет проверить генетический материал, экстрагированный из исследуемого клинического образца, на наличие в его составе участка чужеродной или измененной генетической информации, что используется для получения копий непротяженных участков ДНК исследуемого генетически обусловленного признака и, кроме того, для визуализации (в случае присутствия) таких специфических участков, что и является целью генодиагностики [2].

В связи с этим массовое внедрение в животноводство ДНК-технологий позволяет изучить гены-маркеры животных, которые контролируют и прогнозируют важные функции у животных, такие как рост, уровень удоя и качество молока, качество мяса. Одним из таких генов является ген *CAPN1*, ответственный за формирование нежности мяса [3].

Нежность в качестве признака можно определить как степень жесткости мышечных волокон. Ученые предполагают, что нежность мяса связана со структурой мышц или их протеинами. Положительное влияние на нежность мяса оказывает гликоген (животный сахар). После убоя животных он переходит в молочную кислоту, которая при достаточно длительном воздействии размягчает соединительную ткань. Нежность мяса зависит от содержания в мышцах соединительной ткани. Растворимость коллагена снижается с возрастом животных, и мясо становится более жестким [4].

С генетической точки зрения нежность мяса обусловлена действием трех различных генов, ответственных за синтез миостатина, кальпаина и кальпастеина. Ген кальпаина – *CAPN1*, кальций-зависимой протеазы, которая модифицирует мышечную ткань во время послеубойного созревания мяса, – член широкого семейства цитозольных Ca^{2+} -активируемых цистеиновых протеаз, обладающих структурой EF-hand. Этот фермент разрезает множество внутриклеточных белков, модифицируя их функции, таким образом участвуя в нейродегенеративных процессах и апоптозе. Данный тип ферментов также разрушает белки цитоскелета и другие примембранные белки. Действие этой нейтральной протеазы практически необратимо, что, по-видимому, является одной из причин опасности длительного повышения уровня Ca^{2+} в цитозоле. Для большей надежности кальпаин контролируется кальпастином, который не только ингибирует его ак-

тивность, но также предотвращает его связывание с мембранами [5].

САРN1 кодируется большой субъединицей м-кальпаина. Этот ген состоит из 22 экзонов и имеет размер около 30 т.н.п. В кодирующей части этого гена ранее было обнаружено две несинонимические замены, которые приводили к изменениям в аминокислотной последовательности в положениях 316 (глицин на аланин) и 530 (валин на изолейцин). В нуклеотидной последовательности это были замены С на G и А на G. Желательными аллельными формами, обеспечивающими получение мяса повышенной нежности, являются C_{316} и G_{530} , и животные, гомозиготные по этим аллелям, представляют наибольший интерес для исследования [6].

На основании вышеизложенного целью нашего исследования является оценка встречаемости животных с желательными аллельными формами гена САРN 1 с помощью полимеразной цепной реакции при использовании генетических маркеров.

Материалы и методы

Объектом исследований являлись животные калмыцкой (n=119) и казахской белоголовой (n=39) пород крупного рогатого скота. Для определения полиморфизма гена САРN1 у подопытных животных были отобраны пробы крови. Кровь, полученную из яремной вены животных, вносили в пробирки с 600 мкл этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) до конечного объема 10 мл. Выделение ДНК из крови проводили с использованием комплекта реагентов для выделения геномной ДНК из цельной крови «ДНК-Экстран-1» («Синтол», Россия). Для амплификации фрагмента гена САРN1 использовались праймеры:



ПЦР в реальном времени проводили на программируемом амплификаторе АНК-32 в объеме реакционной смеси 25 мкл, содержащей 60 мМ трис-НСl (рН 8,5), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ меркаптоэтанол; 0,1 мМ тритон X-100; 0,2 мМ дНТФ, 1 ед. Таq ДНК полимеразы, по 0,5 мкМ каждого из праймеров. Амплификацию гена САРN1 проводили по следующему режиму:

1. 95 °С – 120 сек x 1;
2. 64 °С – 40 сек x 40;
3. 95 °С – 20 сек x 40.

Частоту встречаемости генотипов определяли по формуле:

$$p = n/N,$$

где p – частота определения генотипа, n – количество особей, имеющих определенный генотип, N – число особей.

Частоту отдельных аллелей определяли по формуле:

$$pA = (2nAA + nAB) : 2N,$$

$$qB = (2nBB + nAB) : 2N,$$

где pA – частота аллеля А,

qB – частота аллеля В,

N – общее число аллелей.

По закону Харди-Вайнберга рассчитывали ожидаемые результаты частот генотипов в исследуемой популяции.

Полученные результаты в ходе научных исследований обработаны биометрическим методом с использованием стандартных программ.

Результаты и обсуждения

Методом ПЦР в реальном времени было исследовано наличие полиморфизма С316G гена САРN1, частота его встречаемости среди калмыцкой и казахской белоголовой пород КРС и возможность его использования для генотипирования (рисунок 1).

При анализе 39 образцов ДНК животных казахской белоголовой породы выявлено, что 10,3% имели желательную форму аллеля (СС), а 2,6% составляли гетерозиготы GC, у остальных выявлен аллель GG (87,2%).

Анализ проб животных калмыцкой породы показал большую встречаемость желательных генотипов, а именно среди 122 образцов ДНК было выявлено животных с генотипом СС 19,67%, с генотипом GC 14,75% и с генотипом GG 80,00%.

Из 52 биопроб, взятых у крупного рогатого скота каргалинского мясного типа, было выявлено 17,31% животных с генотипом СС, 32,69% гетерозигот (GC) и 50,00% с генотипом GG (табл. 1).

Анализ полученных результатов показал существенные различия соотношения животных разных генотипов в отдельных популяциях. Так, у животных калмыцкой породы частота желательных

тельного генотипа СС выше, чем у аналогов казахской белоголовой породы на 9,41%, а по сравнению с каргалинским мясным типом – на 2,36%. Превосходство животных каргалинского мясного типа над казахскими белоголовыми составило 7,05%. При этом полученные различия по количеству желательных гомозиготных генотипов СС не были достоверными. При сравнении между собой частот гетерозигот в исследуемых популяциях установлено, что наивысшими показателями по частоте встречаемости генотипов GC оказались животные каргалинского мясного типа, а разность с калмыцкими аналогами составила 17,94% ($P < 0,05$) и с гетерозиготами казахской белоголовой породы 30,13% ($P < 0,001$). В свою очередь, различия между частотой гетерозигот калмыцкой и казахской белоголовой пород составили 12,19% ($P < 0,01$). Наличие у животных калмыцкой породы и каргалинского мясного типа желательного признака и относительно высокую частоту его встречаемости можно объяснить гетерогенностью данных породы и типа.

По частоте аллелей исследуемые микропопуляции имеют определенные различия (табл. 2).

Частоты встречаемости аллелей С и G у особей каргалинского мясного типа составили 0,337 и 0,663 соответственно. Что касается частоты встречаемости аллелей у особей калмыцкой породы, то для аллеля С она составила 0,270, а аллеля G – 0,729.

Проведенными исследованиями установлено достаточно высокое количество гетерозигот,

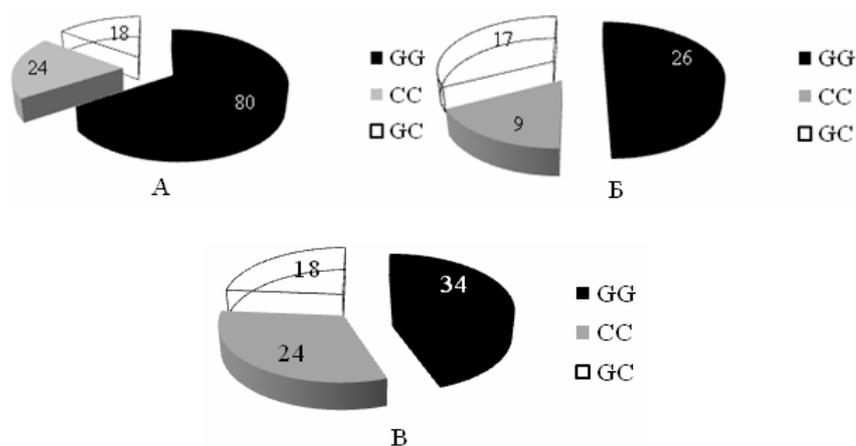
а частота встречаемости желательного аллеля С составляет 0,337, что в 1,25 раза выше по сравнению с микропопуляцией калмыцкого и в 2,93 раза – казахского белоголового скота.

Это может быть связано с тем, что калмыцкая порода имеет общие корни с индийским зебу и представляет собой переходную форму между европейским и азиатским скотом. Калмыцкий скот зачастую используется в качестве основы для создания новых пород. Так, например, казахская белоголовая порода была получена при скрещивании быков герефордской породы с маточным поголовьем местного казахского и калмыцкого скота. Это объясняет наличие исследуемого полиморфизма среди особей казахской белоголовой породы, несмотря на то, что в исследуемой популяции казахского белоголового скота частота встречаемости генотипов, несущих желательный аллель С, составляет всего лишь 0,115, в то время как в популяции калмыцкой породы этот показатель равен 0,270, то есть более чем в 2 раза выше.

При расчете количества желательных генотипов, возникающих на основе случайного сочетания аллелей в одном аутосомном локусе было установлено, что в микропопуляции калмыцкого скота этот показатель составил 177 голов, тогда как фактическое их количество составило 42 головы. В микропопуляциях скота казахской белоголовой породы и каргалинского мясного типа эти показатели соответственно составили 4,5 и 5 голов; 309 и 34 головы.

На основании этого можно предположить, что с увеличением фактического количества гетерозигот в микропопуляции теоретически существует большая вероятность получения желательных генотипов. Генетическая изменчивость в популяциях калмыцкой породы и каргалинского мясного типа теоретически намного выше, по сравнению с их морфологической изменчивостью.

Другой мерой генетической изменчивости является доля гетерозигот в популяции. При изучении



А – Калмыцкая порода; Б – Казахская белоголовая порода; Б – Каргалинский мясной тип

Рисунок 1. Частота встречаемости генотипов гена CAPN 1

Таблица 1. Частота встречаемости желательных генотипов в анализируемых микропопуляциях

Порода	n	Частота генотипов, %		
		CC	GC	GG
Калмыцкая	122	19,67±3,60	14,75±3,21	65,57±4,30
Казахская белоголовая	39	10,26±4,86	2,56±2,53	87,18±5,35
Каргалинский мясной тип	52	17,31±5,25	32,69±6,50	50,00±6,93

Таблица 2. Частоты аллелей гена CAPN1 в исследуемых популяциях

Порода	n	Частота аллеля		χ^2
		C	G	
Калмыцкая	122	0,270	0,730	0,63
Казахская белоголовая	39	0,115	0,885	0,61
Каргалинский мясной тип	52	0,337	0,663	0,126

данного вопроса проводилась оценка ожидаемой гетерозиготности ($H_{\text{ожд.}}$) по частотам аллелей. На основе теоретических предпосылок популяционной генетики на основании соотношения Харди-Вайнберга частоты гомозигот в популяции равны квадратам частот аллелей. Так как сумма частот гомо- и гетерозиготных генотипов равна 1.

Исследованиями установлено, что ожидаемая гетерозиготность по изучаемым локусам в микропопуляции калмыцкого скота составила $0,395 \pm 0,040$. Смещение фактической гетерозиготности по сравнению с ожидаемой составило $0,247$ ($P < 0,001$). В микропопуляции скота казахской белоголовой породы ожидаемая гетерозиготность составила $0,204 \pm 0,0518$, тогда как фактическая частота гетерозигот была $0,026$, а разность между этими показателями – $0,178$ ($P < 0,001$). При анализе микропопуляции кар-

галинского мясного типа ожидаемая гетерозиготность составила $0,447 \pm 0,0404$, при этом смещение в большую сторону по сравнению с фактической частотой встречаемости гетерозигот составило $0,120$ ($P < 0,001$).

Необходимо отметить, что во всех анализируемых микропопуляциях нарушено генное равновесие из-за смещения фактического и теоретически ожидаемого количества гетерозигот. Кроме того, этому способствовало давление искусственного отбора животных и направленного подбора пар быков и коров для скрещивания.

Таким образом, применение метода ПЦР в реальном времени при исследовании полиморфизма гена CAPN1 позволило выявить животных с желательными аллельными вариантами в микропопуляциях и изучить их генетические особенности.

14.05.2012

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы по гранту № 16.740.11.0676 от 07.06.2011 г.

Список литературы:

1. Глазко И.В., Дунин И.М. Введение в ДНК-технологии /И.В. Глазко, И.М. Дунин. – М: ФГНУ «Росинформагротех», 2001. – 436 с.
2. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова // Генетика. – 2002. – Т. 38. – С. 1173–1195.
3. Bruford M.W., Bradley, D.G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication / M.W. Bruford, D.G. Bradley // Nature Reviews Genetics. – 2003. – №4. – P. 900–910.
4. Pariset L., Cappuccio I., Joost S., D'Andrea M.S., Marletta D., Ajmone Marsan P. Characterization of single nucleotide polymorphisms in sheep and their variation as an evidence of selection / L. Pariset, I. Cappuccio // Animal Genetics. – 2006. – №37. – P. 290–292.
5. Хлесткина Е.К., Салина Е.А. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы // Генетика. – 2006. – Т. 42. – С. 725–736.
6. Игнатов А.Н., Кугуники Я., Супрунова Т.П. и др. RAPD-маркеры, сцепленные с локусом устойчивости к расе 4 возбудителя сосудистого бактериоза у Brassica rapa L. / А.Н. Игнатов // Генетика. – 2000. – Т. 36. – С. 357–360.

Сведения об авторах:

Косян Дианна Багдасаровна, магистр кафедры общей биологии
Оренбургского государственного университета, e-mail: kosyan.diana@mail.ru

Русакова Елена Анатольевна, аспирант кафедры общей биологии
Оренбургского государственного университета, e-mail: inst_bioelement@mail.ru

Кван Ольга Вилориевна, научный сотрудник института биоэлементологии
Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук,
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, тел. (3532) 372482, e-mail: kwan111@yandex.ru

Сурундаева Любовь Геннадьевна, руководитель лаборатории генетической экспертизы и книг
племенных животных ГНУ ВНИИМС РАСХН, кандидат биологических наук

Маевская Людмила Анатольевна, научный сотрудник лаборатории генетической экспертизы и книг
племенных животных ГНУ ВНИИМС РАСХН, кандидат биологических наук
460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел. (3532) 774641, e-mail: vniims.or@mail.ru

UDC 575.63

Kosyan D.B., Surundaeva L.G., Mayevskaya L.A., Rusakova, E.A., Kvan O.V.

E-mail: kosyan.diana@mail.ru; vniims.or@mail.ru; inst_bioelement@mail.ru; kwan111@yandex.ru

USING PCR FOR GENOTYPING CATTLE CAPN1 THE GENE USING GENETIC MARKERS

The paper presents results of experimental studies on the use of DNA technology in farming, on the basis of molecular genetic techniques that allow the testing of animals of any age and gender, to assess and predict their productivity. Revealed that the SS is the most desirable form of the gene allele CAPN1, responsible for the formation of the tenderness of meat.

Key words: DNA, molecular genetics, polymerase chain reaction (RT-PCR-PCR), real-time PCR (PCR-RT), a gene CAPN1, genotype.

Bibliography:

1. Glazko I.V., Dunin I.M. Introduction to DNA-tehnology / I.V. Glazko, I. Dunin. – Moscow: Federal State «Rosinformagroteh», 2001. – 436 p.
2. Altukhov Yu.P., Salmenkova E. DNA polymorphism in population genetics / Yu.P. Altukhov, E. Salmenkova // Genetics. – 2002. – T. 38. – P. 1173–1195.
3. Bruford M.W., Bradley D.G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication / M.W. Bruford, D.G. Bradley // Nature Reviews Genetics. – 2003. – №4. – P. 900–910.
4. Pariset L., Cappuccio I., Joost S., D'Andrea M.S., Marletta D., Ajmone Marsan P. Characterization of single nucleotide polymorphisms in sheep and their variation as an evidence of selection / L. Pariset, I. Cappuccio / Animal Genetics. – 2006. – №37. – P. 290–292.
5. Khlestkin E.K., Salina E.A. SNP-markers: methods of analysis, methods development and comparative analysis of the example of wheat // Genetics. – 2006. – Vol. 42. – P. 725–736.
6. Ignatov A., Kuguniki J., Suprunova T.P. and other RAPD-markers linked to the locus of resistance to race 4 pathogen in vascular bacteriosis Brassica rapa L. / A.N. Ignatov // Genetika. – 2000. – Vol. 36. – P. 357–360.