

УДК 636.082.11

Г.К. Байдильдинова*, С.С. Рахманов

ТОО «Казакский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства»,
 Казакстан, г. Алматы
 *e-mail: baidildag@mail.ru

Исследование полиморфизма генов молочной продуктивности чёрно-пёстрой породы крупного рогатого скота Казакстана

Исследование было направлено на идентификацию желаемых аллелей генов, ответственных за качество молока и молочную продуктивность. Образцы ДНК были выделены из образцов крови 20 голов голштинской породы крупного рогатого скота (эко типа «Сайрам») для идентификации и генотипирования генов каппа-казеина, пролактина, соматотропина и тиреоглобулина методом ПЦР-ПДРФ. Была высчитана частота встречаемости генотипов и аллелей интересующих генов. Согласно предыдущим исследованиям ВВ генотип гена каппа-казеина, GG генотип гена пролактина, VV генотип гена соматотропина и ТТ генотип гена тиреоглобулина являются важными факторами в увеличении молочной продуктивности и также отвечают за его качество. Результаты исследования могут быть использованы для выведения более ценных особей.

Ключевые слова: ген, генотип, маркер-ассоциированная селекция, каппа-казеин, пролактин, тиреоглобулин, соматотропин.

Г.К. Байдильдинова, С.С. Рахманов

Қазакстанның қара-шұбар тұқымды ірі қара малының сүт өнімділігі генінің полиморфизмін зерттеу

Зерттеулер сүт сапасы мен сүт өнімділігіне жауапты гендердің аллельдерін идентификациялау бағытында жүргізілді. Голштинская тұқымның («Сайрам» эко типі) 20 бас ірі қара малының қанынан каппа-казеин, пролактин, соматотропин және тиреоглобулин гендерін идентификациялау және генотиптеу үшін ПТР-ПДРФ әдісімен ДНК бөлініп алынды. Қызықтырушы гендердің генотиптері мен аллельдерінің жиілігі есептелді. Бұдан бұрынғы зерттеулерде каппа-казеин генінің ВВ генотипі, пролактин генінің GG генотипі, соматотропин генінің VV генотипі және тиреоглобулин генінің ТТ генотипі сүт өнімділігін арттыруда және оның сапасына жауап беруші маңызды фактор болатындығы анықталды. Зерттеу нәтижелерін құнды түрлер алу үшін пайдалануға болады.

Түйін сөздер: ген, генотип, маркер-ассоциацияланған селекция, каппа-казеин, пролактин, тиреоглобулин, соматотропин.

G.K. Baidildinova, S.S. Rakhmanov

Research of dairy productivity gene polymorphism of Holstein breeds in Kazakhstan

The research focuses on the identification of desirable gene's alleles responsible for milk quality and milk production. DNA was extracted from 20 blood samples of 20 Holstein ("Sayram" local ecotype) for identification and genotyping of kappa-casein, prolactin, somatotropin, and thyroglobulin genes by PCR-RFLP. The frequency of desirable genes and alleles was calculated. According to the previous studies BB genotype of kappa-casein gene, GG genotype of prolactin gene, VV genotype of growth hormone gene, and TT genotype of thyroglobulin's gene are important factors in increasing milk yield and quality and the results of this study could be used in creating the next generation of valuable animals.

Key words: gen, genotype, marker assisted selection, kappa-casein, prolactin, thyroglobulin, somatotropin.

Введение

Животноводство на сегодняшний день является одной из самых рентабельных сфер агропромышленного сектора республики. Благодаря

животноводству, реализуется возможность обеспечения населения такими продуктами питания как молоко, мясо, яйца, кисломолочные продукты, сыры, колбасы и др. [1].

Помимо того, что эта отрасль производит чуть менее половины от общего ВВП сельского хозяйства, она также является важной для экономики и развития села, т.к. обеспечивает население рабочими местами и, соответственно, доходом [1].

Казахстан не ограничен в земельных ресурсах, что является несомненным преимуществом в развитии животноводства. Однако на сегодняшний день скотоводство в Казахстане продолжает развиваться экстенсивными методами, а производство молока по-прежнему носит сезонный характер [1]. Очевидно, что необходимо внедрение новых, основанных на научных исследованиях, методов, к которым относится маркер-ассоциированная селекция.

Маркер-ассоциированная селекция или MAS (marker assisted selection) – это комбинированный продукт традиционной генетики и молекулярной биологии. MAS позволяет отбирать гены, кодирующие интересующие признаки. Используя метод полимеразной цепной реакции полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, возможно будет генотипирование крупного рогатого скота молочного направления продуктивности. Селекция будет проводиться на научной основе, что позволит выявить наиболее желательных особей для скрещивания. Результатом будет повышение продуктивности и увеличение объемов получаемого молока [2].

Материалы и методы

Сбор образцов и экстракция ДНК.

Образцы крови были получены от 20 голов крупного рогатого скота голштинской породы местного экотипа «Сайрам» согласно стандартной инструкции [3]. Данные образцы были собраны в пробирки, содержащие EDTA в качестве антикоагулянта.

Пробирки хранились при температуре -20°C до этапа выделения ДНК. Геномная ДНК выделялась из 100 мкл крови. Для экстракции дезоксирибонуклеиновой кислоты использовался набор для выделения ДНК (Promega Inc., Madison, Wisconsin, USA), который применялся согласно инструкции производителя.

Электрофорез и спектрофотометр использовались для определения качества и количества выделенной ДНК.

Дизайн праймеров.

Дизайн и синтез праймеров осуществлялся для генов, отвечающих за молочную продук-

тивность: гормон роста каппа-казеин (bCSN3), пролактин (bPRL), соматотропин (bGH) и тиреоглобулин (bTG) с помощью программного обеспечения DNAMAN и PrimerPlex, нуклеотидные последовательности были взяты с сайта Национального центра биотехнологических исследований (National Center for Biotechnology Research, USA).

ПЦР-ПДРФ анализ.

Генотипирование генов осуществлялось с помощью полимеразной цепной реакции полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Из геномной ДНК были амплифицированы участки вышеуказанных генов bCSN3, bPRL, bGH, и bTG. Последовательности праймеров, используемых при ПЦР для генов, желательный генотип и полиморфные сайты указаны в таблице 1.

Амплифицируемая смесь была общим объемом 25 мкл, которая содержала 100 нг ДНК, 0.4 мкМ каждого праймера, ПЦР-буфер, 2.5 мМ MgCl_2 , 200 мМ дНТП и 1 единица Taq-полимеразы.

Вначале проводилась общая денатурация при температуре 95°C в течение 3 минут, затем шли 35 циклов 95°C 30 секунд, 58°C 30 минут, 72°C 1 минута и финальная элонгация при 72°C в течение 7 минут. Для рестрикции амплифицированных фрагментов использовались рестриктазы: каппа-казеин – HindIII, пролактин – RsaI, соматотропин – AluI, тиреоглобулин – BstYI. Общий объем для рестрикции был 20 мкл (10 мкл ПЦР-продукта, 2 мкл буфера для фермента, 0.5 мкл фермента, 7.5 мкл бидистиллированной воды). Реакция проводилась при 37°C в течении 4 часов согласно инструкции производителя (Promega Inc., Madison, Wisconsin, USA).

Электрофорез ДНК осуществлялся согласно стандартному протоколу [14].

Результаты и их обсуждение

ПЦР продукт гена каппа-казеина дает фрагмент ДНК длиной 453 п.о., который рестрикционной эндонуклеазой HindIII разрезается на фрагменты длиной 351 и 102 п.о. Желательным является генотип ВВ, которому соответствует фрагмент, подвергающийся рестрикции. Менее ценный генотип АА остается целым.

Рестрикционная эндонуклеаза BstYI делит ген тиреоглобулина 473 п.о. на части длиной 295 и 178 п.о. Целый участок означает, что особь является гомозиготой ТТ. Гомозигота с альтерна-

Таблица 1 – Гены молочной продуктивности, желательный генотип и последовательность праймеров

Ген	Предпочти- тельный/нежела- тельный генотип	Наличие при предпочтительном генотипе сайта рестрикции	Последовательность праймеров
1	2	3	4
каппа-казеин	BB/AA	присутствие	bCSN3-F: 5'-CAC GTC ACC CAC ACC CAC ATT TAT C-3' bCSN3-R: 5'-TAA TTA GCC CAT TTC GCC TTC TCT GT-3'[4]
Пролактин	GG/AA	отсутствие	bPRL-F: 5'-CGA GTC CTT ATG AGC TTG ATT CTT- 3' bPRL-F: 5'-GCC TTC CAG AAG TCG TTT GTT TTC- 3' [5, 6, 7, 8]
Соматотропин	VV/LL	присутствие	bGH-F: 5'-CCG TGT CTA TGA GAA GC -3' bGH-R: 5'-GTT CTT GAG CAG CGC GT -3'[9, 10, 11]
Тиреоглобулин	TT/CC	отсутствие	bTG-F: 5'-GGG GAT GAC TAC GAG TAT GAC TG-3' bTG-R: 5'-GTG AAA ATC TTG TGG AGG CTG TA- 3'[12, 13]

Таблица 2 – Количество и частота генотипов и аллелей

Ген	Генотип	Количество голов	Частота генотипа, %	Аллель	Частота аллели, %
bCSN3	BB	3	15.0	B	40.0
	AB	10	50.0	A	60.0
	AA	7	35.0		
bPRL	GG	3	15.0	G	55.0
	AG	12	60.0	A	45.0
	AA	5	25.0		
bGH	VV	2	10.0	V	40.0
	VL	12	60.0	L	60.0
	LL	6	30.0		
bTG	TT	2	10.0	T	47.5
	CT	15	75.0	C	52.5
	CC	3	25.0		

тивными аллелями CC является нежелательной для скрещивания.

Ген пролактина рестриктазой RsaI режется на фрагменты по 162 и 132 п.о., в то время как целый ген имеет длину 294 п.о. Также, как и в случае с тиреоглобулином, целый фрагмент, не подвергшийся рестрикции говорит о предпочтительном генотипе. В случае с пролактином это GG, альтернативный генотип – AA.

Ген гормона роста подвергается рестрикции ферментом AluI на фрагменты 173 и 35, что соответствует VV генотипу. Целый ген – 208 п.о. – это LL генотип. Особи с генотипом VV имеют больший потенциал в производстве молока.

Частота встречаемости генотипов AA, AB и BB каппа-казеина составляет 0.35, 0.50 и 0.15, аллелей A и B – 0.60 и 0.40. Частота встречаемости генотипов AA, AG и GG гена пролактина

– 0.25, 0.60 и 0.15, аллелей A и G – 0.45 и 0.55. Частота встречаемости генотипов LL, LV и VV гена соматотропина – 0.30, 0.60 и 0.10, аллелей L и V – 0.60 и 0.40. Частота встречаемости генотипов CC, CT и TT гена тиреоглобулина составляет 0.25, 0.75 и 0.10, аллелей C и T – 0.52 и 0.48.

Таким образом, общий процент голов с наиболее ценным генотипом составляет около 10-15%, также в скрещивании можно использовать особи с гетерозиготным генотипом, процент численности которых может достигать более 50% от общего количества поголовья (50-75%). Результаты исследования могут быть использованы для выведения в следующих поколениях особей, отличающихся повышенными объемами получаемого от них молока, а также улучшенными показателями качества молока.

Литература

- 1 Шимова И. Развитие животноводческой отрасли в Республике Казахстане – 2011. /http://www.rusnauka.com/3_ANR_2012/Economics/12_99507.doc.htm
- 2 Zeller M. From Mendel to Markers. Iowa: ISU Extension Iowa State University, 2005. – 228 p.
- 3 Torehanov A.A., Musabayev B.I., Vetrinskaya A.A., Orazymbetova Z. AFLP method for identification and traceability of equine DNA. Guidance, Almaty, 2011.
- 4 Doosti A., Arshi A., Vatankhah M., Amjadi P. Kappa-casein gene polymorphism in Holstein and Iranian native cattle by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10, N. 25. – P. 4957-4960.
- 5 Dybus A., Grzesiak W., Kamieniecki H., Szatkowska I., Sobek Z., Blaszczyk P., Czerniawska-Piatkowska E., Zych S., Muszynska M. Association of genetic variants of bovine prolactin with milk production traits of Black-and-White and Jersey cattle // 2005. – Vol. 37. – P. 149-156.
- 6 Lazebnaya I., Lazebny O., Khatami S., Sulimova G. Use of the Bovine Prolactin Gene (bPRL) for Estimating Genetic Variation and Milk Production in Aboriginal Russian Breeds of Bos Taurus L / <http://dx.doi.org/10.5772/54756>
- 7 Перчун А., Лазебная И., Белокуров С., Рузина М., Сулимова Г. Полиморфизм генов CSN3, bPRL и bGH у коров костромской породы в связи с показателями молочной продуктивности // Фундаментальные исследования. – 2012. – №11. – С. 304-308.
- 8 Kumari A., Singh K., Soni K., Patel R., Chauhan J., Rao K. Genotyping of the polymorphism within exon 3 of prolactin gene in various dairy breeds by PCR RFLP // – 2008. – Vol. 3. – P. 298-299.
- 9 Михайлова М. Е, Белая Е. В, Волчок Н. М. Влияние полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада (bPit-1, bPrl, bGH, bGHR, bIGF-1) на признаки молочной продуктивности крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусского разведения. // Доклады Национальной академии наук Беларуси/ – 2011. – Т. 55, № 2. – С. 63-69.
- 10 Урядников М. В. Связь полиморфизма генов каппа-казеина и гормона соматотропина с хозяйственно-полезными признаками коров черно-пестрой породы: автореф. ... к. б. н. 06.02.07 / Великолукская государственная сельскохозяйственная академия. Великие Луки, 2011. 31 с.
- 11 Dolmatova I., Ilyasov I. Association of Cattle Growth Hormone Gene Polymorphism with Milk Productivity// Animal Genetics – 2011. – Vol. 47. – P. 814-820.
- 12 Patent 6,383,751 B1US, Assessing lipid metabolism / Barendse W. – 2002.
- 13 Yardibi H., Gursel F., Ates A., Akis I., Hosturk G., Oztabak K. Anatolian red cattle breed and South Anatolian red cattle breed // African Journal of Biotechnology – 2013. – Vol. 12, N. 20. – P. 2802-2807.
- 14 Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, NY, 1982.

Reference

- 1 Ashimova I. Razvitie zhivotnovodcheskoy otrasli v Respublike Kazahstane – 2011. /http://www.rusnauka.com/3_ANR_2012/Economics/12_99507.doc.htm
- 2 Zeller M. From Mendel to Markers. Iowa: ISU Extension Iowa State University, 2005. – 228 p.
- 3 Torehanov A.A., Musabayev B.I., Vetrinskaya A.A., Orazymbetova Z. AFLP method for identification and traceability of equine DNA. Guidance, Almaty, 2011.
- 4 Doosti A., Arshi A., Vatankhah M., Amjadi P. Kappa-casein gene polymorphism in Holstein and Iranian native cattle by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10, N. 25. – P. 4957-4960.
- 5 Dybus A., Grzesiak W., Kamieniecki H., Szatkowska I., Sobek Z., Blaszczyk P., Czerniawska-Piatkowska E., Zych S., Muszynska M. Association of genetic variants of bovine prolactin with milk production traits of Black-and-White and Jersey cattle // 2005. – Vol. 37. – P. 149-156.
- 6 Lazebnaya I., Lazebny O., Khatami S., Sulimova G. Use of the Bovine Prolactin Gene (bPRL) for Estimating Genetic Variation and Milk Production in Aboriginal Russian Breeds of Bos Taurus L / <http://dx.doi.org/10.5772/54756>
- 7 Perchun A., Lazebnaya I., Belokurov S., Ruzina M., Sulimova G. Polimorfizm genov CSN3, bPRL i bGH u korov kostromskoy porodyi v svyazi s pokazatelyami molochnoy produktivnosti // Fundamentalnyie issledovaniya. – 2012. – #11. – S. 304-308.
- 8 Kumari A., Singh K., Soni K., Patel R., Chauhan J., Rao K. Genotyping of the polymorphism within exon 3 of prolactin gene in various dairy breeds by PCR RFLP // – 2008. – Vol. 3. – P. 298-299.
- 9 Mihaylova M. E, Belaya E. V, Volchok N. M. Vliyanie polimorfnyih variantov genov somatotropinovogo kaskada (bPit-1, bPrl, bGH, bGHR, bIGF-1) na priznaki molochnoy produktivnosti krupnogo rogatogo skota cherno-pestroy porodyi belorusskogo razvedeniya. // Dokladyi Natsionalnoy akademii nauk Belarusi/ – 2011. – Т. 55, # 2. – S. 63-69.
- 10 Uryadnikov M. V. Svyaz polimorfizma genov kappa-kazeina i gormona somatotropina s hozyaystvenno-poleznyimi priznakami korov cherno-pestroy porodyi: avtoref. ... к. б. н. 06.02.07 / Velikolukskaya gosudarstvennaya selskohozyaystvennaya akademiya. Velikie Luki, 2011. 31 s.
- 11 Dolmatova I., Ilyasov I. Association of Cattle Growth Hormone Gene Polymorphism with Milk Productivity// Animal Genetics – 2011. – Vol. 47. – P. 814-820.
- 12 Patent 6,383,751 B1US, Assessing lipid metabolism / Barendse W. – 2002.
- 13 Yardibi H., Gursel F., Ates A., Akis I., Hosturk G., Oztabak K. Anatolian red cattle breed and South Anatolian red cattle breed // African Journal of Biotechnology – 2013. – Vol. 12, N. 20. – P. 2802-2807.
14. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, NY, 1982.