DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-1-9
УДК 591.151:636.32/38.082.13

Исследование полиморфизма генов соматотропина и лептина у овец северокавказской мясо-шерстной породы

Скорых Л.Н.
Skorykh L.N.

Скорых Л.Н., доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела овцеводства, ФГБНУ "Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр", 355012 г. Ставрополь, ул. Чкалова 34, кв. 48, тел. 8(8652)71-81-55, e-mail: smu.sniizhk@yandex.ru

Ковалев Д.А., кандидат химических наук, заведующий лабораторией биохимии, ФКУЗ "Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора", 355017 г. Ставрополь, ул. Мира 280/2, кв. 47, тел. 8(8652) 26-03-12, e-mail: kovalev_da.stv@list.ru

Сафонова Н.С., соискатель отдела овцеводства, ФГБНУ "Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр", 355013 г. Ставрополь, ул. Мимоз 22А/1, кв.28, тел. 8(918)7507221, e-mail: nadejda2383@yandex.ru

Омаров А.А., кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник отдела овцеводства, ФГБНУ "Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр", 355002 г. Ставрополь, ул. Пушкина 30, ком. 415-416, тел. 8(8652)71-95-58, e-mail: smu.sniizhk@yandex.ru

Ключевые слова: соматотропин, лептин, секвенирование, SNP, северокавказская мясо-шерстная

Резюме. В настоящее время значительный интерес представляют современные технологии, предусматривающие использование ДНК-маркеров, которые широко применяются в национальных селекционных программах ряда стран с развитым животноводством и оказывают существенное влияние на улучшение показателей продуктивности. При этом наибольшую популярность приобретают генетические маркеры, взаимосвязанные с генами (генами-кандидатами), белковый продукт которых выполняет главенствующую роль в формировании или регуляции физиолого-биохимических процессов [Kolosov Yu.A., Getmantseva L.V., Shirockova N.V. et al., 2015]. Соматотропин и лептин - важнейшие гормональные регуляторы энергетического обмена. Полиморфизм генов, кодирующих эти белки, связывают с репродуктивными качествами, параметрами мясной, шерстной и молочной продуктивности у крупного рога-

Study of Somatotropin and Leptin gene polymorphism in sheep of the North Caucasian meat and wool breed

Skorykh L.N.
Kovalev D.A.
Safonova N.S.
Omarov A. A.

Key words: somatotropin, Leptin, sequencing, SNP, North Caucasian meat and wool breed

Abstract. Currently, modern technologies involving the use of DNA markers, which are widely used in national selection programs of a number of countries with developed animal husbandry and have a significant impact on improving productivity indices, are of considerable interest. At the same time, the most popular are genetic markers that are interrelated with genes (candidate genes), the protein product of which plays a dominant role in the formation or regulation of physiological and biochemical processes [Kolosov Yu.A., Getmantseva L.V., Shirockova N.V. et al., 2015]. Somatotropin and Leptin are the most important hormonal regulators of energy metabolism. The polymorphism of the genes encoding these proteins is associated with reproductive qualities, parameters of meat, wool and milk productivity in cattle, goats and sheep. Due to the growing interest in the production of young mutton and lamb, priority is given to the study of genes that control meat productivity. Of particular relevance is the study of Leptin (Lep) and growth hormone (GH) gene polymorphism in sheep breeds with a combined productivity direction, characterized by a high yield of meat and wool. In this regard, the purpose of our work was to study the polymorphism of the LEP and GH genes in sheep of the semifine-fleece North Caucasian meat and wool breed. The genetic analysis revealed two single-nucleotide substitutions: C321T (Oar_v4. 0 g. 47485936C>T) in the V exon region of the GH gene and G387T (Oar_v4.0 g.92503453G>T) in the III exon region of the Lep gene. In both cases, the frequency of occurrence of the reference allele was more than two times higher than the frequency of mutant alleles occurrence. A comparative analysis of the results obtained with the data of literary sources allowed us to establish that the G387T mutant allele of the Leptin gene occurs 8.1 % more often in sheep of the North Caucasian meat and wool breed than in sheep of the Indian malpura breed of [Meena A.S. et al., 2016]. Further research will be aimed at studying the relationship of the identified polymorphisms with productive indices.

того скота, коз и овец. В связи с возрастающим интересом к производству молодой баранины и ягнятины приоритет отдается изучению генов, контролирующих мясную продуктивность. Особую актуальность имеет изучение полиморфизма генов лептина (Lep) и гормона роста (GH) у пород овец комбинированного направления продуктивности, отличающихся высоким выходом мяса и шерсти. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение полиморфизма генов LEP и GH у овец полутонкорунной породы северокавказская мясо-шерстная. В ходе проведенного генети-

Для цитирования / For citation

Исследование полиморфизма генов соматотропина и лептина у овец северокавказской мясо-шерстной породы / Скорых Л.Н. [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2020. – №1 – С.37-39

Study of Somatotropin and Leptin gene polymorphism in sheep of the North Caucasian meat and wool breed / Skorykh L.N. [et al.] // Veterinaria i kormlenie. – 2020. – №1 – С.37-39

Таблица 1 - Последовательность олигонуклеотидных праймеров для амплификации участков генов лептина (LEP), соматотропина (GH) Table 1 - The sequence of oligonucleotide primers for amplification in the gene regions of leptin (LEP), somatotropin (GH)		
Ген	Праймеры	Длина фрагмента, п.н.
LEP	F: 5'- AGGAAGCACCTCTACGCTC -3', R: 5'- CTTCAAGGCTTCAGCACC -3'	471 п.н.
GH	F: 5'-GAAACCTCCTTCCTCGCCC-3' R: 5'- CCAGGGTCTAGGAAGCCACA-3'	365 п.н.

Таблица 2 – Условия проведения амплификации для генов GH и LEP Table 2 - Amplification conditions for GH and LEP genes						
Этап	GH			LEP		
	t, °C	Время	Кол-во циклов	t, °C	Время	Кол-во циклов
Удержание температуры	94	5 мин	1	94	5 мин	1
Циклирование	95	30 сек	35	94	30 сек	35
	65	30 сек		59	30 сек	
	72	45 сек		72	30 сек	
Завершающая элонгация	72	5 мин	1	72	5 мин	1

ческого анализа выявлено две однонуклеотидные замены: C321T (Oar_v4.0 g.47485936C>T) в области экзона V гена GH и G387T (Oar_v4.0 g.92503453G>T) в области экзона III гена LEP. В обоих случаях частота встречаемости референсного аллеля более чем в два раза превышала частоту встречаемости мутантных аллелей. Сравнительный анализ полученных результатов с данными литературных источников позволил установить, что у овец северокавказской мясо-шерстной породы мутантный аллель G387T гена лептина встречается на 8,1 % чаще, чем у овец индийской породы мальпура [Meena A.S. et al., 2017]. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение связи выявленных полиморфизмов с продуктивными показателями.

Актуальность темы

На сегодняшний день селекция в странах с развитым животноводством ведется преимущественно с использованием современных молекулярно-генетических технологий, позволяющих повысить точность оценки и прогнозирования экономически значимых показателей продуктивных животных. Существенное внимание уделяется селекции, направленной на улучшение показателей мясной продуктивности, в связи с этим особую актуальность имеет изучение полиморфизма маркерных генов и генов-кандидатов, кодирующих гормоны контролирующие процессы роста и энергетического обмена [Wakchaure R. et al., 2015].

Гормон роста (соматотропный гормон, соматотропин) - один из важнейших регуляторов соматического роста, обладающий широким спектром биологического действия. Контролирует процессы синтеза белка, катаболизм жира, увеличивает всасывание кальция в кишечнике, тем самым усиливая общий рост костей и стимулируя пролиферацию хондроцитов, влияет на процесс лактации [Thomas и др., 2007]. У овец ген гормона роста (Growth Hormone, GH), кодирующий соматотропин, картирован на 11 хромосоме. Выявлена связь полиморфизма гена GH с экстерьерными показателями [Depison N. et al., 2017], молочной [Dettori M.L. et al., 2015], шерстной [Ibrahim M.F. et al., 2016] и мясной продуктивностью овец [Gorlov I.F. et al., 2017].

Гормон лептин обеспечивает поддержание энергетического баланса в организме животных и человека, является неотъемлемым компонентом физиологической сигнальной системы, регулирующей аппетит и процессы жирового обмена. У овец ген (LEP, Leptin), кодирующий белок лептин, расположен на 4 хромосоме, его полиморфизм связывают с интенсивностью роста и живой массой [Hajihosseino A., Hashemi A., Sadeghi S., 2012], молочной продуктивностью [Mahmoud A.H. et al., 2014] и репродуктивными качествами [Bakhtiar R. et al., 2017].

Особый интерес представляет полиморфизм генов GH и LEP у пород овец, характеризующихся сочетанием высокой мясной и шерстной продуктивности, скороспелостью, хорошими племенными и адаптационными качествами [Трухачев В.И., 2015]. Ранее было установлено разнообразие аллельных вариантов генов соматотропина (GH), лептина (LEP) у овец тонкорунной породы советский меринос [Селионова М.И., 2019, Сафонова Н.С., Ковалев Д.А., Скорых Л.Н. и др., 2019]. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение полиморфизма генов GH и LEP у овец полутонкорунной породы северокавказская мясо-шерстная.

Материал и методы исследований

Экспериментальная часть исследований проводилась в условиях СПК "Восток" Степновского района Ставропольского края. Лабораторные исследования проводили на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Объектом исследования являлись ярки северокавказской мясо-шерстной породы (n=30). Отбор генетического материала (кровь) осуществлялся у молодняка в возрасте 4 месяцев.

Выделение ДНК проводили методом нуклеосорбции с использованием сертифицированного набора "ДНК сорб - В" (ИнтерЛабСервис, Россия). Для постановки ПЦР использовали реагенты производства "ИнтерЛабСервис" (Россия): смесь дНТФ, воск для ПЦР 15% (температура плавления 37 °C), ПЦР-смесь-2 red (2,5-кратный ПЦР-буфер, красильный, 5,5 mM MgCl₂). Олигонуклеотидные праймеры для амплификации участков генов LEP [Meena A.S., 2017], GH [Farag Ibrahim M., 2016] представлены в таблице 1.

Амплификацию проводили на термоциклере планшетного типа ("Bio-Rad", США), используя условия, указанные в таблице 2.

Размер полученных ампликонов определяли с помощью набора "Комплект реагентов для электрофоретической детекции в агарозном геле" и ДНК маркера молекулярного веса 50 п.н. ("ИнтерЛабСервис", Россия). Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с помощью набора реагентов Agencourt AMPure XP ("Beckman Coulter Inc", США).

Генетический анализ осуществлялся методом капиллярного секвенирования по Сэнгеру. Реакцию секвенирования проводили с использованием набора реагентов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit в соответствии с инструкцией производителя. Продукты реакции очищали преципитацией 75%-ным изопропиловым спиртом. Секвенирование осуществляли с использованием генетического анализатора ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer.

Таблица 3 - Частота аллелей и генотипов гена GH овец породы северокавказская мясо-шерстная Table 3 - Frequency of alleles and genotypes of the GH gene in sheep of the North Caucasian meat and wool breed					
SNP	Генотип, %			Аллель, %	
	CC	CT	TT	C	T
C321T	53,3	30,0	16,7	68,3	31,7

Таблица 4 - Частота аллелей и генотипов гена LEP овец породы северокавказская мясо-шерстная Table 4 - Frequency of alleles and genotypes of the LEP gene in sheep of the North Caucasian meat and wool breed					
SNP	Генотип, %			Аллель, %	
	GG	GT	TT	G	T
G387T	60,0	26,7	13,3	73,3	26,7

Рисунок 1. Фрагмент секвеннограммы, включающий SNP в экзоне V гена GH у овец породы северокавказская мясо-шерстная
Figure 1. A fragment of a sequenogram including SNP in V exon of the GH gene in sheep of the North Caucasian meat and wool breed

Рисунок 2. Фрагмент секвеннограммы, включающий SNP в экзоне III гена LEP у овец породы северокавказская мясо-шерстная
Figure 2. A fragment of a sequenogram including SNP in III exon of the LEP gene in sheep of the North Caucasian meat and wool breed

Результаты исследований и их обсуждение

В результате молекулярно-генетического анализа фрагмента экзона V гена соматотропина у овец породы северокавказская мясо-шерстная обнаружена единственная одонуклеотидная замена C321T (Oar_v4.0 g.47485936C>T) (Рисунок 1). Частота встречаемости референсного аллеля C в данной позиции в 2,2 раза выше, чем частота встречаемости мутантного аллеля T (Таблица 3).

Мутантный аллель был выявлен как в гетерозиготном, так и в гомозиготном состоянии.

В области экзона III гена лептина обнаружена несинонимичная замена - G387T (Oar_v4.0 g.92503453G>T) (Рисунок 2). Полиморфизм приводит к замене кодируемой аминокислоты валин на лейцин. Мутация обнаружена как в гетерозиготном, так и в гомозиготном варианте.

По результатам проведенных исследований наиболее распространенным является референсный аллель G, его частота встречаемости в 2,8 раза выше частоты встречаемости мутантного аллеля T. Однако у овец северокавказской мясо-шерстной породы мутантный аллель T встречается на 8,1 % чаще, чем у овец индийской породы мальпура [Meena A.S. et al., 2017]. Также зарубежными учеными ранее сообщалось об обнаружении замены G387T у новозеландских меринсов, овец пород ромни марш, купворт, корридейл, полл дорсет и суффолк. Однако данные о частоте встречаемости аллелей для этих пород не приведены [Zhou H., Hickford J.G.H., Gong H., 2009].

Заключение

В ходе проведенных исследований у овец северокавказской мясо-шерстной породы в области экзона V гена гормона роста выявлена одонуклеотидная замена C321T (Oar_v4.0 g.47485936C>T). Частота встречаемости генотипов CC, CT и TT составила 53,3%, 30,0% и 16,7% соответственно. В области экзона III гена лептина обнаружена несинонимичная замена G387T (Oar_v4.0 g.92503453G>T). Частота встречаемости генотипов GG, GT, TT составила 60,0%, 26,7% и 13,3% соответственно. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение связи выявленных полиморфизмов с продуктивными показателями.

Литература / References

1. Селионова М.И., Ковалев Д.А., Скорых Л.Н., Сафонова Н.С., Ефимова Н.И. Исследование полиморфизма генов гормона роста, лептина у овец породы советский мерин // Вестник АПК Ставрополя. 2019. № 3 (35). С. 25-29.
2. Сафонова Н.С., Ковалев Д.А., Скорых Л.Н., Ефимова Н.И., Жиров А.М. Полиморфизм гена соматотропина (GH) у овец породы советский мерин // Главный зоотехник. 2019. № 6. С. 25-31.
3. Трухачев В.И., Исмаилов И.С., Новгорова Н.А. Физиологические критерии воспроизводства овец северокавказской мясо-шерстной породы - закон циклологии и колебательных процессов // Вестник АПК Ставрополя. 2015. № 2 (18). С. 154-157.
1. Selionova M.I., Kovalev D.A., Skorykh L.N., Safonova N.S., Efimova N.I. The study of polymorphism of growth hormone, leptin genes in sheep of the Soviet merino breed // Vestnik APK Stavropol. 2019.No 3 (35). S. 25-29.
2. Safonova N.S., Kovalev D.A., Skorykh L.N., Efimova N.I., Zhirov A.M. Somatotropin (GH) gene polymorphism in sheep of the Soviet Merino breed // Chief Zootechnician. 2019.No 6.P. 25-31.
3. Trukhachev V.I., Ismailov I.S., Novgorodova N.A. Physiological criteria for the reproduction of sheep of the North Caucasian meat and wool breed - the law of cycology and oscillatory processes // Vestnik APK Stavropol. 2015. No. 2 (18). S. 154-157.
4. Ibrahim M.F., African J. Polymorphism of growth hormone gene and its association with wool traits in Egyptian sheep breeds // Biotechnol. 2016 T. 15. No. 14 C. 549-556.
5. Bakhtiar R. et al. Identification of g.170G>A and g.332G>A mutations in exon 3 of leptin gene (Bcln and Cail) and their association with semen quality and testicular dimensions in Sanjabi rams // Anim. Reprod. Sci. 2017. T. 179. C. 49-56.
6. Depison N. et al. Association of growth hormone gene polymorphism with quantitative characteristics of thin-tailed sheep using PCR-RFLP in Jambi province // African J. Biotechnol. 2017. T. 16. No. 20. C. 1159-1167.
7. Dettori M.L. et al. The sheep growth hormone gene polymorphism and its effects on milk traits // J. Dairy Res. 2015. T. 82. No. 2. C. 169-176.
8. Kolosov Yu.A., Getmantseva L.V., Shirockova N.V. et al. Polymorphism of the GDF9 Gene in Russian Sheep Breeds // J Cytol. & Histol. - 2015. -6:305. doi: 10.4172/2157-7099.1000305.
9. Farag Ibrahim M., Darwish Ahmed M., Darwish Hassan R., Abdel Aziz K.B., Ramadan W.A., Mohamed M.I., Othman E. Othman Polymorphism of growth hormone gene and its association with wool traits in Egyptian sheep breeds // African Journal of Biotechnology. - Vol. 15(14), pp. 549-556, 6 April, 2016.
10. Gorlov I.F. et al. Association of the growth hormone gene polymorphism with growth traits in Salsk sheep breed // Small Rumin. Res. 2017. T. 150. C. 11-14.
11. Hajhosseinlo A., Hashemi A., Sadeghi S. Association between polymorphism in exon 3 of leptin gene and growth traits in the Makooei sheep of Iran // Livest. Res. Rural Dev. 2012. T. 24. No. 9.
12. Mahmoud A.H. et al. Polymorphism of leptin gene and its association with milk traits in Najdi sheep // J. Appl. Microbiol. 2014. T. 8. C. 2953-2959.
13. Meena A.S., Bhatt R.S., Sahoo A., Kumar S. Polymorphism of the exon 3 of leptin gene in Malpura sheep // Indian J. Anim. Res., 51 (3) 2017: 469-473.
14. Thomas M.G et al. Associations of DNA polymorphisms in growth hormone and its transcriptional regulators with growth and carcass traits in two populations of Brangus bulls. // Genet. Mol. Res. 2007 T. 6. No. 1. C. 222-37.
15. Wakchaure R. et al. Marker Assisted Selection (MAS) in Animal Breeding: A Review // J. Drug Metab. Toxicol. 2015. T. 6. No. 5.
16. Wakchaure R., Ganguly S., Praveen P.K., Kumar A., Sharma S., Mahajan T. Marker Assisted Selection (MAS) in Animal Breeding: A Review // Journal of Drug Metabolism & Toxicology. - OMICS International, 2015. - Vol. 06. - No. 05.
17. Zhou H., Hickford J.G.H., Gong H. Identification of Allelic Polymorphism in the Ovine Leptin Gene // Mol. Biotechnol. 2009. T. 41. No. 1. C. 22-25.