

УДК 575.162

UDC 575.162

03.00.00. Биологические науки

Biological sciences

ПОЛИМОРФИЗМ В ПРОМОТОРЕ ГЕНА ПРОЛАКТИНА И ЕГО АССОЦИАЦИЯ С НАПРАВЛЕНИЕМ ПРОДУКТИВНОСТИ У КУР

POLYMORPHISM IN PROMOTER OF PROLACTIN GENE AND ITS ASSOCIATION WITH PRODUCTION TRAITS IN CHICKENS

Митрофанова Ольга Викторовна
к. б. н., старший научный сотрудник
РИНЦ SPIN-код: 4378-9500
mo1969@mail.ru

Mitrofanova Olga Viktorovna
Cand.Biol.Sci, senior research worker
SPIN-code=4378-9500
mo1969@mail.ru

Дементьева Наталия Викторовна
к. б.н., ведущий научный сотрудник
РИНЦ SPIN-код: 8768-8906

Dementeva Natalia Viktorovna
Cand.Biol.Sci., senior research worker
SPIN-code=8768-8906

Крутикова Анна Алексеевна
научный сотрудник
РИНЦ SPIN-код: 4480-6976
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, 196625, Санкт-Петербург – Пушкин, пос. Тярлево, д. 55А

Krutikova Anna Alekseevna
research worker
SPIN-code=4480-6976
*Russian Research Institute Of Farm Animal Genetics And Breeding
196625,Russia St.Petersburg-Pushkin, Tyarlevo, Moskovskoe shosse 55-A,*

Гормон пролактин, являясь пептидным гормоном, оказывает серьезное влияние на обменные процессы в организме млекопитающих и птиц благодаря своей ростовой, анаболической, гипергликемической и лактогенной активности. С помощью полимеразной цепной реакции были определены генотипы по мутации indel в пролактиновом гене у 595 кур и петушков четырех пород – корниш, русская белая, пушкинская и юрловская голосистая. Во всех исследованных группах наблюдались три генотипа – гомозиготы по инсерции II, гомозиготы по делеции DD и гетерозиготы ID. Выявлены различия по частотам генотипов и аллелей у птицы разного направления продуктивности. У русских белых кур, отличающихся высокой яйценоскостью и отсутствием инстинкта насиживания, наблюдалось преобладание гомозигот II и, соответственно, аллеля I (частота встречаемости 0,83). У представителей мясного направления корнишей в промоторной области пролактинового гена чаще наблюдалась делеция (частота аллеля D составила 0,84). Пушкинские куры по распределению частот аллелей в изучаемом гене оказались ближе к яичному типу. В популяции юрловской голосистой отмечено значительное количество гетерозигот по этой мутации. Рекомендовано использовать ген пролактина как маркер продуктивных показателей кур

Prolactin (PRL) - is a peptide hormone. It effects on metabolic processes in mammals and birds. Indel genotype mutations in a prolactin gene were determined in 595 hens and cocks. Polymerase chain reaction (PCR) were used. We studied four different breeds: Cornish, White Russian, Pushkin, Yurlov crower. Homozygous of insertion II, homozygous deletion of DD and heterozygous ID were observed in all groups. The differences in frequencies of genotypes and alleles were observed in all groups. Homozygotes II and allele I (frequency is 0,83) were the most common for Russian white chickens with high egg production and the lack of the instinct of incubation. Prolactin gene deletion was more common for beef Cornish. The frequency of D allele was 0,84. Pushkin chickens proved to be closer to the egg type. A significant number of heterozygotes with this mutation were noted in a population of Yurlov crower. It is recommended to use gene prolactin as a marker of productive indicators in chickens

Ключевые слова: ПРОЛАКТИН, INDEL-ПОЛИМОРФИЗМ, ПРОДУКТИВНОСТЬ, ГЕН, КУРИЦА

Keywords: PROLACTIN, INDEL-POLYMORPHISM, PRODUCTION, GENE, CHICKENS

Введение

К настоящему времени структура ДНК домашней курицы считается полностью расшифрованной. Существует несколько баз данных, где можно получить информацию об отдельных генах, структуре повторяющихся последовательностей, однонуклеотидных заменах и много другой полезной информации.

Открытие и последующее использование для анализа полиморфных ДНК-фрагментов, позволило получить данные о гетерогенности различных пород и популяций сельскохозяйственной птицы [1, 2]. На основе этих работ были сделаны выводы о происхождении разных групп кур, построены дендрограммы генетического сходства и определены генетические расстояния между популяциями.

Современные исследования направлены на поиск различных вариантов полиморфизма, которые могут оказаться связанными с хозяйственно-полезными признаками. У кур это особенно актуально, поскольку для них характерна быстрая смена поколений. Это дает селекционеру шанс получить эффект селекции в течение незначительного времени, если вести отбор по генам-кандидатам важных признаков.

Пролактин, или лактотропный гормон, ЛТН (лат. prolactinum, англ. prolactin) — один из эффекторных гормонов передней доли гипофиза. По химическому строению он является пептидным гормоном.

По структуре и биологическим свойствам пролактин включен в семейство пролактиноподобных белков, наряду с соматотропином, плацентарным лактогеном и пролиферином. Гормоны данного семейства обладают не только сходной структурой, но и биологическими свойствами, проявляю ростовую, анаболическую, гипергликемическую и лактогенную активность.

Ген пролактина у кур расположен на хромосоме 2 и состоит из пяти экзонов и четырех интронов [3, 4]. Этот ген был клонирован и

секвенирован. В настоящее время идет активный поиск полиморфных сайтов в этом гене. Это могут быть как однонуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphisms, SNP), так и мутации, вызванные вставкой или делецией участка гена (indel - мутация). Большинство генных полиморфизмов пролактина найдены во фланкирующих областях [1].

Так, иранскими исследователями были проанализированы отдельные SNP в 2-х экзонах и интронах гена пролактина. Установлено, что однонуклеотидная замена в экзоне 2 оказалась связана с показателями живой массы и возрастом наступления половой зрелости, а замена в экзоне 5 – с яйценоскостью [5].

У гусей был проанализирован С/Т - полиморфизм в экзоне 5 пролактинового гена. Найдена связь этого полиморфизма с яйценоскостью и массой яйца [6]. Обнаружено влияние на продуктивные показатели кур С/Т локуса, расположенного 5'-нетранслируемой области в пролактина [7].

Ряд авторов установили, что наличие в промоторной области пролактинового гена в положении 358 вставки (инсерции) размером 24 пары нуклеотидов положительно коррелирует с яйценоскостью птицы и ведет к снижению инстинкта насиживания [8, 9]. Проводятся работы по поиску влияния изменений в пролактиновом гене кур на весовые показатели [10].

Основная цель настоящей работы – проанализировать частоту встречаемости полиморфизма, основанного на инсерции-делеции размером 24 п.н. в промоторной области пролактинового гена домашней курицы.

В конкретные задачи работы входило:

1. Взятие первичного материала (крови) от различных групп кур;
2. Выделение ДНК из цельной крови;
3. Постановка полимеразной цепной реакции с специально подобранными праймерами;

4. Электрофоретическое разделение ДНК-фрагментов;
5. Статистическая обработка результатов.

Материалы и методы исследования

Материалом для работы являлась ДНК, выделенная из крови кур следующих пород: русская белая (n=50), корниш (n=155), пушкинская (n=231) и юрловская голосистая (n=159).

Русская белая порода кур относится к породам яичного типа продуктивности. Живая масса курочек может достигать 1,5-2,0 кг, петушков – до 2,5 кг. Отличается высокой яйценоскостью – до 250 яиц за первый год продуктивности. В ходе селекции утратила инстинкт насиживания.

Корниш – самая распространенная порода мясного направления продуктивности. При яйценоскости всего 80-140 яиц в год, живая масса петушков составляет 3,5 -4,5 кг. Это позволило использовать породу как отцовскую форму для получения современных гибридов в бройлерном птицеводстве.

Пушкинская порода кур была выведена на базе экспериментального хозяйства ВНИИГРЖ как яичная порода утяжеленного типа. Это совсем молодая порода, утвержденная в 2007 году. Яичная продуктивность достигает более 200 яиц в год, при этом, средняя масса яйца составляет 58 г. Отличается порода и живой массой. Так петушки весят до 2,5 кг, курочки – несколько меньше.

Юрловская голосистая относится к старейшим российским породам мясо-яичного направления продуктивности. Петухи могут достигать живой массы 5 кг, и обладают специфическим «голосом» - красивым, характерным для породы пением.

Кровь в объеме 100-500 мкл отбирали в пробирку, содержащую в качестве препарата, препятствующего свертыванию, 30 мкл 200 мМ ЭДТА. Образцы тщательно перемешивали и замораживали при температуре -20°C.

ДНК выделяли по стандартной методике фенольным методом с использованием протеиназы К («Сибэнзим», Новосибирск). Для растворения ДНК применяли ТЕ-буфер. При необходимости концентрацию и степень чистоты образцов определяли с помощью прибора NanoDrop 2000.

Для выявления мутации использовали следующие праймеры, синтезированные компанией «Евроген» (Москва) 5'GGTGGGTGAAGAGACAAGGA-3' (прямой) и 5'-TGCTGAGTATGGCTGGATGT-3' (обратный). ПЦР проводили в общем объеме 10 мкл, содержащем 1 ед. Taq - полимеразы, по 0,15 mM каждого dNTP, по 0,3 мкM каждого праймера и 100-150 нг ДНК. В последнее время для проведения реакции нами используется буфер, поставляемый компанией «Интерлабсервис» (Москва) «5x ПЦР-буфер blue».

Основные этапы ПЦР включали первоначальную денатурацию (95°C, 5 мин), затем шла серия из 40 циклов, состоящих из ряда повторяющихся этапов: денатурация - 95°C (30 сек), отжиг праймеров - 60°C (30 сек), синтез - 72°C (30 сек). В заключение шел финальный синтез при температуре 72°C продолжительностью 10 мин. По окончании программы продукты амплификации оставались на хранении при температуре 10°C. Амплификацию проводили на термоциклере Bio-rad (США).

Полученные продукты амплификации помещали в лунки 2% агарозного геля и подвергали электрофоретическому разделению. Время фореа составляло 0,5-1,5 часа в зависимости от степени расхождения фрагментов. Затем гель фотографировали с помощью системы для геле-документации «Кодак».

Частоту встречаемости генотипов рассчитывали по формуле:

$$p_A = \frac{n_{AA}}{N}$$

где p_A - частота встречаемости особей генотипа AA в популяции,

n_{AA} - число выявленных особей с генотипом AA

N – общее число особей в эксперименте

$$p_B = 1 - p_A$$

p_B - частота встречаемости особей генотипа BB в популяции

Частоты аллелей в популяции рассчитывали по формуле:

$$P_A = \frac{2P_{AA} + P_{AB}}{2N}$$

где P_A – частота аллеля A в популяции. Частота аллеля B вычисляется путем вычитания значения P_A из 1.

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены картины распределения фрагментов ДНК у кур по мутации indel 24 п.н. в положении 358 промотора гена пролактина. В этом случае наблюдается три генотипа. Это гомозиготы, несущие инсерцию (вставку) I/I, гомозиготы по делеции D/D и гетерозиготы I/D.

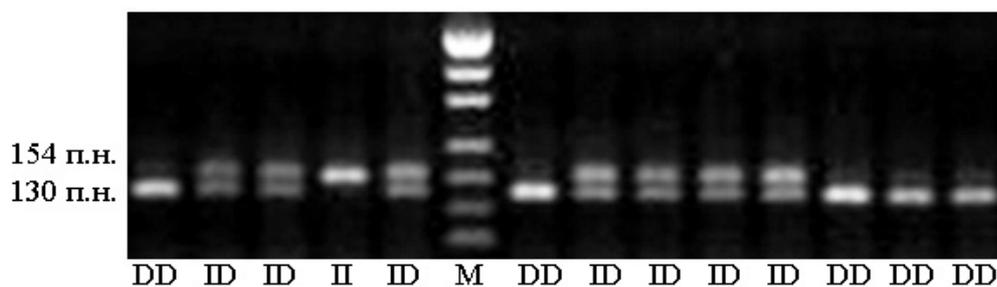


Рис. Генотипы по мутации indel 24 п.н. в положении 358 пролактинового гена у кур. II - инсерция/инсерция, DD – делеция/делеция, ID – инсерция/делеция. M – маркер длин фрагментов pUC19 DNA/MspI.

В таблице представлены частоты встречаемости генотипов и аллелей по изучаемой мутации у кур.

Таблица - Частота встречаемости различных генотипов по мутации *indel* в положение 358 промотора гена пролактина у кур разных направлений продуктивности

Порода кур	n	Частоты генотипов			Частоты аллелей	
		II	ID	DD	I	D
Русская белая	50	0,73	0,21	0,06	0,84	0,16
Пушкинская	231	0,50	0,43	0,07	0,72	0,28
Юрловская голосистая	159	0,13	0,69	0,18	0,47	0,53
Корниш	155	0,03	0,29	0,68	0,17	0,83

Анализируя частоты распределения генотипов по изучаемой нами мутации, можно отметить четкие различия в частотах аллелей и генотипов в изученных группах птицы в зависимости от направления продуктивности.

Для кур русской белой породы отмечена высокая частота встречаемости генотипов II (0,73) и практически полное отсутствие генотипов DD (частота встречаемости 0,06). Это отразилось и на смещении частот аллелей в сторону аллеля I, и его частота составила 0,84.

Прямо противоположная картина наблюдалась нами для корнишей. У них преимущественно наблюдались гомозиготы DD с частотой встречаемости 0,68, а частота аллеля D (0,83) преобладала над частотой аллеля I (0,17).

Относительно высокая частота генотипа II наблюдалась нами и в популяции пушкинских кур. Гомозиготы II составили половину исследованного поголовья. Отмечалась и высокая частота гетерозигот ID в популяции кур пушкинской породы, что привело к преобладанию у них аллеля I.

Интересные результаты были получены при анализе популяции юрловских кур экспериментального хозяйства ФГБНУ ВНИИГРЖ. Несмотря на мясо-яичный тип продуктивности породы, нами обнаружено, что почти 70% поголовья составили гетерозиготы.

Таким образом, в ходе проведенных исследований, можно сделать следующие выводы:

1. Частоты распределения генотипов и аллелей по мутации indel в промоторе гена пролактина у кур зависят от направления продуктивности птицы.
2. Для кур яичного направления продуктивности, представленных в нашей работе русской белой породой (n=50), отмечено преобладание гомозигот II (частота встречаемости 0,73) и аллеля I (частота встречаемости 0,84).
3. У корнишей преобладает аллель D. Он встречается у 83% поголовья (n=155).
4. Высокое число гетерозигот по мутации в пролактиновом гене у кур юрловской голосистой породы дает широкие возможности для проведения дальнейшего отбора.

Список литературы

1. Митрофанова О.В., Тыщенко В.И., Дементьева Н. В., Терлецкий В. П., Яковлев А.Ф. Исследование особенностей генетической гетерогенности пород и экспериментальных

популяций кур на основе анализа полиморфизма ДНК // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2007. № 6. С.36-38.

2. Тыщенко В.И., Митрофанова О. В., Дементьева Н. В. Оценка генетического разнообразия в породах и экспериментальных популяциях кур с помощью ДНК-фингерпринтинга // Сельскохозяйственная биология. 2007. №4. С. 29-33.
3. Miao Y.-W., Burt D.W., Paton I.R., Sharp P.J., Dunn I.C. Mapping of the prolactin gene to chicken chromosome // Anim. Genet. 1999. V.30. P. 473.
4. Alipanah M., Shojaian K., Khani Bandani H. The polymorphism of prolactin gene in native chicken Zabol region // J. Anim. Vet. Adv. 2011. V.10. P. 619-621.
5. Rashidi., Rahimi-Mianjig., Farhadia., Gholizadehm. Association of prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms with economic traits in breeder hens of indigenous chickens of Mazandaran province // Iran. J. Biotech. 2012. V.10. P. 129-135.
6. Wang C., Liang Z, Yuw., Fengy., Pengx.,Gongy., Lis.. Polymorphism of the prolactin gene and its association with egg production traits in native Chinese ducks // Afr. J. Anim. Sci. 2011. V.41. P. 64-69.
7. Chen H.-Q.,Wei H.-Q., Qin J., Chen H.. The novel genetic change in 5'-untranslated region of goose prolactin gene and their distribution pattern in different goose breeds // Asian J. Anim. Vet. Adv. 2011. V. 6. P. 1069-1075.
8. Kulibaba R.A., Podstreshnyi A.P. Prolactin and growth hormone gene polymorphisms in chicken lines of ukrainian selection // Cytology and Genetics. 2012. V.46. P. 390-395.
9. Jiang R.S., Zhang L.L., Geng Z.Y., Yang T., Zhang S.S. Single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of the prolactin gene and the association with reproduction traits in geese. // Afr. J. Anim. Sci. 2009. V.39. P. 83-87.
10. Jiang RS, Xu GY, Zhang XQ, Yang N. Association of Polymorphisms for Prolactin and Prolactin Receptor Genes with Broody Traits in Chickens // Poultry Science. 2005. V.84. P. 839-845.

Referens

1. Митрофанова О.В., Тыщенко В.И., Дементьева Н. В., Терleckij В. П., Яковлев А.Ф. Исследование особенностей генетической гетерогенности пород и экспериментальных популяций кур на основе анализа полиморфизма ДНК // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2007. № 6. С.36-38.
2. Тыщенко В.И., Митрофанова О. В., Дементьева Н. В. Оценка генетического разнообразия в породах и экспериментальных популяциях кур с помощью ДНК-фингерпринтинга // Сельскохозяйственная биология. 2007. №4. С. 29-33.
3. Miao Y.-W., Burt D.W., Paton I.R., Sharp P.J., Dunn I.C. Mapping of the prolactin gene to chicken chromosome // Anim. Genet. 1999. V.30. P. 473.
4. Alipanah M., Shojaian K., Khani Bandani H. The polymorphism of prolactin gene in native chicken Zabol region // J. Anim. Vet. Adv. 2011. V.10. P. 619-621.
5. Rashidi., Rahimi-Mianjig., Farhadia., Gholizadehm. Association of prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms with economic traits in breeder hens of indigenous chickens of Mazandaran province // Iran. J. Biotech. 2012. V.10. P. 129-135.
6. Wang C., Liang Z, Yuw., Fengy., Pengx.,Gongy., Lis.. Polymorphism of the prolactin gene and its association with egg production traits in native Chinese ducks // Afr. J. Anim. Sci. 2011. V.41. P. 64-69.
7. Chen H.-Q.,Wei H.-Q., Qin J., Chen H.. The novel genetic change in 5'-untranslated region of goose prolactin gene and their distribution pattern in different goose breeds // Asian J. Anim. Vet. Adv. 2011. V. 6. P. 1069-1075.

8. Kulibaba R.A., Podstreshnyi A.P. Prolactin and growth hormone gene polymorphisms in chicken lines of ukrainian selection // *Cytology and Genetics*. 2012. V.46. P. 390-395.
9. Jiang R.S., Zhang L.L., Geng Z.Y., Yang T., Zhang S.S. Single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of the prolactin gene and the association with reproduction traits in geese. // *Afr. J. Anim. Sci.* 2009. V.39. P. 83-87.
10. Jiang RS, Xu GY, Zhang XQ, Yang N. Association of Polymorphisms for Prolactin and Prolactin Receptor Genes with Broody Traits in Chickens // *Poultry Science*. 2005. V.84. P. 839–845.