

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО РОСТОВОГО ФАКТОРА-I В ПОПУЛЯЦИИ КУР ПОРОДЫ «БОРКОВСКАЯ БАРВИСТАЯ»

Р.А. Кулибаба, к.с.-х.н., Институт животноводства НААНУ

*Проведено изучение генетической структуры кур породы «Борковская барвистая» яичного направления продуктивности по локусу инсулиноподобного ростового фактора-I с использованием полимеразной цепной реакции и рестрикционного анализа. С использованием эндонуклеазы рестрикции PstI выявлен высокий уровень полиморфизма гена инсулиноподобного ростового фактора-I в 5' некодирующей участке. Частота генотипа C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> составила 53; C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub> - 12; C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> - 35 соответственно. Частота аллеля C<sub>1</sub> составила 0.71, C<sub>2</sub> - 0.29.*

### Введение.

Одним из актуальных вопросов в современной генетике птицы является установление взаимосвязей между аллельными вариантами различных генов и продуктивными признаками [13]. Гены, функционирование которых связано с «обеспечением» физиологических функций организма, а аллельные варианты которых коррелируют с изменением фенотипического проявления признаков, называют генами-кандидатами. При установлении четкой корреляции можно говорить о данном аллельном варианте как о молекулярном маркере. Результаты подобных исследований являются фундаментальной основой для проведения дальнейшей селекции (MAS) [4, 12].

Перспективными для изучения являются гены, функционирование которых непосредственно связано с основными физиологическими функциями организма птиц, такими как рост, дифференцировка, репродуктивные процессы и т.д. [2, 3]. К числу подобных генов-кандидатов относится ген инсулиноподобного ростового фактора-I (IGF-I) [7].

Инсулиноподобный ростовой фактор-I (IGF-I) обладает целым рядом физиологических функций, связанных с ростом и дифференцировкой тканей и входит в состав семейства инсулиноподобных ростовых факторов. Функционирование IGF тесно связано с гормоном роста. Митогенный эффект IGF опосредован его связыванием со специальным рецептором клеточной поверхности (рецептор для IGF класса I), обладающим тирозинкиназной активностью, функционально схожим с рецептором для инсулина. В биологических жидкостях IGF циркулирует в комплексе со связывающим белком (IGFBP – IGF Binding Protein). Совокупность IGF-I, IGF-II, IGFBP и рецепторов образует систему инсулиноподобных ростовых факторов [5].

Ген IGF-I содержит в своем составе 4 экзона и 3 интрона. В результате исследований, проведенных в зарубежных странах, показан высокий (для изученных популяций) уровень полиморфизма по 5' и 3' некодирующим участкам (5'UTR и 3'UTR), а также интронной и экзонной части гена IGF-I. При этом показана непосредственная связь различных аллельных вариантов гена (полиморфизм в области 5'UTR) с продуктивными

качествами птицы [6, 9, 14].

Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) гена IGF-I в 5'UTR участке относится к классу некодирующих однонуклеотидных полиморфизмов, т.к. не приводит к непосредственному изменению первичной структуры синтезируемого белка (т.е. не затрагивает экзонную часть гена). Однако SNP в 5'UTR могут приводить к изменениям в характере экспрессии гена IGF-I, что непосредственно связано с фенотипическими проявлениями. Отсутствие изменений в первичной структуре белковой молекулы делает невозможным определение данного типа полиморфизма с помощью классических методов, таких как электрофорез белков. Изучение данного типа полиморфизма можно проводить с помощью метода ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), т.е. проведением полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом.

В Украине, несмотря на достаточно высокий уровень птицеводства в целом, изучение генетической структуры птицы отечественной селекции с использованием современных молекулярно-генетических методов исследований (таких как ПЦР-ПДРФ) не проводилось. Поэтому целью данного исследования являлось изучение полиморфизма локуса инсулиноподобного ростового фактора-I в популяции кур яичного направления продуктивности породы «Борковская барвистая» с помощью полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом.

### Материалы и методы.

Исследования проводили в лаборатории профилактики заболеваний птицы и молекулярной диагностики Института животноводства на курах яичного направления продуктивности породы «Борковская барвистая» (100 голов).

Пробы отбирали с помощью метода «капля крови на бумаге». Выделение ДНК проводили с помощью коммерческого набора реагентов «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», Россия). Эффективность выделения ДНК определяли с помощью электрофореза в 0.7% агарозном геле при 200 V в течение 5 мин.

Полиморфизм локуса инсулиноподобного ростового фактора-I определяли по наличию однонуклеотидного полиморфизма (SNP, транзи-

ция, замена цитозина на тимин) в 5'UTR участке гена.

Для проведения ПЦР использовали праймеры: *forward* 5'-GAC TAT ACA GAA AGA ACC AC-3'; *reverse* 5'-TAT CAC TCA AGT GGC TCA AGT-3' [9]. ПЦР проводили с помощью реагентов DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific) с

использованием программируемого термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Объем конечной смеси составил 20  $\mu$ L. Концентрация праймеров составила 0,2  $\mu$ M.

Аmplификацию проводили согласно схеме (табл. 1).

Таблица 1.

Программа амплификации для проведения ПЦР

Стадия ПЦР	Денатурация		Отжиг	Элонгация	
Локус	35 циклов				
IGF-I	94° C (5 мин)	94° C (45 с)	53° C (45 с)	72° C (45 с)	72° C (10 мин)

Рестрикционный анализ проводили с использованием *Pst*I (сайт рестрикции CTGCA↓G) согласно стандартной методике (FastDigest *Pst*I, Fermentas, Литва).

Продукты рестрикции разделяли в 3% агарозном геле при напряжении 100 V в течение 90 мин. Визуализацию проводили с использованием бромистого этидия в ультра-фиолетовом спектре.

Размер рестрикционных фрагментов определяли с использованием маркера молекулярных масс M-100.

На основе полученных данных рассчитывали фактическое и теоретическое распределение генотипов, частоты генотипов и аллелей, соответствие генетическому равновесию популяции по Харди-Вайнбергу методом  $\chi^2$  по общепринятым методикам с использованием компьютерной программы Popgen32 [1].

### Результаты исследований и их обсуждение.

Однонуклеотидный полиморфизм в 5' некодирующем участке гена инсулиноподобного ростового фактора-I приводит к возникновению различных аллельных вариантов – C<sub>1</sub> и C<sub>2</sub> (по количеству остатков цитозина в сайте рестрикции для *Pst*I). В случае с аллелем C<sub>2</sub> сайт рестрикции CTGCA↓G содержит в своем составе два остатка цитозина (C), что и определяет кодировку аллеля. В случае аллеля C<sub>1</sub> транзигия цитозина в тимин приводит к наличию только одного цитозина в данном участке (CTGTAG) с потерей изначального сайта рестрикции для *Pst*I.

На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов рестрикции амплифицированного фрагмента гена инсулиноподобного ростового фактора-I.

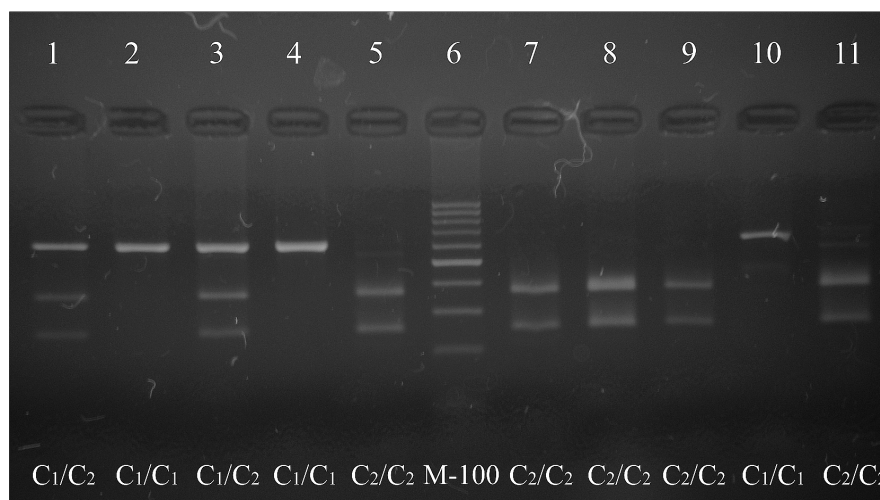


Рис 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции амплифицированного фрагмента гена инсулиноподобного ростового фактора-I:

1 – 11 – номера лунок; M-100 – маркер молекулярных масс;  
C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub> – соответствующие генотипы.

Различные генотипы в гомозиготном и гетерозиготном состоянии представлены на электрофореграмме в виде фрагментов ДНК (окрашенных полосок на геле). Аллель C<sub>1</sub> в гомозиготном состоянии (генотип C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub>) показан в виде одного фрагмента ДНК размером 621 п.н. Аллель

C<sub>2</sub> в гомозиготном состоянии (генотип C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub>) – в виде двух фрагментов размером 257 и 364 п.н. (рис. 1).

В свою очередь гетерозиготы C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> – в виде трех фрагментов длиной 621, 257 и 364 п.н. (рис. 1).

Таблица 2.

Генетическая структура птицы яичного направления продуктивности по локусу инсулиноподобного ростового фактора-I

генотипы	O	E	(O-E) <sup>2</sup> /E	$\chi^2$	
C <sub>1</sub> /C <sub>1</sub>	53	49.59	0.23		2.68
C <sub>1</sub> /C <sub>2</sub>	35	41.80	1.11		
C <sub>2</sub> /C <sub>2</sub>	12	8.59	1.34		
аллели	частота аллелей				
C <sub>1</sub>	0.71				
C <sub>2</sub>	0.29				

В результате проведенных исследований показан высокий уровень полиморфизма локуса инсулиноподобного ростового фактора-I.

Анализ фактического и теоретического распределений особей разных генотипов выявил отсутствие нарушения генетического равновесия ( $\chi^2=2.68$ ). Наиболее часто встречаются особи гомозиготные по аллелю C<sub>1</sub> (53 головы), по аллелю C<sub>2</sub> гомозиготных особей 12 (табл. 2). Уровень наблюдаемой гетерозиготности (Ho) составил 0.35, ожидаемой гетерозиготности (He) – 0.41 соответственно. Индекс фиксации Райта (F<sub>IS</sub>) равен 0.16, что указывает на небольшой дефицит гетерозиготных особей.

Сравнение генетической структуры птицы отечественной селекции с линиями кур различного направления продуктивности других стран показывает необходимость проведения дальнейшей селекции с учетом данных, полученных по распределению аллелей изученного в данной работе локуса. Так, например, согласно литературным источникам, у кур локальных популяций Кореи частота генотипа C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> составляет 55, C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> – 26, C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub> – 17, аллеля C<sub>1</sub> – 0.7, C<sub>2</sub> – 0.3 соответственно. При этом показано, что высокая частота аллеля C<sub>2</sub> положительно коррелирует с уровнем развития фолликулов и высокой яичной продуктивностью [8]. В свою очередь в локальных популяциях кур Китая частота генотипа C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> составляет 32, C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> – 41, C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub> – 27, аллеля C<sub>1</sub> – 0.53, C<sub>2</sub> – 0.47 соответственно. При изучении взаимосвязи аллелей гена инсулиноподобного

ростового фактора I с продуктивными качествами авторами было показано, что высокая частота генотипа C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub> положительно коррелирует с повышенной яичной продуктивностью (особенно в 300 и 400 дней продуктивного периода), в то время как высокая частота генотипа C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> – с живой массой [10, 11]. Исследования, проведенные на курах локальных иранских популяций, показали, что частота аллеля C<sub>1</sub> составляет 0.49, аллеля C<sub>2</sub> – 0.51 [7].

Поэтому, с целью увеличения продуктивного потенциала кур породы «Борковская барвистая» в направлении яичной продуктивности, целесообразным является проведение направленной селекции с целью повышения частоты встречаемости аллеля C<sub>2</sub> в популяции.

#### Выводы.

1. В линии яичных кур породы «Борковская барвистая» выявлен высокий уровень полиморфизма гена инсулиноподобного ростового фактора-I.

2. В результате проведенных исследований показано, что частота аллеля C<sub>1</sub>, в изучаемой линии кур, составляет 0.71, аллеля C<sub>2</sub> – 0.29 соответственно. Анализ распределения особей разных генотипов выявил отсутствие нарушения генетического равновесия.

3. С целью увеличения яичной продуктивности рекомендуется проводить дальнейшую селекцию птицы в направлении повышения частоты встречаемости аллеля C<sub>2</sub> в популяции.

#### Список використаної літератури:

1. Меркурьева Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве / Меркурьева Е.К. – Москва: «Колос». – 1977. – 240 с.
2. Alireza D. Investigation of growth hormone gene polymorphism using PCR-RFLP technique in native poultry in Khouzestan province / D. Alireza, F. Jamal, R. Hedayatolla // Journal of animal and veterinary advances. – 2010. – V. 9 (2). – P. 255 – 257.
3. Cui J.-X. Association of polymorphisms in the promoter region of chicken prolactin with egg production / J.-X. Cui, H.-L. Du, Y. Liang // Poultry Science. – 2006. – V. 85. – P. 26 – 31.
4. Dodgson J. DNA marker technology: a revolution in animal genetics / J. Dodgson, H. Cheng, R. Okimoto // Poultry Science. – 1997. – V. 76. – P. 1108 – 1114.
5. Hwa V. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily / V. Hwa, O. Youngman, R. Rosenfeld // Endocrine Reviews. – 1999. – V. 20 (6). – P. 761 – 787.
6. Kajimoto Y. Structure of the chicken insulin-like growth factor I gene reveals conserved promoter elements / Y. Kajimoto, P. Rotwein // The journal of biological chemistry. – 1991. – V. 266, No. 15. – P. 9724 – 9731.

7. Khadem A. Association of single nucleotide polymorphisms in IGF-I, IGF-II and IGFBP-II with production traits in breeder hens of Mazandaran native fowls breeding station / A. Khadem, H. Hafezian, G. Rahimi-Mianji // African Journal of Biotechnology. – 2010. – V. 9 (6). – P. 805 – 810.
8. Kim M.H. Relationship between egg productivity and insulin-like growth factor-I genotypes in Korean native ogol chickens / M. H. Kim, D. S. Seo, and Y. Ko // Poultry Science. – 2004. – V. 83. – P. 1203 – 1208.
9. Li H. Effects of the polymorphisms of GHR and IGF-1 gene on egg quality in wenchang chicken / H. Li, W. Zhu, K. Chen // Research Journal of Poultry Sciences. – 2010. – V. 3 (2). – P. 19 – 22.
10. Li H. F. Polymorphism in NPY and IGF-I genes associate with reproductive traits in Wenchang chicken / H. F. Li, W. Q. Zhu, K. W. Chen // African Journal of Biotechnology. – 2009. – V. 8 (19). – P. 4744 – 4748.
11. Li W. IGF-1 gene polymorphism and weight-related analysis / W. Li // International journal of biology. – 2009. – V. 1, No 2. – P. 113 – 118.
12. Teneva A. Molecular markers in animal genome analysis / A. Teneva // Biotechnology in animal husbandry. – 2009. – V. 25 (5 – 6). – P. 1267 – 1284.
13. Tixier-Boichard M. From phenotype to genotype: Major genes in chickens / M. Tixier-Boichard // World's Poultry Science Journal. – 2002. – Vol. 58. – P. 35 – 45.
14. Trait association of a genetic marker near the IGF-I gene in egg-laying chickens / S.C. Nagaraja, S.E. Aggrey, J. Yao [et al] // J. Hered. – 2000. – Vol. 91. – P. 150 – 156.

*Вивчено генетичну структуру популяції курей породи «Бірківська барвіста» яєчного напрямку продуктивності за локусом інсуліноподібного ростового фактору-1 з використанням полімеразної ланцюгової реакції та рестрикційного аналізу. З використанням ендонуклеази рестрикції PstI було виявлено високий рівень поліморфізму локусу інсуліноподібного ростового фактору-1 у 5' некодувальній ділянці гену. Частота генотипу C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> склала 53; C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub> - 12; C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> - 35 відповідно. Частота алелю C<sub>1</sub> склала 0.71, C<sub>2</sub> - 0.29. Найбільш часто у дослідній популяції зустрічаються особини гомозиготні за алелем C<sub>1</sub> (53 голови), за алелем C<sub>2</sub> гомозиготні 12 особин. Проведення аналізу за Харді-Вайнбергом показало, що дослідна популяція курей знаходиться в стані генетичної рівноваги ( $\chi^2=2.68$ ), що свідчить про відсутність тиску відбору. Спостережуваний рівень гетерозиготності (H<sub>o</sub>) склав 0.35, очікуваної гетерозиготності (H<sub>e</sub>) – 0.41 відповідно. Індекс фіксації Райта (F<sub>IS</sub>) дорівнює 0.16, що вказує на невеликий дефіцит гетерозиготних особин.*

*The aim of our investigation was to examine genetic structure of Ukrainian chicken breed (Birkivska barvista) selected for increased egg production. The polymorphism in the 5'UTR region of the insulin-like growth factor-1 (IGF-I) gene in Ukrainian chicken breed (Birkivska barvista) was found. Genotype frequencies for C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub>, and C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> were 53, 12 and 35. Frequencies of the C<sub>1</sub> allele was 0.71, C<sub>2</sub> - 0.29 respectively.*

Дата надходження в редакцію: 30.10.2012 р.  
Рецензент: д.с.г.н., професор Ю.В.Бондарено

УДК 636.52/.58+636.598:575

### СУБВІТАЛЬНІ МУТАЦІЇ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ ПТИЦІ

**І.О. Бульченко**, аспірант, Сумський НАУ

*В популяціях сільськогосподарських птахів присутній спадковий тягар субвітальних мутацій. У курей порід брама палева і юрловська голосиста зустрічається аномалія «скрючені пальці». У качок описана аномалія «чуб». Полімелія характерна для курей, качок і перепелів. Хоча ці мутації і нелетальні вони знижують пристосованість птахів до умов середовища.*

**Постановка проблеми.** Мутації — є надзвичайно важливі для генетики і селекції, оскільки вони є джерелом спадкової мінливості. Причиною мутацій може стати помилка реплікації ДНК, розрив хромосом, не розходження хромосом в мейозі і багато іншого. Певні типи мутацій індуковані деякими хімічними речовинами або радіацією. Наприклад, етилметасульфат викликає заміщення цитозина тимідином, а ультрафіолетове випромінювання призводить до утворення тимідинових димерів, з наступною вставкою їх під час реплікації ДНК, некомплементарно-

го нуклеотиду [3].

**Стан вивчення проблеми.** Всі мутантні ознаки птахів класифікуються відповідно до механізму успадкування і ступеню летальності. Зараз виділяють наступні категорії спадкових змін:

Домінантні гени з облігатною рецесивною летальною дією. Гомозиготи являються ненормальними у ембріональному розвитку і при вилупленні. Гетерозиготи, також мають аномалії, але вони життєздатні.

Облігатні сублетальні ознаки. Ознаки цієї