

АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНОТИПІВ ПОПУЛЯЦІЇ ЛЕБЕДИНСЬКОЇ ПОРОДИ ВРХ ЗА ГЕНАМИ *DGAT1* ТА *CAPN1*

Мохначова Н.Б.

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця
Національної академії аграрних наук України
вул. Погребняка, 1, 08321, с. Чубинське
nataliia.mokhnachova82@gmail.com

У статті представлені результати дослідження структурних генів в популяції української аборигенної лебединської породи корів, які асоціюються з молочною та м'ясною продуктивністю: діацилгліцерол-О-ацилтрансфераза 1 (*DGAT1*) та кальпаїн (*CAPN1*). Ці гени впливають на якість, склад молока корів та його кількість, а також на післязайбні якості м'ясних продуктів (асоціюється з ніжнішим м'ясом). Вивчення генетичної структури аборигенних порід ВРХ є важливим для збереження різноманіття генофонду цих тварин. Генетичні дослідження дозволяють виявити рідкісні генетичні ресурси та відбирати таких тварин для розведення, що сприяє поліпшенню якості та кількості молока та м'яса.

Всього було досліджено поліморфізм 2 генів (*DGAT1* та *CAPN1*). Для дослідження використали 32 зразки ДНК, виділеної із венозної крові корів лебединської породи за допомогою набору «ДНК Сорб-Б» (AmpliSens). Генотипування проводили використовуючи аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР-ПДРФ). Ампліфікований фрагмент *DGAT1* (411 п.н.) обробляли ферментом рестрикції *CfrI*. Особливістю алейного спектру гену діацилгліцерол-О-ацилтрансферази 1 у вивчених тварин є значне переважання алей *K* (0,75). Тварин з генотипом *AA* виявлено не було. Для гена *CAPN1* ампліфікований фрагмент розміром 341 п.н. обробляли рестриктазою *PvuI*. Встановлено значне переважання тварин з гетерозиготним генотипом *CAPN1*^{AG} та рівнозначну частоту виявлених алей *A* та *G* (0,5).

Виявлені особливості алейного спектру генів *DGAT1* та *CAPN1*, які характерні для дослідженої популяції української аборигенної лебединської породи корів. Результати дослідження є цінними у зв'язку з різким скороченням чисельності місцевих аборигенних популяцій і виникнення загрози зникнення власних генетичних ресурсів сільськогосподарських видів. **Ключові слова:** корови, аборигенна порода корів, лебединська порода, поліморфізм, гени, генотип, алей, діацилгліцерол-О-ацилтрансфераза 1, кальпаїн.

Analysis of polymorphism of genotypes of the lebedyn cattle population by the *DGAT1* and *CAPN1* genes. Mokhnachova N.

The article presents the results of the study of structural genes in the population of the Ukrainian indigenous Lebedyn breed of cows, which are associated with milk and meat productivity: diacylglycerol-O-acyltransferase 1 (*DGAT1*) and calpain (*CAPN1*). These genes affect the quality, composition and quantity of cows' milk, as well as post-slaughter qualities of meat products (associated with more tender meat). Studying the genetic structure of indigenous breeds of cattle is important for preserving the diversity of the gene pool of these animals. Genetic research makes it possible to identify rare genetic resources and select such animals for breeding, which contributes to improving the quality and quantity of milk and meat.

A total of 2 gene polymorphisms (*DGAT1* and *CAPN1*) were investigated. For the research, 32 samples of DNA isolated from the venous blood of Lebedyn breed cows using the "DNA Sorb-B" kit (AmpliSens) were used. Genotyping was performed using polymerase chain reaction (RFLP-PCR) polymorphism analysis of restriction fragment lengths. The amplified fragment of *DGAT1* (411 bp) was treated with the restriction enzyme *CfrI*. A feature of the allelic spectrum of the diacylglycerol-O-acyltransferase 1 gene in the studied animals is a significant predominance of the *K* allele (0.75). No animals with the *AA* genotype were found. For the *CAPN1* gene, an amplified fragment of 341 bp. were treated with *PvuI* restriction enzyme. A significant predominance of animals with the heterozygous *CAPN1*^{AG} genotype and an equal frequency of detected alleles *A* and *G* (0.5) were established.

Features of the allelic spectrum of the *DGAT1* and *CAPN1* genes, which are characteristic of the studied population of the Ukrainian indigenous Lebedyn breed of cows, were revealed. The results of the study are valuable in connection with the sharp reduction in the number of local aboriginal populations and the threat of extinction of the own genetic resources of agricultural species. **Key words:** cows, indigenous breed of cows, Lebedyn breed, polymorphism, genes, genotype, allele, diacylglycerol-O-acyltransferase 1, calpain.

Постановка проблеми. Сільське господарство, на сьогодні, одна з найприбутковіших галузей України. Країна має значні ресурси для розвитку тваринництва, яке включає в себе вирощування великої рогатої худоби, свиней, птиці та овець. Одним із основних напрямків селекційної роботи в м'ясному скотарстві є підвищення м'ясної продуктивності різних порід великої рогатої худоби. Для вирішення цього завдання використовується маркер-асоційований відбір сільськогосподарських тварин [1, 2].

Актуальність дослідження. Основною заслугою генетичних маркерів є те, що вони незмінні за своїм складом, незалежні від умов навколишнього середовища і мають кодовий тип успадкування, а отже, і чіткий генетичний контроль [3, 4]. Використання генетичних маркерів у скотарстві забезпечить збільшення ефективності селекційно-племінної роботи за рахунок підвищення точності оцінки генетичного потенціалу продуктивності та скорочення генераційного інтервалу. На сьогоднішній день визначено низку генів, асоційованих з деякими господарсько

корисними ознаками великої рогатої худоби. Одним із таких важливих ДНК-маркерів є гени: діацилгліцерин О-ацилтрансферазу (DGAT1) та кальпаїн 1 (CAPN1).

Діацилгліцерол-О-ацилтрансфераза 1 (DGAT1) – один з ключових ферментів метаболізму тригліцеридів, що каталізує заключну стадію їхнього біосинтезу. DGAT1 відіграє важливу роль у ряді фізіологічних процесів у вищих еукаріотів, таких як регуляція концентрації триацилгліцеролів у крові, формування жирової тканини, дозрівання ооцитів та ін. [5, 6]. Дефіцит DGAT1 призводить до порушення синтезу жирних кислот у жировій тканині, скелетних м'язах [7], а також у молочній залозі аж до повної відсутності лактації [8].

Ген, що кодує DGAT1 у *Bos taurus*, розташований у центромірній ділянці хромосоми 14 разом з іншими генами, що визначають молочну продуктивність і якість молока і формують так званий локус кількісних ознак QTL (Quantitative trait loci) [9, 10].

Серед відомих алельних варіантів гена DGAT130 великої рогатої худоби у 2002 році Grisart et al. була ідентифікована казуальна мутація GC-AA в позиції 10433/10434 (відповідно до нумерації послідовності GenBankno. AJ318490), що призводить до негомологічної заміни 232-го амінокислотного залишку (A ^ K)[11]. У ряді робіт показано, що алель K асоційований з відсотковим вмістом молочного жиру, а алель A – з високими удоями. Деякі дослідження підтверджують кодомінантний тип спадкування за геном DGAT1 [12].

Ген CAPN1 кодує протеїназу кальпаїн 1 типу, яка активується після смерті тварини і запускає процес руйнування міофібрилярних білків (м'язові волокна). Три описані мутації в цьому гені (CAPN1_316, CAPN1_4751, CAPN1_530) призводять до більш інтенсивного руйнування міофібрилярних білків, що відбивається на післязубійних якостях м'ясних продуктів і асоціюється з ніжнішим м'ясом.

Зв'язок авторського доробку із важливими науковими та практичними завданнями. Робота виконувалась у відділі генетики та біотехнології тварин Інституту розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН відповідно до програми науково-дослідних робіт «Генетична оцінка тваринреферентних популяцій за SNP-поліморфізмом різних локусів ДНК» (№ держреєстрації 0121U109254, 2021–2025).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. У раніше проведених дослідженнях з оцінки впливу поліморфізму гена CAPN1, який зумовлює модифікацію м'язової структури, було виявлено як залежність структурно-механічних властивостей м'яса від наявності чи відсутності бажаного алелю, а й зміна амінокислотного складу м'яса з прикладу валіну. Цей факт дозволив констатувати, що наявність цього гена у бажаній алельній формі сприяє зміні у білковому синтезі. Отримані дані дозволили припустити, що

тварини, що мають цю мутацію, характеризуватимуться більш прискореними темпами зростання при стандартному годуванні. Це зумовлено тим, що дана амінокислота відіграє ключову роль у метаболізмі м'язів та відновлення пошкоджених тканин [13].

Поліморфізми, розташовані в генах DGAT1 та CAPN1 раніше дослідниками були пов'язані з ознаками молочного чи м'ясного виробництва. У роботі авторами були вивчені ці поліморфізми на предмет суттєвого впливу на репродуктивні ознаки (вік у пубертатний період, післяпологовий інтервал еструсу, здатність овулювати і вагу, зростання та сироваткову концентрацію інсуліноподібного фактора зростання). В результаті досліджень поліморфізм у гені DGAT1 був пов'язаний з віком періоду статевого дозрівання, а два поліморфізми в CAPN1 були пов'язані з післяпологовим інтервалом еструсу та овуляцією [14; 15].

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття. Наразі вітчизняною та зарубіжною наукою та практикою генотиповано більшість порід великої рогатої худоби за безліччю ДНК-маркерів, проте українська аборигенна лебединська худоба вивчена досить мало..

Новизна. Вперше проводиться робота з вивчення генетичної структури лебединської породи ВРХ за генами DGAT1 та CAPN1, які асоційовані з молочною та м'ясною продуктивністю.

Матеріали і методи досліджень. Було досліджено зразки крові від дійних корів лебединської породи з господарства ПГ «Голосієво» (n=32) Київської області, Україна (рис. 1). Молекулярно-генетичні дослідження проводились на базі відділу генетики та біотехнології Інституту розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН.

Зразки крові відбирали з яремної вени в об'ємі 5 мл в вакуумні пробірки з сухим ЕДТА. Геномну ДНК виділяли згідно з стандартною методикою, використовуючи комерційний набір «ДНК Сорб-Б» (AmpliSens). Концентрацію ДНК доводили до 50 нг/мкл. Поліморфізм генів DGAT1 та CAPN1 досліджували методом ПЛР-ПДРФ. Нуклеотидні послідовності праймерів для ампліфікації та назви рестриктаз для рестрикції продуктів ампліфікації показано в табл. 1.

Умови ПЛР та схеми рестрикційного аналізу продуктів ампліфікації поліморфних ділянок досліджуваних генів в таблиці 2.

Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 2 мкл буфера для ДНК полімерази, 1,0 мкл суміші дНТФ («Амплісенс»), 1,0 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази («*Fermentas*» Литва). Геномна ДНК додавалась у кількості 2,0 мкл, решта ddH₂O. Загальний об'єм ДНК-суміші становив 10 мкл. Ампліфікацію ДНК проводили на програмованому чотирьохканальному термоциклері TP4-ПЦР-01-«Терцик»



Рис. 1. Корова лебединської породи ПГ «Голосієво» Київська обл.

Таблиця 1

Нуклеотидні послідовності праймерів та рестриктази

Послідовність праймера	Ампліфікат, (п.н.)	Рестриктаза	Посилання
DGAT1			
F: 5'-GCACCATCCTCTTCCTCAAG-3' i R: 5'-GGAAGCGCTTTCGGATG-3'	411	CfrI	Winter et al., 2002[16]
CAPN1			
5'-TCTTCTCAGAGAAGAGCGCAG-3' i 5'-CTGCGCCATTACTATCGATC-3'	341	Psy I	L. Grobet,1997[17]

Таблиця 2

Характеристика умов ПЛР та схеми ПДРФ-аналізу продуктів ампліфікації

Поліморфізм	Умови ампліфікації	Генотипи та відповідні довжини рестрикційних фрагментів
DGAT1-CfrI	94 °C – 4 хв; (95 °C – 15 с; 58 °C – 15 с; 72 °C – 60 с)х35; 72° – 5 хв	DGAT1- CfrI ^{KK} :411; DGAT1- CfrI ^{AA} :203+208; DGAT1-CfrI ^{KA} :411+203+208;
CAPN1-Psy I	95 °C – 4 хв; (95 °C – 15 с; 63 °C – 15 с; 72 °C – 60с)х35; 72 °C – 10 хв	CAPN1- Psy I ^{AA} :341; CAPN1- Psy I ^{GG} :195+146; CAPN1-Psy I ^{AG} :341+195+146;

(ДНК-технологія). Прилад виконаний у вигляді єдиного модуля, що об'єднує 4 незалежно керованих термоблока. В кожному термоблоці встановлена матриця на 10 пробірок об'ємом 0,5 мл.

Продукти ПЛР обробляли специфічними рестрикційними ферментами: до 10 мкл ПЛР-продукту додавали 5 од./мкл рестриктази та 1,5 мкл рестрикційного буферу, інкубували при 37 °C 12 год. Візуалізацію результатів проводили в 2-3% агарозному гелі з бромистим етидієм. у 1хTBE-буфері при постійній напрузі 100 В протягом 90 хв, з наступною детекцією за допомогою транслюмінатора ТУВ-1 в ультрафіолетовому світлі 312 нм. В якості маркерів молекулярних мас використовували GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder та Thermo Scientific™ GeneRuler 1

kb Plus DNA Ladder. Аналіз результатів проводили, фотографуючи гелі цифровою камерою.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного пакету Statistica 6.0 та Exel (Microsoft Office 2007).

Виклад основного матеріалу. В популяції лебединської аборигенної породи ВРХ було досліджено 2 локуси (DGAT1 та CAPN1), які є генами-кандидатами молочної та м'ясної продуктивності. Гени вибрані так, щоб проаналізувати молочну та м'ясну характеристики, як одні з найголовніших господарсько-корисних ознак.

Локус DGAT1

Аналіз результатів генотипування (рис. 2) дослідженого поголів'я встановив поліморфізм за геном

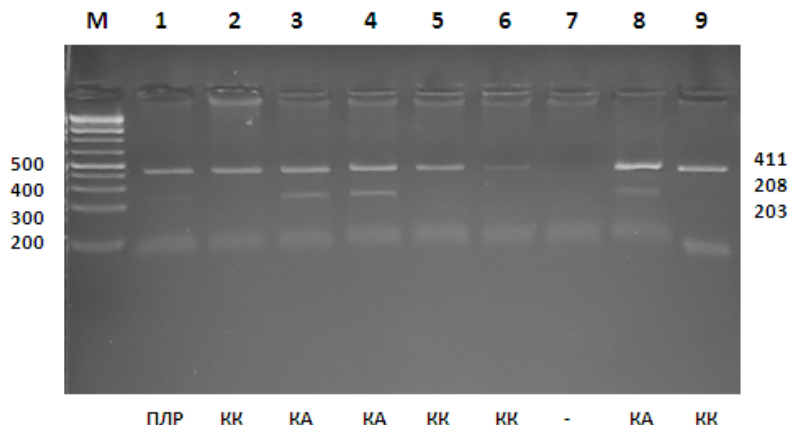


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції при визначенні генотипів за геном *DGAT1*: М – маркер молекулярних мас; генотипи тварин вказані під фото

діацилгліцерол-О-ацилтрансферази 1 (*DGAT1*) у вигляді наявності двох алельних станів: *DGAT1^A* і *DGAT1^K*. Так, частота «бажаного» алеля *K* (0,75) у тварин лебединської породи, у 3 рази була вищою, від частоти алеля *A* (0,25). Це знайшло своє відображення в частоті генотипів *DGAT1^{KK}* та *DGAT1^{KA}*, які зустрічалися в однаковій кількості тварин – 16 гол. і 16 гол., відповідно. Тварин з генотипом *DGAT1^{AA}* в даній вибірці виявлено не було.

Оцінка ступеня генетичної різноманітності виявила, що показник гомозиготності за геном *DGAT1* у вивчених тварин знаходився на рівні 50%, тобто 16 голів.

Значення фактичної рівноваги у тварин лебединської породи ВРХ на 0,125 перевищує теоретично очікувану (Табл. 3). Відповідно до закону Харді-Вайнберга, за локусом діацилгліцерол-О-ацилтрансферази 1 у дослідженої вибірки тварин порушена генетична рівновага.

Локус *CAPN1*

За допомогою рестриктази *Pvu I* визначили поліморфізм гену кальпаїну у корів лебединської породи. За наявності або відсутності сайтів рестрикції було виявлено два алельних варіанта А та G і наявність трьох генотипів із трьох теоретично можливих: GG, AA та AG (рис. 3).

Таблиця 3

Популяційні особливості генетичної структури лебединської породи ВРХ за геном діацилгліцерол-О-ацилтрансферази 1

Порода	Розмір вибірки	Частота генотипів		Частота алеля		Гетерозиготність		χ^2	F_{IS}
				К	А	H_0	H_E		
Лебединська	32	КК	0.5	0,75±0,021	0,25±0,021	0,5	0,375	2,22	-0,33
		КА	0.5						
		АА	-						

Примітка. H_0 – фактична гетерозиготність; H_E – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності; F_{IS} – індекс фіксації Райта.

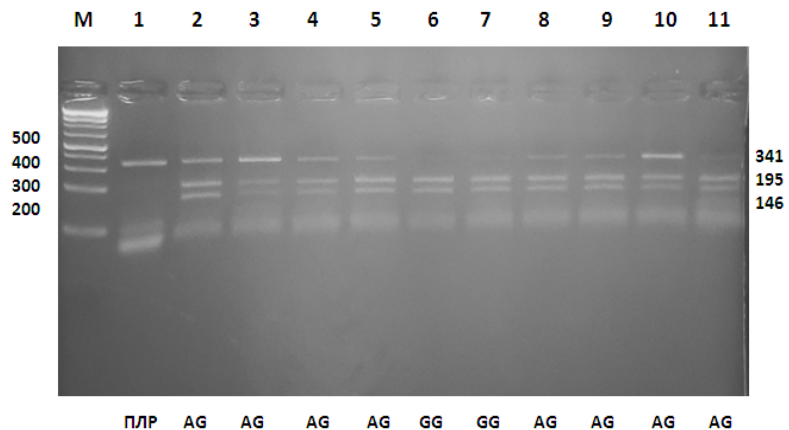


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції при визначенні генотипів за геном *CAPN1*: М – маркер молекулярних мас; генотипи тварин вказані під фото

**Популяційні особливості генетичної структури лебединської породи ВРХ
за геном діацилгліцерол-О-ацилтрансферази 1**

Порода	Розмір вибірки	Частота генотипів		Частота алеля		Гетерозиготність		χ^2	F_{IS}
				G	A	H_0	H_E		
Лебединська	32	GG	0,1	0,50±0,022	0,50±0,022	0,80	0,50	11,77	-0,6
		AG	0,8						
		AA	0,1						

Примітка. H_0 – фактична гетерозиготність; H_E – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності; F_{IS} – індекс фіксації Райта.

Більшість досліджених тварин є носіями гетерозиготного генотипу AG гену кальпаїну. Частота переважаючого генотипу склала 80% або 26 голів. Гомозиготами виявились 20% або 6 голів (табл. 4). Генотип GG був виявлений у 10% (3 гол.) досліджених нами тварин. Частота «бажаного» алелю G у тварин лебединської породи досягла 50%, що є тотожним показнику алелю A.

Переважаання фактично отриманого рівня гетерозиготності над теоретично очікуваним виявилось досить суттєвим, про що свідчить високе значення $\chi^2=11,77$. Показник гомозиготності за геном кальпаїну (CAPN1) виявився низьким і склав 20%.

Головні висновки:

1. Аналіз результатів дослідження популяції лебединської породи ВРХ за геном діацилгліцерол-О-

ацилтрансферази 1 (DGAT1) показав, що 50% тварин були носіями «бажаного» для молочної продуктивності генотипу DGAT1^{KK}.

2. У вивченій вибірці лебединської худоби виявлено 80% переважання тварин з гетерозиготним генотипом CAPN1^{AG}, який містить в собі «бажаний» для м'ясної продуктивності алель G.

Перспективи використання результатів дослідження. Результати досліджень становлять інтерес у галузі молекулярно-генетичного аналізу геному лебединської худоби та вивчення біорізноманіття великої рогатої худоби в цілому. Отримані дані можуть використовуватися як додатковий критерій у селекційних програмах з метою збереження та збільшення генетичної різноманітності українських порід ВРХ, а також отримання від них цінної продукції.

Література

- Spurlock D.M., Stock M.L., Coetzee J.F. The impact of 3 strategies for incorporating polled genetics into a dairy cattle breeding program on the overall herd genetic merit. *Journal of Dairy Science*. 2014. № 97(8). P. 5265–5274. doi: 10.3168/jds.2013-7746
- Kariuki C.M., Brascamp E.W., Komen H., Kahi A.K., Van Arendonk JAM. Economic evaluation of progeny-testing and genomic selection schemes for small-sized nucleus dairy cattle breeding programs in developing countries. *Journal of Dairy Science*. 2017. № 100(3). P. 2258–2268. doi.org/10.3168/jds.2016-11816
- Jaton C., Koeck A., Sargolzaei M., Malchiodi F., Price C.A., Schenkel F.S., Miglior F. Genetic analysis of superovulatory response of Holstein cows in Canada. *Journal of Dairy Science*. 2016. № 99(5). P. 3612–3623. doi: 10.3168/jds.2015-10349
- Shevchuzhev A., Belik N., Emelyanov E., Tokar A. Milk productivity of Simmental cows Austrian selection. In: 16th international scientific conference engineering for rural development, 2426.05.2017 Jelgava, LATVIA; LV:Latvia University of Agriculture. 2017. P. 1354–1358. doi: 10.22616/ERDev2017.16.N304
- Homa S.T., Racowsky C., McGaughey R.W. Lipid analysis of immature pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1986. V. 77. P. 425–434.
- Cases S., Smith S.J., Zheng Y.W., Myers H.M., Lear S.R., Sande E., Novak S., Collins C., Welch C.B., Lusk A.J., Erickson S.K., Farese R.V. Jr. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerolacyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 22. P. 13018–13023.
- Chen H.C., Smith S.J., Ladha Z. Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1. *J. Clin. Invest.* 2002. V. 109. P. 1049–1055.
- Smith S.J., Cases S., Jensen D.R., Chen H.C., Sande E., Tow B., Sanan D.A., Raber J., Eckel R.H., Farese R.V.Jr. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride. *Nat. Genet.* 2000. V. 25. № 1. P. 87–90.
- Riquet J., Coppieters W., Cambisano N. et al. Identity by decent fine-mapping of QTL in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 9252–9257.
- Farnir F.B., Grisart W., Coppieters J. et al. Simultaneous mining of linkage and linkage disequilibrium to fine map quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: revisiting the location of a quantitative trait locus with major effect on milk production on bovine chromosome 14. *Genetics*. 2002. V. 161. P. 275–287.
- Grisart B., Coppieters W., Farnir F., Karim L., Ford C., Berzi P., Cambisano N., Mni M., Reid S., Spelman R., Georges M. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome research*. 2002. № 12(2). P. 222–231.
- NasLund J., Fikse W.F., PieLberg G.R., Lunden A. Frequency and effect of the Bovine acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism in Swedish dairy cattle. *Journal of dairy science*. 2008. V. 91. P. 2127–2134.
- Shi M., Gao X., Ren H. et al. Association analysis of CAPN1 gene variants with carcass and meat quality traits in Chinese native cattle. *African Journal of Biotechnology*. 2014. V. 10. № 75. P. 17367–17371.

14. Giordano J.O., Wiltbank M.C., Fricke P.M., Bas S., Pawlisch R., Guenther J.N., Nascimento A.B. Effect of increasing GnRH and PGF2a dose during Double-Ovsynch on ovulatory response, luteal regression, and fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*. 2013. № 80(7). P. 773–783. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.07.003
15. Jatou C., Koeck A., Sargolzaei M., Malchiodi F., Price C.A., Schenkel F.S., Miglior F. Genetic analysis of superovulatory response of Holstein cows in Canada. *Journal of Dairy Science*. 2016. № 99(5). P. 3612–3623. doi: 10.3168/jds.2015-10349
16. Winter A., Krämer W., Werner F., Kollers S., Kata S., Durstewitz G., Buitkamp J., Womack J., Thaller G., Fries R. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. № 99(14). P. 9300-5. doi: 10.1073/pnas.142293799.
17. Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Menissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double muscled phenotype in cattle. *Nat. Genet.*, 1997. № 17. P. 71–74. doi: 10.1038/ng0997-71