

ДНК-ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ

Т.Т. ГЛАЗКО, А.Б. КОМАРОВ* Е.В. БОРЗАКОВСКАЯ*

Представлен обзор данных по генотипированию генов, продукты которых принимают участие в формировании признаков, ассоциированных с характеристиками мясной продуктивности у крупного рогатого скота, овец и свиней.

Для решения проблем ускорения селекции и племенной работы с с.-х. видами животных необходимо формирование стад с желательным уровнем продуктивности, адаптированных к конкретным регионам разведения, промышленным технологиям, стойкостью животных к разным заболеваниям при сокращении времени селекционного процесса. Традиционно такая работа занимает большой период времени и порой недостаточно эффективна.

Для решения подобных задач обычно используют контроль изменчивости количественных полигенных признаков, данные о происхождении, многолетнюю оценку по потомству и, соответственно, расчет племенных индексов, позволяющих прогнозировать племенную ценность животных. Эффективность такого подхода осложняется тем, что прогнозируемая продуктивность у высокоспециализированных заводских пород реализуется в определенных условиях содержания и кормления. Такая зависимость часто приводит к нежелательному снижению характеристик продуктивности, репродуктивной функции при импорте скота в новые условия. Уменьшение таких негативных эффектов может быть достигнуто двумя путями: оптимизацией условий содержания и воспроизводства импортируемого скота, а также направленным подбором для

разведения животных, несущих аллели и генотипы, ассоциированные с желательным сочетанием проявления хозяйственно ценных признаков, которые и обеспечивают коммерческий успех импортируемых животных. Генотипирование по таким системам имеет особую важность, поскольку при воспроизводстве животных в новых условиях часть генофонда может утрачиваться.

Развитие молекулярной генетики с.-х. видов, в частности, появление метода полимеразной цепной реакции, позволяющей амплифицировать (нарабатывать) большие количества определенных участков ДНК с последующим анализом полиморфизма этого участка у разных особей качественно изменило возможности генотипирования животных, поиска ключевых генов, полиморфизм которых вносит существенный вклад в реализацию хозяйственно ценных признаков [1-3].

В последние несколько десятилетий поиск генов — кандидатов в генетические системы, полиморфизм которых играет критическую роль в изменчивости хозяйственно ценных признаков, в основном, выполняется двумя путями. Один из них — картирование главных генов количественных признаков (Quantitative Trait Loci — QTL). Выявление ассоциаций между полиморфизмом комплекса молекуляр-

* МГУ прикладной биотехнологии, Москва, Россия.

но-генетических маркеров (как правило, микросателлитных локусов), локализованных в разных хромосомах, и изменчивостью хозяйственно ценных признаков у линий и семейств с.-х. животных позволяет рассчитывать, что включение полученных комплексных генотипов в оценку племенных индексов животных может способствовать уточнению прогноза их племенной ценности. В то же время, очевидно, что в разных условиях окружающей среды, а также генотипической среды главными для проявления одного и того же хозяйственно ценного признака могут быть разные гены. Это уменьшает надежность такого подхода и вероятность эффективности его использования.

Другой подход поиска таких генов-кандидатов контроля хозяйственно ценных признаков заключается в попытке выявить гены, полиморфизм продуктов которых может оказывать критическое влияние на проявление отдельных, элементарных признаков, из которых складываются более сложные, хозяйственно ценные характеристики. Такой путь, направленный на сохранение и конструирование генотипов, носители которых с высокой вероятностью проявляют желательные хозяйственно ценные признаки, успешно развивается в мясном скотоводстве.

Гены, контролирующие мясные характеристики, можно подразделить на гены частных признаков и гены, продукты которых могут рассматриваться как системные регуляторы.

Одним из важных показателей качества мяса является его нежность после убоя. Этот признак определяется функцией комплекса протеаз, осуществляющих постубойный протеолиз основных белков миофибрилл. Система таких протеаз кодируется генами кальпаинов, активность которых, в свою очередь, подавляется кальпастином (CAST). Чем больше CAST, тем грубее волокно мяса. Ген, кодирую-

щий CAST, локализован в хромосоме 7 крупного рогатого скота. Выявлены аллельные варианты С и G этого гена; носители генотипа CC отличаются от носителей генотипа GG большей нежностью мяса и большим содержанием жира.

Интересно отметить, что повышенная частота встречаемости аллеля С (62-73%) типична для специализированных мясных пород, отличающихся высоким качеством мяса, по сравнению с симментальской породой двойного направления продуктивности (36%) [20]. Это свидетельствует о вовлечении полиморфизма по кальпастину в процессы генетической дифференциации при формировании специализированных пород крупного рогатого скота различных направлений продуктивности.

Кальпаины, внутриклеточные кальций-зависимые цистеин-протеазы, принимают участие в росте и развитии мышц у млекопитающих. Кальпаины — проэнзимы, которые регулируются при связывании кальция и частичного аутопротеолиза. Ген, контролирующий специфический вариант кальпаина для скелетных мышц (CAPN3 или p94) особенно подробно исследуется в последние годы, поскольку этот белок участвует в формировании гигантских филаментов, существенных для структуры и роста миофибрилл. Показано, что экспрессия этого гена существенна для регенерации мышц. У разных пород овец обнаружены статистически достоверные корреляции между присутствием аллеля А по фрагменту ДНК 11-12 экзонов этого гена и живой массой при рождении (с доминантным эффектом) [13].

Белки, связывающие жирные кислоты (fatty acid-binding proteins — FABPs), являются членами суперсемейства липид-связывающих белков (lipid-binding proteins — LBP).

Описано 9 различных FABPs, экспрессирующихся в разных тканях. Главная функция этих белков — ре-

гуляция распределения жирных кислот и их внутриклеточного транспорта. Несмотря на изменчивость этих белков, они имеют выраженную гомологию и функции транспорта жирных кислот, холестерина, ретиноидов. У свиней полиморфизм генов A-FABP и H-FABP оказывает существенный эффект на сальные характеристики [12].

У свиней описаны гены, продукты которых играют важную роль в липидном обмене, их полиморфизм оказывает существенное влияние на различные характеристики продуктивности у свиней и, кроме этого, они служат моделью для исследования генов, связанных с ожирением у человека, избыточным накоплением жира в адипоцитах (клетки жировой ткани). К таким генам относятся: CREB — cAMP response element-binding protein — фактор регуляции транскрипции, участвующий в адипогенезе; PPAR α — peroxisome proliferator-activated receptor α , контролирующий внутриклеточный липидный метаболизм; DGAT1 — diacylglycerol O-acyltransferase homolog 1 — фермент синтеза липидов и ADIPOR1 — adiponectin receptor 1 — рецептор гормона адипоцитов [22].

Полиморфизм протеинкиназы, активируемой аденозин монофосфатом (ген PRKAG3), экспрессия которой специфична для скелетных мышц, ассоциирован с увеличением содержания гликогена в мышцах у свиней на 70% и существенно влияет на качество мяса [15].

Стресс-синдром (PSS) у свиней стал проблемой в современном свиноводстве в связи с широким внедрением промышленной технологии содержания и откорма животных. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей оценкой полиморфизма по присутствию / отсутствию сочетаний нуклеотидов, опознаваемых различными рестриктазами, разработан достаточно простой метод, который позволяет различать генотипы структурного гена рецептора рианодинона и выявлять мутации в позиции 1843 (ген

RYR-1). Показано, что мутация в RYR-гене является причиной чрезмерно острой реакции свиней на стресс [10]. Информация о генотипе позволяет вести соответствующий подбор и отбор скрещиваемых животных, уменьшая таким образом чувствительность потомства к стрессу [4-6].

Подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать (умножать) фрагмент ДНК длиной в 659 пар нуклеотидов, который включал в себя сайт замены тиамина на цитозин в позиции 1843 нуклеотида гена рецептора рианодинового рецептора (RYR1), контролирующего кальцевый поток в цитоплазме мышечного волокна. Замена выявлялась с использованием рестриктазы BsiHKA I. У носителей мутации после рестрикции обнаруживалось 4 фрагмента ДНК длиной в 524, 358, 166, и 135 пар оснований, а у животных «дикого типа» — только два фрагмента длиной в 524 и 135 пар оснований [24].

Описаны мутации генов, контролирующих формирование мышечной массы, и таким образом тесно связанных с ее приростом. Так, например, у крупного рогатого скота выявлена мутация миостатина, приводящая к феномену «двойной мускулатуры», наиболее часто встречающейся у бельгийской голубой породы. Миостатин является одним из регуляторов развития скелетной мускулатуры и относится к семейству трансформирующих факторов роста (TGF β). Его функция заключается в торможении прироста мышечной массы. У ряда пород крупного рогатого скота была обнаружена делеция в 11 пар нуклеотидов в 3-м экзоне (между 821 и 831 нуклеотидами) гена миостатина, приводящая к появлению дополнительного стоп-кодона, преждевременному завершению трансляции и появлению неактивной формы белка. Мутация получила название nt821(delll), с ней связана мышечная гипертрофия у крупного рогатого скота, в основе которой лежит увеличенное количество мышечных волокон. У

некоторых мясных пород (бельгийская мясная, пьемонтская) частота встречаемости носителей такой мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии достигает почти 100%. На сегодняшний день известны и другие мутации гена миостатина (делеции, инсерции, точечные мутации) приводящие к значительному приросту мышечной ткани и проявлению так называемой двойной мускулатуры [19, 23, 25].

Для выявления носителей делеции по гену миостатина используют (ПЦР) со следующей парой праймеров: 5'-TCTAGGAGAGATTTTGGGCTT-3' и 5'-GATGGGTATGAGGATACTTTTGC-3'. Данная пара праймеров позволяла выявлять делецию в 11 пар нуклеотидов в 3-м экзоне гена миостатина. У животных, свободных от мутации, продукт ПЦР равнялся 196 п.н., мутантный же аллель имел размер 185 п.н. Генотип гетерозиготного животного соответственно был представлен фрагментами размером 196 и 185 п.н. В наших собственных исследованиях были выявлены носители такой мутации у породы шароле, красной польской [2, 3, 7, 8].

У овец, также как и у крупного рогатого скота, выявлена аутомасная мутация «двойной мускулатуры» — каллипайдж с доминантным характером наследования при получении этой мутации от отцов. То есть, гомозиготы и гетерозиготы по материнской линии не отличаются от дикого типа [17].

Название «каллипайдж» составлено из греческих слов calli-, прекрасный и pyge — ягодицы; мутация обозначена символом CLPG. Установлено, что эта мутация приводит к увеличению диаметра миофибрил в отдельных мышцах.

Масса руна у носителей этой мутации на 12,7% ниже, чем у полусибсов без мутации; длина штапеля на 8,7% короче. Предполагают, что это связано с увеличением утилизации аминокислот корма в большей степени на

рост мышц, чем шерсти. Носители мутации отличаются более высокой оплатой корма по приросту живой массы.

У овец выявлены еще две мутации, ассоциированные с фенотипом «двойной мускулатуры» [5, 14]. Одна из них, карвелл, расположена дистальнее мутации каллипайдж на той же хромосоме 18 овцы, выявлена у австралийских полл дорсет на ферме Карвелл и названа по месту выявления. Третья мутация была обнаружена у овец породы тексель и локализована в хромосоме 2; ее действие связывают с гипертрофией миоцитов. Предполагают, что эта мутация тесно сцеплена с геном миостатина или с его регуляторной областью.

К генам, продукты которых обладают системным регуляторным действием, относятся такие, как кодирующие белки гормоны, в частности, соматотропный гормон, полиморфизм которого тесно связан со скоростью прироста живой массы. Выполнено много работ по исследованиям связи между полиморфизмом соматотропного гормона и различными характеристиками продуктивности у с.-х. видов животных [16]. Показано, что носители ряда мутаций в экзонах и интронах этого гена, а также их гаплотипы (сочетания) ассоциированы с изменчивостью ряда характеристик мясной продуктивности [11]. Обнаружено, что порода китайских карликовых свиней в экзоне 4 соматотропного гормона в позиции 1358 несет замену (A/G), благодаря которой валин в позиции 108 аминокислотной последовательности белка заменен на изолейцин. Представлены доказательства того, что такая замена приводит к снижению аффинности гормона роста к его рецепторам, что и является причиной низкой скорости роста у животных этой породы [18].

Выявлены также связи со скоростью прироста живой массы и «оплаты» корма с полиморфизмом структурно-

го гена, кодирующего фактор регуляции транскрипции соматотропного гормона, Pit-I [3, 8, 26].

Исследования в области физиологии развития млекопитающих привели к тому, что именно ген соматотропного гормона был использован одним из первых в целях получения трансгенных животных с повышенной скоростью роста. Однако оказалось, что увеличенное содержание этого гормона в крови приводит к появлению ряда врожденных патологий, нарушению репродуктивной функции животных. Так, например, получены трансгенные овцы, с дублированным геном соматотропного гормона под промотором металлотионина, что приводило к двукратному увеличению концентрации соматотропного гормона в крови. У трансгенных овец выявлено увеличение скорости роста, овуляции, меньшее содержание жира, большая масса немытого руна, но повышенный отход ягнят, высокая частота воспалительных процессов в суставах [9]. Полученные данные свидетельствуют о том, что поиск аллельных вариантов этого гена, ассоциированных с желательным сочетанием хозяйственно ценных характеристик, может оказаться более успешным, чем получение трансгенных животных.

Другой системный регулятор — ген гормона лептина, участвующего в регуляции жирового обмена у млекопитающих [8]. Одним из важнейших признаков продуктивности является жировая характеристика животных. Генетически обусловленное ожирение было описано у мышей еще 30 лет назад. Однако ген, отвечающий за эту характеристику, выявили совсем недавно. Продуктом гена ожирения является синтезируемый в адипоцитах лептин — гормон отвечающий за регуляцию массы тела, жировые отложения и потребления корма. У мышей с генотипом *ob/ob* была выявлена мутация C->G в 105 кодоне, приводящая к ожирению животных из-за отсут-

ствия активной формы белка. Введение таким животным рекомбинантного лептина способствовало снижению аппетита и потери живой массы. Кроме того, на уровень жировых отложений влияет и ген рецептора лептина. Поэтому оба этих гена и их продукты стали предметом многочисленных исследований, направленных на поиск маркеров хозяйственно-ценных признаков у с.-х. животных.

Описан полиморфизм по гену лептина у крупного рогатого скота. Ряд сайтов, в которых наблюдается мононуклеотидный полиморфизм (SNP), рассмотрен в 2-м экзоне этого гена. Обнаружено, что выявленный полиморфизм статистически достоверно ассоциирован с такими характеристиками как убойный выход, нежность мяса [21].

Наиболее распространенные гаплотипы по двум позициям в 2-м экзоне лептина у мясных пород — TCAC, CCAT, TTAC. По сравнению с этими наиболее распространенными гаплотипами, гаплотип CCTT оказывает более существенный эффект на общее количество жира и общую упитанность ($P < 0,01$), а гаплотип TTTT — на нежность мяса ($P < 0,03$). Полиморфизм в промоторной области лептина ассоциирован с общим количеством внутреннего жира.

Таким образом, современный этап развития молекулярно-генетических исследований с.-х. видов наглядно свидетельствует о том, что генотипирование с применением ДНК-маркеров ряда структурных генов может способствовать более полному использованию и сохранению генетического потенциала высокой мясной продуктивности.

Важно подчеркнуть, что методы ДНК-технологий для оценки полиморфизма структурных генов, рассмотренных выше, в настоящее время уже прошли стадию лабораторных разработок и в достаточно массовом масштабе начинается их прямое внедрение в практическую селекционную работу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глазко В.И. ДНК-технологии животных К: Нора-принт, 1997. — 2. Глазко В.И., Дунин И.М., Глазко Г.В., Калашикова Л.А. Введение в ДНК-технологии М.: Росинформагротех, 2001. — 3. Глазко В.И., Глазко Г.В. Введение в генетику, биоинформатика, ДНК-технология, геновая терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика. Киев: КВИЦ, 2003. — 4. Грикшас С.А., Черкаева Е.А., Калашикова Л.А. и др. Использование современных методов ДНК-диагностики для определения стрессчувствительности свиней // Изв. ТСХА, 2006. Вып. 4. С. 76-83. — 5. Зинovieва Н.А., Эрнст Л.К. Проблемы биотехнологии и селекции сельскохозяйственных животных. Изд-во ВГНИИ животноводства. 2006. — 6. Калашикова Л.А., Дунин И.М., Глазко В.И. и др. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных. Изд-во ВНИИплем, 1999. — 7. Облап Р.В., Тряпицина Н.В., Глазко В.И. Разработка методов оценки хозяйственно ценных признаков у крупного рогатого скота — лептина и миостатина с использованием полимеразной цепной реакции// Вестн. аграр. науки, 2001. — 8. Харченко П.Н., Глазко В.И. ДНК-технологии в развитии агробиологии. Под ред. членкорр. Б.Ф.Ванюшина. М.: Воскресенье, 2006. — 9. Adams N.R., Brieger J.R., Ward K.A. // J. Anim Sci, 2002. V.80. P. 2325-2333. — 10. Balog E.M., Norton L.E., Bloomquist R.A. et al. // J. Biolog. Chemistry, 2003. V. 278, N. 18. P. 15615-15621. — 11. Beauchemin V.R., Thomas M.G., Franke D.E. et al. // Genetics and Molecular Research, 2006. V.5, N.3. P. 438-447. — 12. Chmurzynska A. // J. Appl Genet, 2006. V.47, N.1. P. 39-48. — 13. Chung H, Choi B, Jang G. et al. // J Appl Genet., 2007. V. 48, N.1. P. 63-68. 14. Cockett N. E., Smit M.A., Bidwell C. A. et al. // Genet. Sel. Evol., 2005. V.37 (Suppl. 1). S. 65-81. — 15. Huang Lu-Sheng, Ma Jun-Wu, Ren Jun et al. //Genet. Sel. Evol., 2004. V.36. P. 481-486. — 16. Lagziel A., Denise S., Glazko V.I. et al. // J. Animal Sci., 1999. P. 161-167. — 17. Jackson S.P., Green R.D., Miller M.F. //J. Anim. Sci., 1997. V.75. P. 14-18. — 18. Jing L.I., Xue-Qin R., Wang Jia-Fu, //Acta Physiologica Sinica, 2006. V.58, N.3. 217-224. — 19. Oldham J. M., Martyn J. A., Sharma M. et al. // Am Jphysiol Regul Integr Comp Physiol., 2001. V.280, N.5. P. 1488-1493. — 20. Schenkel F.S., Miller S.P., Jiang Z. et al. //J. Anim. Sci., 2006. V.84. P. 291-299. — 21. Schenkel F.S., Miller S.P., Ye X. et al. //J. Anim. Sci, 2005. V.83. P. 2009-2020. — 22. Szczerbal I., Lin L, Stachowiak M. et al. // J. Appl Genet., 2007. V.48, N.1. P. 73-76. — 23. Taylor W. E. Bhasin S., Artaza J. et al. // Am J Physiol Endocrinol Metab., 2001. V.280, N.2. P. 221-228. — 24. Weaver S.A., Dixon W.T., Schaefer A.L. // J. Anim. Sci, 2000. V.78. P. 1319-1330. — 25. Xochit F. De la Rosa-Reyna, Mario A. et al. // J. Appl Genet, 2006. V.47, N.1. P. 1-3. — 26. Zwierzchowski L., Oprzadek J., Dymnicki E., Dzierzbicki P. //Animal Science Papers and Reports, 2001. V.19. P. 65-78.

SUMMARY

The review of data about genotype identification on genes which products take part in formation of traits, associated with characteristics of meat productivity in cattle, sheep and pigs was presented.