

лосков, ракообразных, земноводных, пресмыкающихся и продуктов их переработки. Дата введения 2001-01-01.

3. Губанов Н. М. и др. Паразитофауна рыб водоемов Колымской и Индигирской низменностей // Материалы по экологии и численности животных Якутии. Якутск. – 1973. – С. 111-124.

4. Долганова С. Г., Нохрина Е. В. Veterinary-sanitary examination of freshwater fish sold in Irkutsk // Аграрный научный журнал. – 2019. – № 6. – С. 50-52.

5. Долганова С. Г., Нохрина Е. В. Санитарно-микробиологическая оценка пресноводной рыбы // Вестник ИрГСХА. – 2019. – № 90. – С. 131-139.

6. Матаркина В. В. Ветеринарно-санитарная экспертиза рыбы из торговых точек г. Якутск //

Комплексные вопросы аграрной науки для АПК Республики. – 2019. – С. 60-63.

7. Нохрина Е. В., Орищенко К. В. Ветеринарно-санитарная экспертиза рыбы, реализуемой в МУП "Центральный рынок" г. Иркутска // проблемы видовой и возрастной морфологии. – 2019. – С. 301-311.

8. Саввинова М. С., Татарина З. Г. Товароведческая характеристика и ветеринарно-санитарная оценка рыбы чир, добываемой в условиях Криолитозоны // вызовы и перспективы. – 2019. – С. 139.

9. Шемякова Н. В. и др. Ветеринарно-санитарная экспертиза рыбы и рыбопродуктов на продовольственном рынке ЗАО «Октябрьский» г. Новосибирска // Инновации и продовольственная безопасность. – 2015. – № 4. – С. 33-36.

УДК: 575.08:636.2.034

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2020.4.99

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА K232A ГЕНА DGAT1 НА МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ КОРОВ

Мукий Ю.В. – к.б.н., доц. каф. ветеринарной генетики и животноводства (ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»); Богомаз Д.И. – к.б.н, ген.дир. биотехнологической компании ООО «Бигль»; Павлова О.А. – к.б.н, главный специалист биотехнологической компании ООО «Бигль».

**Ключевые слова:** полиморфизм гена DGAT1, молочная продуктивность, коровы айрширской породы. **Keywords:** DGAT1 gene polymorfism, milk production, ayrshire cows.



### РЕФЕРАТ

На сегодняшний день изучение генов-маркеров количественных признаков у сельскохозяйственных животных является актуальной задачей. По многочисленным научным работам известно, что мутация K232A в гене DGAT1 ассоциирует с признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота: аллель К - с % содержанием жира в молоке, а аллель А - с количеством молока. В связи с этим разработка оптимального метода для детекции SNPи аллельного полиморфизма представляет научный интерес. Для изучения полиморфизма K232A в данной работе использовали два метода молекулярно-генетического анализа: 1) реал-тайм ПЦРс системой праймеров и зондов, помеченных флюорохромами FAM и R6G; 2) ПЦР-ПДРФ с обработкой продуктов амплификации эндонуклеазой рестрикции BglII и детекции образцов в 15% полиакриламидном геле с помощью системы

гель-документации ChemiDoc XRS+ (BioRad). Исследование было проведено в два этапа, соответствующих двум отчетным периодам в хозяйстве. На первом этапе было прогено-типировано 200 голов коров с использованием реал-тайм ПЦР. Все животные оказались гомозиготными по аллелю А. На втором этапе был применен метод ПЦР-ПДРФ, с помощью которого установлены генотипы 102 животных - 64 голов коров с генотипом АА; 34 голов с генотипом АК и 4 головы с генотипом КК. Распределение частот соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Частоты аллелей составили А-  $p=0,79$ ; К-  $q=0,21$ . Критерий  $\chi^2=0,04$  ( $p<0,05$ ). Коровы с генотипом АА имели достоверно высокие показатели по удою  $+341,8$  кг,  $p\leq 0,01$ ; с генотипом АК процентного содержания жира  $+0,131$ ,  $p\leq 0,01$  за 305 дн. 1 лактации. Расчет критерия Стьюдента при сравнении показателей удоя и жирности молока за полную 1 лактацию коров с разными генотипами показал, что все полученные эмпирические значения ( $t$  эмп.) находятся в зоне не значимости.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Количественные признаки являются селекционно-значимыми в животноводстве. Особую роль играет изучение молочной продуктивности у крупного рогатого скота. Так как на сегодняшний день известны гены-кандидаты, влияющие на удои, количество и процент жира и белка в молоке, актуальным является изучение генетического фона в определенной генотипической среде. Одной из консервативных замен, имеющей значимые ассоциации с молочной продуктивностью является диацилглицерол-О-ацилтрансфераза (DGAT1), картированный в центромерной области 14-й хромосомы [3]. По литературным данным известно, что у млекопитающих микросомальный фермент диацилглицерин О-ацилтрансфераза катализирует реакции в конечных путях синтеза триглицеридов, и таким образом осуществляет контроль за метаболизмом и транспортом липидов. Grisart et al. идентифицировали казуальную мутацию - динуклеотидную замену GC-AA в позициях 10433 и 10434, приводящую к замене лизина Lys (аллель К) на аланин Ala (аллель А) в положении 232 белка ацил-КоА (K232A полиморфизм) [1]. В ряде работ показано, что аллель К ассоциирован с процентным содержанием молочного жира, а аллель А - с высокими удоями [5]. Некоторые исследования подтверждают кодминантный тип наследования по гену DGAT1. Так, показатели молочной продуктивности коров с гетерозиготным генотипом гена DGAT1, имели промежуточное значение в сравнении с показате-

лями молочной продуктивности животных с гомозиготными генотипами [2].

Целью данного исследования было апробировать разные методики для установления полиморфизма гена DGAT1 и изучить влияние разных аллелей на молочную продуктивность айрширского скота.

### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

В качестве материала служила ДНК, полученная из замороженной крови от 302 голов коров айрширской породы племенного хозяйства Ленинградской области. Основным методом исследования был молекулярно-генетический анализ, с использованием реал-тайм ПЦР и ПЦР-ПДРФ.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Кровь у животных получали из хвостовой вены спомощью вакуумной системы в пробирки с 0,5М раствором ЭДТА, после чего пробы замораживали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Генотипирование проводилось в два этапа.

На первом этапе была выделена ДНК от 200 голов животных, содержащихся в хозяйстве в первый (условно) отчетный период. На этом этапе для изучения полиморфизм K232A применяли метод реал-тайм ПЦР с использованием дифференциально окрашенных зондов к разным аллелям. Для этого была разработана система праймеров и зондов, позволяющая детектировать оба варианта полиморфизма в условиях мультиплекса. Зонды помечены разными флюоресцентными красителями: зонд помеченный FAM предназначен для

Таблица 1

**Праймеры и зонды для оценки полиморфизма K232A в гене DGAT1 с помощью ПЦР в режиме реального времени**

Название	5'-модификация	Последовательность 5'-3'	3'-модификация
F		GCTTGCTCGTAGCTTTGGCAGGT	
R		CAGGTTGTCCGGGTAGCTCACG	
TprobeGC	FAM	<b>G</b> CGGCCAACGGGGGAGCTGCC	BHQ1
TprobeAA	R6G	<b>A</b> AGGCCAACGGGGGAGCTGCCAG	BHQ1

Таблица 2

**Синтетические матрицы, используемые для контроля при оценке K232A в гене DGAT1**

Матрицы	Последовательность 5'-3'
DGAT1 mAA	GCTTGCTCGTAGCTTTGGCAGGTAAGA <b>A</b> AGGCCAACGGGGGAGCTGCCAGCGCACCGTGAGCTACCCCGACAACCTG
DGAT1 mGC	GCTTGCTCGTAGCTTTGGCAGGTAAG <b>G</b> CGGCCAACGGGGGAGCTGCCAGCGCACCGTGAGCTACCCCGACAACCTG

*Подчеркиванием выделены полиморфные точки*

выявления аллели А (вариант GC), а зонд, помеченный R6G, предназначен для выявления аллели К (вариант AA). Последовательности олигонуклеотидов приведены в таблице 1.

Для детекции дикого и мутантного вариантов генотипов в качестве положительного контроля разработаны синтетические матрицы, последовательности которых приведены в таблице 2.

РТ-ПЦР проводили на амплификаторе С 1000 ThermalCycler фирмы Bio-RAD (CFX 96) в режиме программы: Денатурация 95°C, 180 с., амплификация – 45 циклов: 95°C – 10 сек., 62°C – 50 сек, 72°C – 50 сек. На рисунке 1 представлен скриншот результатов ПЦР, где видно, что «разгорание» идет по каналу FAM после 30 цикла амплификации, что соответствует дикой аллели. По второму каналу R6G, соответствующему мутантной аллели, «разгорания» не наблюдалось для всех проб.

Таким образом, все исследуемые 200 коров были гомозиготными по AA – 100 %. Такие результаты сходны с некоторыми исследованиями, описанными в литературе [6].

На втором этапе исследования была выделена ДНК от 102 голов коров. Для изучения полиморфизма K232A использовали метод ПЦР-ПДФ, который заключался в амплификации участка, содержащего полиморфизм с последующей рестрикцией. Праймеры для этого подхода были ранее описаны Grisartetal.(2002): DGAT1-K232A F - TGCCGCTTGCTCGTAGCTTTGGCC\*(«\*» обозначен нуклеотид, который при наличии мутантного варианта обеспечивает появление рестриционного сайта для эндонуклеазы рестрикции BglI); DGAT1-K232A R- ACCTGGAGCTGGGTGAGGAACAGC [4]. Конструирование праймеров осуществлено таким образом, что при наличии в геноме аллели мутантного типа, с

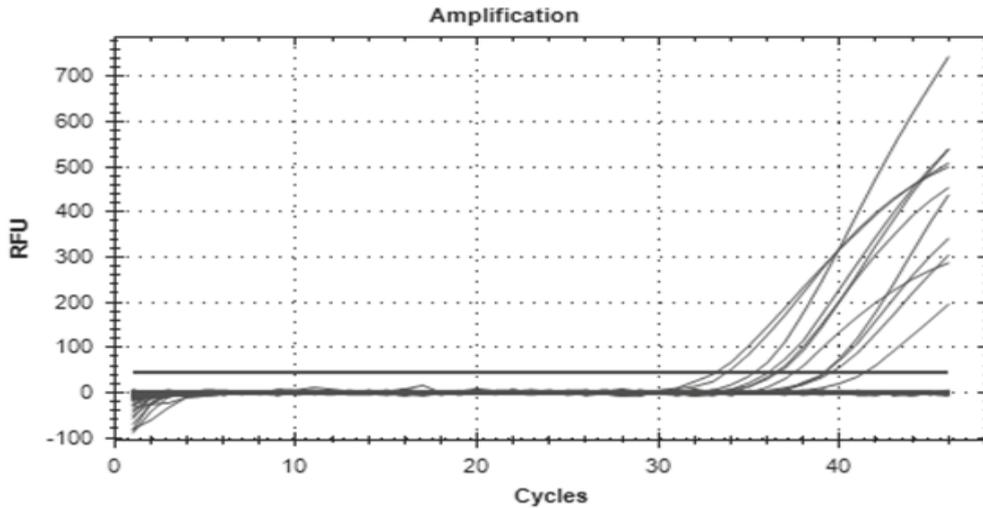


Рисунок 1. Разгорание аллели GC (A) по каналу FAM

Таблица 3  
Длины фрагментов, получаемых после обработки ампликонов рестриктазой BglI

Аллель	Длина ампликона, п.о.	Длины фрагментов, п.о.
AA (K)	378	282, 96
GC (A)		254, 96, 28

праймером вводится сайт для эндонуклеазы рестрикции BglI. В таблице 3 указаны ожидаемые длины фрагментов, получаемые при обработке ампликонов рестриктазой BglI.

Состав реакционной смеси: 100 нг ДНК, 6 ммоль каждого dNTP, 20 ммоль каждого праймера, 7% ДМСО, 2,5 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 2,5 ед. Taq-полимеразы и 1x буфер для полимеразы (все реактивы «Бигль», Россия). Конечный объем смеси 20 мкл. Поверх реакционной смеси насливали минеральное масло. ПЦР проводили в режиме горячего старта: добавление MgCl<sub>2</sub> проводили после первичной денатурации.

ПЦР проводили по протоколу: Вода - 10,5 мкл, 10X Taq-буфер без магния - 2 мкл, Mg<sup>2+</sup> - 1,6 мкл, dNTPs - 0,5 мкл, праймерF 10 мПоль/мкл - 0,5 мкл, праймерR 10 мПоль/мкл - 0,5 мкл, DMSO - 1,4 мкл, БСА - 2 мкл, полимеразы - 2,5 ед.

Термоциклирование проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по протоколу: денатурация 95°C, 300 с., амплификация – 45 циклов: 95°C – 15 сек., 65°C – 30 сек, 72°C – 40 сек. Ожидаемый размер ампликона – 378 п.о.

Далее продукты амплификации подвергались обработке эндонуклеазой рестрикции BglI («СибЭнзим», Россия), в объеме 20 мкл при добавлении 0,5 мкг ДНК, 5 е.а. BglI в двукратном буфере производителя по программе: 37°C – 1 час, 65°C - 20 минут («Терцик»). Визуализация продуктов рестрикции проводилась в 15% ПААГе и 0,5X TBE, при 200В в течение 2-х часов, окраска геля GelStar по протоколу производителя и сравнивалась с маркером молекулярного веса 100 bp+1.5 kb (ThermoScientific™ SM0331 Fermentas GeneRuler DNA Ladder Mix, шаг 100 п.о. до 1000.). Состав TBE буфера приведен в

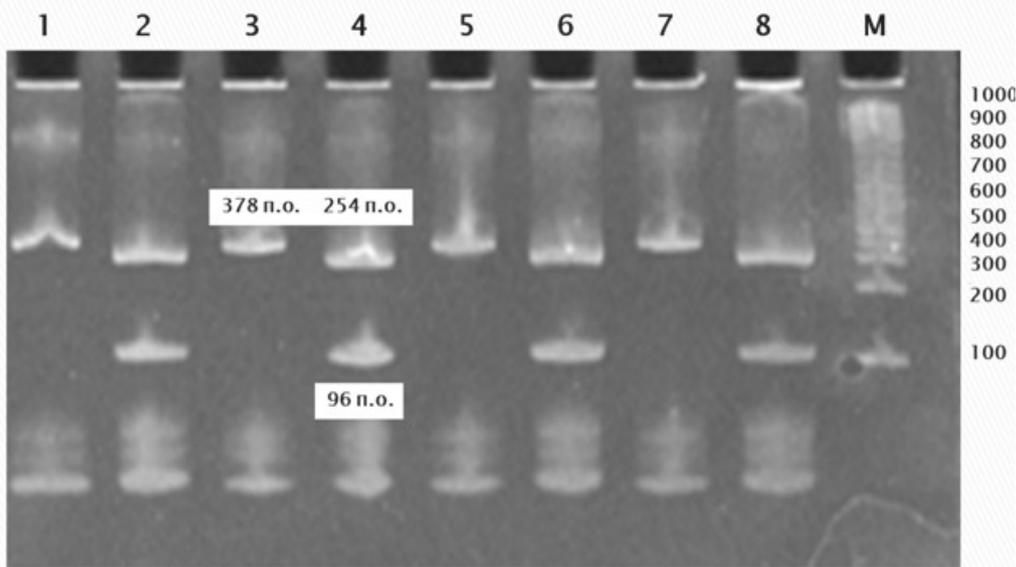


Рис.2 . Продукты ПЦР после рестрикции эндонуклеазой BglI. Дорожки 1,3,5,7 – соответствуют 378 п.о. – ампликону; 2,4,6,8 – 254 п.о., 96 п.о. соответствуют аллели A (GC); M- маркер молекулярного веса 100 bp+1.5 kb.

руководстве (Sambrook, Russell, 2001). Для УФ-детекции образцы перед нанесением на гель смешивали с красителем SYBR Safe по протоколу, прилагаемому производителем (ThermoFisherScientific, США). Для вертикального электрофореза использовали камеру Mini-PROTEAN Tetra. Визуализацию полученных результатов проводили на трансиллюминаторе Квант 312 (Хеликон). Результаты рестрикции показаны на рисунке 2.

В результате исследования во второй отчетный период было прогенотипировано 102 коровы и получены следующие результаты: 64 голов коров с генотипом AA; 34 голов с генотипом АК и 4 головы с генотипом КК. Расчет частот аллелей проводился следующим образом:  $A=(2P+H)$ ;  $p=P+1/2H$ ;  $q=Q+1/2H$ ,  $p=0,63+1/2(0,33)$ ;  $q=0,04+1/2(0,33)$   $p=0,79$  (A);  $q=0,205$  (K)

В нашем случае: генотипы соответствовали  
 AA (GC/GC) – P – 62,7%  
 (0,63); АК (AA/GC) – H –

$$33,3\% \quad (0,33)$$

КК (AA/AA) – Q – 4% (0,04)  
 Таким образом, по AA- 0,63%; по КК- 0,04%; по АК- 0,33%. Частота встречаемости замены на аланин составила 0,79; на лизин 0,21.

Используя закон Харди-Вайнберга ( $p^2+2pq+q^2=1$ ) можно установить, соответствуют ли полученные генотипы равновесию. Для этого введем обозначения: 64 гол.- AA -  $p^2$ ; 34 гол.- АК-  $2pq$ ; 4 гол.- КК-  $q^2$

$$q = \sqrt{\frac{4}{102}} = \sqrt{0,3922} = 0,198$$

$$p = 1 - 0,198 = 0,802$$

$$\text{Частота AA} = p^2 = 0,802^2 \times 102 = 65,6$$

$$\text{АК} = 2pq = 2 \times 0,802 \times 0,198 \times 102 = 32,4$$

$$KK = q^2 = 0,198^2 \times 102 = 3,998 = 4$$

Критерий  $\chi^2 = 0,038 = 0,04$ .

Таким образом, можно сделать вывод, что полученные данные соответствуют генетическому равновесию Харди-Вайнберга. Данные продуктивности животных сравнивались по показателям 1 лактации, т.к. на момент исследования все животные были разного возраста. При сравнении групп коров с генотипом АА и АК; гомозиготные животные АА имели достоверно высокие показатели по удою как за 305 дн. (+341,8 кг,  $p \leq 0,01$ ), так и за полную лактацию (+458,14 кг,  $p \leq 0,01$ ). Животные с генотипом АК отличались достоверно высокими показателями процентного содержания жира за 305 дн. (+0,131,  $p \leq 0,01$ ), за полную лактацию (+0,13,  $p \leq 0,01$ ). Эти данные сходны с описанными по данному хозяйству Позовниковой М. В. (2017) и с литературными данными об эффекте замены лизина (большая жирность) на аланин (большой удой) [1].

Был проведен расчет критерия Стьюдента при сравнении показателей удоя и жирности молока у животных с разными генотипами (таблица 4). Критерий Стьюдента может применяться для оценки неравных выборок, что соответствует изучаемым выборкам. Все полученные эмпирические значения ( $t_{\text{эмп}}$ ) при сравнении

показателей животных с разными генотипами находятся в зоне незначимости.

#### ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования было использовано два метода молекулярно-генетического анализа: реал-тайм ПЦР и ПЦР-ПДРФ, которые оказались эффективными при идентификации аллельных вариантов К и А гена DGAT1 крупного рогатого скота, однако метод реал-тайм ПЦР имеет преимущество, т.к. позволяет детектировать искомые мутации достаточно быстро и менее трудозатратно. При оценке полиморфизма K232A у двух групп коров айрширской породы, разделенных на отчетные периоды установлены следующие частоты аллелей - в первой группе все были гомозиготны по аллели АА; во второй группе генотип АА - 63,7%; АК - 33,3; КК - 45%. Частоты аллелей распределились так:  $p = 0,79$  (А);  $q = 0,21$  (К), что соответствует генетическому равновесию. Анализ данных по продуктивности показал достоверно высокие удои у коров с генотипом АА, и высоким % содержанием жира в молоке у животных с генотипом АК, что соответствует литературным данным по изучаемой теме.

**The use of different methods to research the effect of K232A polymorphism of the DGAT1 gene on dairy productivity of cows. Mukiy Y. V - Ph. D., associate Professor of the Department of veterinary genetics and animal husbandry (St. Pe-**

Таблица 4  
Расчет критерия Стьюдента при сравнении показателей удоя и жирности молока за полную 1 лактацию коров с разными генотипами

Показатели	Удой				Жирность молока			
	КК к АА		КК к АК		КК к АА		КК к АК	
$t_{кр}$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.01$
	1,99	2,65	2,03	2,72	<b>1,99</b>	<b>2,65</b>	2,03	2,72
$t_{\text{эмп}}$	1,1		1,6		0,1		0,8	

tersburg state Academy of veterinary medicine), Bogomaz D.I.-Ph.D, CEO of the biotechnology company «Beagle», Pavlova O. A. - Ph. D., Leading Specialist of the biotechnology company «Beagle».

**ABSTRACT**

Today, the study of genes-markers of quantitative traits is an urgent task. According to numerous scientific works, it is known that the K232A mutation in the DGAT1 gene is associated with signs of milk production in cattle: allele K with a% fat content in milk, and allele A with the amount of milk. In this regard, the development of an optimal method for detecting SNP and allelic polymorphism is of scientific interest. To study the K232A polymorphism, two methods of molecular genetic analysis were used in this work: 1) real-time PCR with a system of primers and probes labeled with FAM and R6G fluorochromes; 2) PCR-RFLP with processing of amplification products with restriction endonuclease BglI and detection of samples in 15% polyacrylamide gel using a gel documentation system. The study was carried out in two stages, corresponding to two reporting periods on the farm. At the first stage, 200 cows were genotyped using real-time PCR. All animals turned out to be homozygous for allele A. At the second stage, the method of PCR polymorphism of the lengths of restriction fragments was used, with the help of which the genotypes of 102 animals were established - 64 cows with the AA genotype; 34 heads with the AK genotype and 4 heads with the KK genotype. The frequency distribution corresponded to the Hardy-Weinberg equilibrium.

Allele frequencies were A - p = 0.79; K- q = 0.21. Chi-squared value  $\chi^2=0,04(p<0,05)$ . Cows with the AA genotype had significantly high milk yield rates of +341.8 kg,

$p\leq 0.01$ ; with AK genotype, fat percentage +0.131,  $p\leq 0.01$  in 305 days 1 lactation. Calculation of the Student's criterion when comparing milk yield and fat content for full lactation (№1) of cows with different genotypes showed that all the empirical values of are in the zone of insignificance.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Позовникова М.В. Молочная продуктивность коров с различными генотипами гена DGAT1. Эл. Ресурс. Режим доступа: <http://www.agroyug.ru/news/id-29874>. (Дата обращения: 24.02.2020).
2. Citek J., Rehout V., Hradecka E. et al. The breeding values of German Holstein sires and the DGAT1 polymorphism // Archives Animal Breeding. – 2007. V.50. - №2. – P.136-146.
3. Gautier M, Capitan A, Fritz S et al. Characterization of the DGAT1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. J. DairySci. 2007. Jun; № 90 (6). P. - 2980-2988.
4. Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, et al. 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 Res. - 2002. - 12: 222–231.
5. Naslund J., Fikse W.F., Pielberg G.R., Lunden A. Frequency and effect of the Bovine acyl\_CoA: diacylglyc\_erolacyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism in Swedish dairy cattle // Journal of dairy science.- 2008. - V.91. - P.2127–2134.
6. Wang X., Wurmser C., Pausch. Identification and dissection of four major QTL affecting milk fat content in the German Holstein-Friesian population. PLoSONE, 2012. doi.org/10.1371/journal.pone.0040711