

Министерство образования и науки Республики Казахстан

Костанайский государственный университет имени А.Байтурсынова

Кафедра биологии и химии

И.С. Бейшова

Е.В. Белая

Г.Д. Чужебаева

Т.В. Поддудинская

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ МАРКИРОВАНИЕ МЯСНОЙ И МОЛОЧНОЙ
ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

Учебно-методическое пособие

Костанай, 2018

УДК 636.2
Б 41

Рецензенты:

Кикебаев Набидолла Аханович - д.с.-х.н., автор муголжарской породы, директор конного завода «Қазақ тұлпары».

Рахманов Сейлхан Султанбекович - д.с.-х.н., старший научный сотрудник отдела генетики, Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства, г. Алматы.

Терлецкий Валерий Павлович – д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, г. Санкт-Петербург.

Авторы:

Бейшова Индира Салтановна - к.с.-х.н., доцент.

Белая Елена Валентиновна - к.б.н., научный сотрудник лаборатории генетики животных Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Чужебаева Гульжаган Джамбуловна - к.в.н., доцент

Поддудинская Татьяна Владимировна – м.с.-х.н., младший научный сотрудник

Б 41 Бейшова И.С.

Генетическое маркирование мясной и молочной продуктивности крупного рогатого скота. Учебно-методическое пособие / И.С. Бейшова, Е.В. Белая, Т.В. Поддудинская –Костанай, 2018. – 138 с.

ISBN 978-601-7387-42-6

В учебно-методическом пособии рассматриваются методы оценки генетического потенциала продуктивности племенного поголовья крупного рогатого скота и их использование в селекции. Предназначено для специальностей 6М080200-ТППЖ, 5В070100-Биотехнология, 5В060700, 6М060700-Биология. –Костанай, 2018. – 138 с.

УДК 636.2

Утверждено и рекомендовано к изданию Республиканским учебно-методическим советом Казахского Национального Аграрного Университета, 31.05.2018 г, протокол № 2.

ISBN 978-601-7387-42-6

© Бейшова И.С., 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
1 Маркер-ассоциированная селекция и ее роль в современной селекции сельскохозяйственных животных.....	10
1.1 Молекулярные маркеры: сущность, свойства и классификация..	12
1.2 Генетическое маркирование признаков молочной продуктивности.....	17
1.2.1 Полиморфизм гена каппа-казеин (bCSN3).	17
1.2.2 Полиморфизм гена альфа-лактальбумина (α -LA).	20
1.2.3 Полиморфизм гена β -Лактоглобулина (β LG).	21
1.2.4 Полиморфизм гена пролактина (bPRL).	24
1.3 Генетическое маркирование признаков мясной продуктивности...	25
1.3.1 Полиморфизм гена тиреоглобулина (bTG).	26
1.3.2 Полиморфизм гена диацилглицерол О-ацилтрансферазы (bDGAT).....	27
1.3.3 Полиморфизм гена лептина (bLep).	28
2 Маркирование молочной и мясной продуктивности по генам соматотропинового каскада.....	31
2.1 Гипофизарный фактор транскрипции.....	32
2.1.1 Структура гена bPit-1 и механизм регуляции его экспрессии.....	34
2.1.2 Биологическая роль белка Pit-1.....	35
2.1.3 Полиморфизм гена bPit-1.	36
2.1.4 Ассоциация полиморфных вариантов гена bPit-1 с признаками мясной и молочной продуктивности.....	38
2.2 Гормон роста (GH).	41
2.2.1 Структура гена bGH. Регуляция экспрессии гена гормона роста bGH.	41
2.2.2 Характеристика белка гормона роста и его биологический эффект.....	42
2.2.3 Ассоциация полиморфных вариантов гена гормона роста с признаками мясной и молочной продуктивности.	44
2.3 Рецептор гормона роста (GH R).	49
2.3.1 Структура гена рецептора гормона роста bGH R. Особенности экспрессии.	49
2.3.2 Характеристика белка рецептора гормона роста GH R и его биологическая функция.....	50
2.3.3 Ассоциация полиморфных вариантов гена рецептора гормона роста с признаками мясной и молочной продуктивности.	52
2.4 Инсулиноподобный фактор-1. Структура и экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста-1 (<i>bIGF-1</i>).....	56
2.4.1 Характеристика белка IGF-1 и биологическая роль.....	57
2.4.2 Полиморфизм гена bIGF-1 и его ассоциация с признаками	

мясной и молочной продуктивности.	59
3 Исследование полиморфных генов молочной и мясной продуктивности крупного рогатого скота методом ПЦР-ПДРФ.....	62
3.1 Пробоподготовка и выделение ДНК из образца	63
3.2 Качественная и количественная оценка ДНК.....	71
3.3 Проведение ПЦР-ПДРФ для генов молочных белков.....	75
3.3.1 Постановка ПЦР-ПДРФ для гена каппа-казеина (bCSN3).....	76
3.3.2 Постановка ПЦР-ПДРФ для гена альфа-лактальбумина (bLALBA).....	79
3.3.3 Постановка ПЦР-ПДРФ для гена бета-лактоглобулина (β LG).....	82
3.4 Проведение ПЦР-ПДРФ для генов соматотропинового каскада...	86
3.4.1 Постановка ПЦР-ПДРФ гена гипофизарного фактора транскрипции-1 (bPit-1).....	87
3.4.2 Постановка ПЦР-ПДРФ гена гормона роста (bGH).....	91
3.4.3 Постановка ПЦР-ПДРФ гена рецептора гормона роста (bGHR)...	95
3.4.4 Постановка ПЦР-ПДРФ гена инсулиноподобного фактора роста-1 (bIGF-1).....	99
3.5 Ошибки ПЦР-ПДРФ и их предотвращение.....	102
3.6 Статистическая обработка данных для оценки эффективности маркеров.....	105
Список использованных источников.....	110
Обозначения и сокращения.	135
Определения.....	137

ВВЕДЕНИЕ

С древних времен Казахстан представлял собой страну кочевников-животноводов. Именно скот для казахов во все времена был мерилом всех благ.

Но, хотя сельскохозяйственная отрасль Казахстана по ее роли в структуре и в целом в воспроизводственном процессе экономики является базовой, приходится констатировать, что в настоящее время наша республика превратилась из экспортера в импортера мясной продукции. В стране, несмотря на увеличение выпуска всех видов мяса, импорт сохраняется. Говядина занимает самое первое место по импорту - ее в Казахстан завозят в объеме 9411,17 тонн. А между тем, одним из преимуществ отечественной сельскохозяйственной продукции является натуральность (низкая доля генетически модифицированных организмов и земель, удобряемых химическими элементами) [1]. По прогнозу экспертов Организации экономического сотрудничества и развития, с 2015 по 2025 годы в развивающихся странах опережающими темпами возрастет спрос на мясо - на 23 %. При этом, 70 % роста мирового спроса на мясо будет приходиться на азиатские государства. Учитывая такую тенденцию, наша республика должна занять определенную значимость среди мировых экспортеров мяса [2, 3].

Важно помнить, что состояние животноводства определяет уровень продовольственной безопасности государства и социально-экономическую обстановку в обществе. В своем послании Н. Назарбаев одной из десяти глобальных вызовов XXI века назвал угрозу глобальной продовольственной безопасности [4].

В связи с этим в стране началась реализация крупномасштабной программы по развитию мясного скотоводства [5]. В соответствии со Стратегией развития до 2020 года, перед агропромышленным комплексом в числе семи приоритетных секторов поставлена задача в полной мере реализовать свои отраслевые преимущества и масштабный потенциал [6]. Казахстану необходимо более эффективно использовать свои конкурентные преимущества, особенно в производстве экологически чистой продукции.

В связи с выше перечисленным, в целях реализации государственной политики, направленной на развитие агропромышленного комплекса, в рамках государственной Программы по развитию агропромышленного комплекса в Республике Казахстан на 2013-2020 гг. «Агробизнес-2020», разработаны отраслевые мастер-планы по каждому направлению развития агропромышленного комплекса. Для создания условий для развития отрасли мясного скотоводства и реализации экспортного потенциала мяса КРС в Республике Казахстан в период до 2020 года был составлен «Мастер план развития отрасли мясного скотоводства в Республике Казахстан до 2020 года». Основными задачами этого мощного государственного проекта (среди прочих) выделены:

- увеличение маточного поголовья племенного КРС мясных пород и ведение племенной работы;

- Повышение квалификации фермеров, развитие системы передачи знаний и коммерциализации технологий [3].

К основным проблемам, препятствующим развитию отрасли (среди прочих) относятся:

- низкий удельный вес племенных животных в общей численности поголовья КРС мясного направления продуктивности (8,2 %);

- недостаточное количество маточного поголовья товарного стада (по состоянию на 20 августа 2013 года – 311 тыс. голов);

- низкий уровень продуктивности и соответственно невысокий убойный выход мяса с туши (154 кг в среднем).

Поэтому среди других мер для выхода из сложившейся ситуации является создание благоприятных условий для фермерского бизнеса, с переводом маточного поголовья из ЛПХ в СХТП (фермерские и крестьянские хозяйства), а также завоз поголовья из других стран для скорейшего увеличения маточного поголовья в стране.

Однако, завозные породы, высокопродуктивные в тех условиях, в которых были выведены, не всегда адаптированы к условиям климата, содержания, кормления и инфекционному фону Казахстана. Это ведет к недостаточной реализации генетического потенциала на территории Республики Казахстан. Поэтому значительную роль играют селекционные мероприятия, направленные на создание помесных пород, обладающих продуктивностью мировых лидеров и устойчивостью местных пород, веками разводимых на данной территории. А современные темпы развития мировой экономики требуют от этих мероприятий скорости и точности оценки и высокой эффективности отбора племенного поголовья в ходе их реализации.

Целью данных методических рекомендаций является обзор современных и высокоэффективных методов оценки генетического потенциала продуктивности племенного поголовья крупного рогатого скота, доступные для реализации в условиях центров племенного разведения.

Понятие о генетическом полиморфизме и сохранении биоразнообразия животных

В последние годы изучение генетического полиморфизма стало одним из наиболее важных и плодотворных направлений, как фундаментальной генетики, так и прикладных исследований. Ряд разработок в этой области успешно используют для повышений эффективности селекции сельскохозяйственных животных. Повышенный интерес к изучению генетического полиморфизма у сельскохозяйственных животных вызван тем, что с его помощью по фенотипу без проведения гибридологических скрещиваний у медленно размножающихся животных можно судить об их генетике [7].

Полиморфизмом, по определению Е.В. Ford (1964), называется явление, когда в популяции есть сразу две или больше генетически детерминированных вариаций какого-нибудь признака, и их пропорция такова, что частота самой редкой вариации зависит не только от интенсивности мутационного процесса в определенном локусе, но является результатом состояния уже существующих аллелей [7].

Признак является полиморфным, если самой редкой вариацией обладает хотя бы 1% индивидов с условием, что обследована достаточно большая популяция – не менее чем 500 членов. Так, если реализация практически всей генетической информации протекает не иначе, как через синтез соответствующих белков, которые являются и пластическим материалом более сложных структур и катализаторами биохимических процессов, то, в конце - концов, любой признак можно свести к простому генетико-биохимическому акту. Это означает, что практически любой фиксируемый признак можно считать полиморфным, если в сходных условиях внешней среды он проявляет вариабельность, не свойственную его модификационной изменчивости [8].

Более конкретно генетический полиморфизм можно определить как разнообразие генетических локусов, выявляемое в ходе изучения наследственного материала организма. Лocus считается полиморфным, если в популяции существуют еще два или более подобных аллеля. Однако, в том случае, если один из аллелей имеет очень высокую частоту встречаемости, например, 99 % и более, то есть вероятность, что другой аллель может быть вовсе не выявлен. Поэтому, исходя из практической целесообразности, locus рассматривается как полиморфный только при частотах встречаемости аллелей ниже 99 % [9].

Многие первичные генетические исследования в популяциях домашних животных велись в направлении изучения хозяйственно-полезных и интерьерно-физиологических признаков, поэтому первые описания полиморфизма относятся к морфологическим признакам, таким как окраска шерстяного покрова, оперение, комолость или рогатость скота, форма гребени у кур и т.д., и позже по группам крови, белкам и ферментам крови, молока и др.

Из интерьерных признаков классическим примером полиморфизма являются группы крови, которые наглядно показывают, какое огромное антигенное разнообразие одних только эритроцитов в отдельных популяциях. Полиморфизм обнаружен почти у всех видов животных от простейших до позвоночных.

Таким образом, полиморфизм охватывает большой круг явлений, которые можно объединить единой генетической теорией эволюции популяций. Механизм поддержания полиморфизма в популяции одним из первых пробовал объяснить R.A. Fischer [10]. По его теории приспособляемость гетерозигот (Aa) выше, чем гомозигот (AA или aa), а оба аллеля сохраняются с промежуточной частотой, даже если гомозигота (aa) будет летальной, ген a в популяции все равно сохраняется, при условии, что селективная ценность гетерозиготы (Aa) будет больше, чем гомозиготы. Таким образом, генный фонд будет постоянно пополняться из гетерозиготных (Aa) индивидов, которым благоприятствует отбор. Полиморфизм такого характера называется сбалансированным [11].

Превосходство гетерозигот можно объяснить следующим образом:

1. В случае, когда гетерозис обусловлен доминантностью, превосходство гетерозигот объясняется повышением жизнеспособности в результате увеличения у гибридов числа доминантных генов в локусах, которые в родительских популяциях были гомозиготными различного рода рецессивами.

2. Если гетерозис обусловлен сверхдоминантностью, то преимущество гетерозигот обуславливается следующими факторами:

- а) дополняющие друг друга действие двух аллелей;
- б) сменный (альтернативный) синтез двух продуктов действия гена в разных условиях;
- в) выявление дополнительного полезного гибридного вещества.

Согласно теории гетерозиса, гетерозиготы особенно выгодны при колеблющихся внешних условиях, так как в однородных условиях гетерозиготы лишаются своего превосходства, и возрастает относительное преимущество между гомозиготами. В замкнутой популяции это может привести к утрате гетерозиготами гетерозиса, следовательно, и сбалансированного полиморфизма.

Постоянный сбалансированный полиморфизм возможен лишь тогда, когда при течении отбора в противоположном направлении увеличивается преимущество гетерозигот или преимущество редких гомозигот.

Однако, существуют факты, в том числе из области исследований групп крови, показывающие, что отбор может происходить и против гетерозигот и мутаций, например, явление антигенной несовместимости групп крови матери и эмбриона некоторых видов животных.

Согласно И.И. Шмальгаузену (1968), любой вид полиморфизма требует наличия генетически различных структур, которые в соответствующих

условиях проявляют соответствующую генетически детерминированную норму реакции.

Благодаря наличию именно этой нормы осуществляется адаптационная пластичность и эволюция как домашних, так и диких животных [11].

Полиморфизм как общее биологическое явление сопротивляется уменьшению генетической изменчивости, сохраняя генетическую вариабельность популяций как один из основных адаптивных и селективных факторов.

Такое огромное распространение полиморфизма – один из самых важных факторов генетического приспособления организма и результат отбора.

Полиморфизму характерна не внешняя сторона фенотипического проявления различий (прерывистые или непрерывистые переходы между морфами, видимые или невидимые внешние признаки), а их регулярность и постоянство в каждой отдельной популяции. Это, прежде всего та часть генетического разнообразия, которая сформировалась эволюционно, уже вошла в достаточно стабильной форме в генофонд вида и отражает наследственную специфику популяции [8].

Следует отметить широкие перспективы использования молекулярно-генетических подходов в оценке биоразнообразия, изучении структуры популяции сельскохозяйственных животных и в породообразовательном процессе. Расчет нескольких важных популяционно-генетических параметров на реально существующих генофондных стадах животных позволяет более осмысленно разрабатывать стратегию разведения в этих малочисленных популяциях.

Любая порода обладает своеобразным, уникальным набором генов – генофондом породы и представляет собой продукт мутации, дрейфа генов, эволюции в течение многих десятков, а то и сотен лет, со своим механизмом адаптации к окружающей среде, устойчивостью к эндемичным паразитарным и инфекционным болезням, со своим ареалом продуктов питания и соответствующим определенным критериям человеческого общества, в недрах которого она создавалась [12].

"... в лице генофонда мы имеем такое же национальное богатство, как в виде запасов нефти, запасов золота, угля, скрытых в наших недрах" – эти слова принадлежат А.С. Серебровскому, который в 1927 году впервые поднял проблему сохранения и рационального использования генетического фонда животных. Из пятидесяти тысяч известных видов птиц и млекопитающих чуть более сорока четырех видов используются в сельском хозяйстве, из них наиболее распространены восемнадцать. Многие породы уничтожены и, по оценкам международных экспертов, около 30% угрожает вымирание. По разным подсчетам, в процессе совершенствования животных погибло более тысячи старых популяций за последние сто лет.

Скотоводство – это прежде всего породы. Пренебрежительное отношение к объективным законам природы вызывает прогрессирующую эрозию

генофонда отечественных пород. Темпы сокращения генетического разнообразия настолько серьезны, что увеличение численности животных той или иной породы не в состоянии сдержать интенсивность этого процесса. Постоянная закупка скота за рубежом привела к формированию однотипного стада. Кроме того, 70% животных в Европе эрозировано, то есть характеризуется ослаблением конституции, низким уровнем оплодотворяемости, появлением уродств и наследственных заболеваний.

Проблема сохранения генофонда имеет огромное практическое значение в том числе и для животноводства республики. В настоящее время для решения этой проблемы требуется комплексный подход к социальным, экономическим, научным и организационным аспектам сохранения генетических ресурсов животных.

Как показывает опыт, финансирование, организационные меры, социальные факторы зачастую имеют первостепенное значение в данной области. Крайне важна и законодательная база.

Широкое использование лучшего мирового генофонда должно быть отрегулировано планом селекционной работы, с учетом генотипа каждого животного. Одним из приоритетных направлений развития науки и техники является мобилизация, сохранение и использование генофонда животных с хозяйственно-полезными признаками. В связи с этим, уделяется значительное внимание выявлению маркерных генов, ответственных за эти признаки и их анализ с целью последующего установления закономерных связей. Поэтому изучение генофонда пород сельскохозяйственных животных является одним из важнейших направлений на протяжении последнего столетия.

1 Маркер-ассоциированная селекция и ее роль в современной селекции сельскохозяйственных животных

Развитие животноводства на современном этапе невозможно без внедрения новых биотехнологических методов оценки признаков продуктивности сельскохозяйственных животных, базирующихся непосредственно на анализе наследственной информации. Успехи в области молекулярной биологии, молекулярной генетики и геномной инженерии привели к широкому использованию молекулярно-генетических методов в различных областях науки и практики, в том числе и в животноводстве [13]. В этой связи, разработка и внедрение в практическое животноводство геномной диагностики (ДНК-диагностики) является актуальной задачей фундаментальной и прикладной биотехнологии, одной из областей применения которой является разведение и селекция сельскохозяйственных животных [14].

Большая часть хозяйственно ценных селекционных признаков имеет полигенный характер, т.е. контролируется множеством генов. При этом изменчивость признаков под воздействием факторов внешней среды может достигать 50 %. В то же время имеются гены или группа генов, а точнее аллели

этих генов, вклад которых в проявление того или иного признака продуктивности при любых условиях среды более значителен и имеет четко выраженный эффект. Такие гены называются основными генами количественных признаков (Quantitative Trait Loci, QTL). Поэтому при оценке хозяйственно-полезных признаков продуктивности, наиболее информативным является подход позиционного картирования, позволяющий одновременно оценивать состояние многих элементов генома, представленных на всех хромосомах [15, 16]. В настоящее время это направление называется "маркер-зависимая селекция" (Marker Assisted Selection - MAS) и разрабатывается в странах с развитым животноводством [17, 18].

Становление принципов маркер-зависимой селекции связано с именем А.С. Серебровского. Еще в 20 годы прошлого века он предложил использовать фенотипические признаки с моногенным характером наследования в качестве «сигналиев» - генетических маркеров - для облегчения контроля передачи определенного генетического материала в поколениях и, соответственно, облегчения решения главной проблемы практической селекции - подбора и отбора организмов при формировании хозяйственно ценных групп [19].

Значение маркерной селекции в животноводстве сложно переоценить. Маркер-зависимая селекция обладает рядом преимуществ перед традиционными методами селекции. Она не зависит от изменчивости, обусловленной внешней средой, делает возможным оценку и отбор животных в раннем возрасте независимо от пола, не требует больших затрат, повышает интенсивность селекции. Она способствует идентификации и быстрому введению предпочтительных аллелей из ресурсных популяций в популяции-реципиенты для повышения продуктивности и устойчивости к заболеваниям улучшаемых пород животных.

Методы селекции, в которых применяются ДНК-маркеры, разделяют на две основные группы: геномная селекция и маркер-ассоциированная селекция.

Геномная селекция (genomic selection). Метод современной селекции растений и животных, позволяющий при использовании равномерно распределенных по геному ДНК-маркеров проводить отбор по генотипу в отсутствие данных о генах, влияющих на признак. После полного секвенирования геномов сельскохозяйственных животных, в том числе *Bos Taurus* получила развитие геномная селекция с разработкой генетических панелей на десятки и сотни тысяч полиморфизмов генов. Так компания «Нуро» первой анонсировала полную рыночную программу геномной селекции в свиноводстве, объявив 12 июня 2012 г. о предложении своим клиентам поголовья отобранного с помощью геномной селекции. А компания «Ulumina» разработала панель, содержащую 54609 единичных полиморфизмов генов для получения геномных профилей скота.

Маркер-ассоциированная селекция предполагает использование ДНК-маркеров, тесно сцепленных с целевым геном, вместо или вместе с фенотипическим анализом. Такой подход в современной селекции растений и

животных, позволяет проводить отбор по генотипу при использовании ДНК-маркеров, тесно сцепленных с селектируемым геном.

Маркеры, тесно сцепленные с целевым геном, являются надежным инструментом для предсказания фенотипа. Отбор нужного аллеля целевого гена осуществляется на основе тесно сцепленного с ним аллеля соседнего маркерного локуса. Бóльшая точность отбора достигается при использовании пары маркеров, расположенных вблизи гена по разные стороны от него (т. е. маркеров, фланкирующих целевой ген). Если ген отсекается и выявлены различия нуклеотидной последовательности разных аллелей данного гена, то можно разработать так называемый «внутригенный маркер». Использование такого маркера позволит отбирать нужные генотипы с наиболее высокой точностью. При отсутствии внутригенного или тесно сцепленного с геном ДНК-маркера можно использовать более отдаленные маркеры, однако в таких случаях целесообразно сочетать ОПМ с последующим фенотипированием. Такой комбинированный подход называется «тандемным» отбором или маркер-направленным фенотипированием [20].

Контрольные вопросы:

1. Понятия генотип и фенотип
2. Кто является основоположником маркер-ассоциированной селекции?
3. Преимущества маркер-зависимой селекции
4. Понятие геномной селекции

5. Полиморфизм – это: а) существование в популяции двух или более генетически детерминированных вариаций какого-нибудь признака; б) многократное, независимое возникновение одного и того же вида; в) локальные изменения в последовательностях ДНК в пределах генома, вызванные делециями, инверсиями, инсерциями или какими-то другими перестройками; г) любое структурное изменение в ДНК организма.

1.1 Молекулярные маркеры: сущность, свойства и классификация

В качестве маркеров предлагается рассматривать полиморфные генетические системы. Наличие полиморфизма является необходимым условием использования генетического локуса в качестве маркерного. Например, гены, кодирующие биохимические признаки, могут использоваться в качестве маркеров, если они детерминируют варианты, различающиеся по электрофоретической подвижности (продукты полиморфных локусов представлены на электрофореграммах спектрами полос, предполагающими кодоминантную экспрессию, то есть, гетерозиготы характеризуются по крайней мере двумя полосами активности, а гомозиготы - одной полосой с различными скоростями миграции) QTL [17].

Из всех генетических маркеров наиболее информативным и удобным для использования в практической прикладной селекции является SNP (Single Nucleotide Polymorphism), так называемый снп или однонуклеотидный полиморфизм, т.е. отличие в последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, С или G), которое может быть причиной изменения последовательности чередования аминокислот в белке. В зависимости от такого изменения действие белка в цепочке биохимических реакций усиливается или ослабляется, что в свою очередь изменяет в ту или иную сторону проявление признака продуктивности. Многолетними исследованиями было установлено, что у сельскохозяйственных животных насчитывается несколько сотен тысяч таких маркеров, в среднем один на пятьдесят тысяч нуклеотидов, которые равномерно распределены по всему геному [21].

Маркерные гены используются для выявления важных для животноводства генов. Маркерные гены особенно важны, для признаков, которые фенотипически проявляются относительно поздно или только у одного пола, а также для признаков, на проявление которых оказывают влияние негенетические факторы (факторы окружающей среды). Примерами такого рода признаков являются резистентность к болезням, предрасположенность к болезням, плодовитость, молочная продуктивность. Целью маркирования является установление сцепления между основным геном и маркерным геном у животного. Так, к примеру, длина хромосомы крупного рогатого скота в среднем составляет 100 сМ, достаточно иметь три удачно расположенных маркера на хромосоме: два маркера, удаленных на расстояние около 20 сМ от центромеры или теломеры, и один - в центре. Следовательно, девяносто расположенных данным образом маркерных локусов достаточно для полного картирования генома крупного рогатого скота.

В генетике животноводства большое значение для дальнейших разработок имеет тщательный выбор генотипов и структуры семьи, а также наличие банков ДНК и банков данных.

Внедрение генетических маркеров в качестве дополнительных критериев при отборе сельскохозяйственных животных ускоряет селекционный процесс и повышает его эффективность.

Молекулярные маркеры (ДНК-маркеры) – это генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК.

ДНК-маркеры являются третьим поколением генетических маркеров. Им предшествовали белковые маркеры, а еще ранее – классические генетические маркеры. Впервые теоретическое обоснование использованию генетических маркеров («сигналей») дал около века назад А.С. Серебровский: «... сигналами мы называем удобные для менделистических наблюдений альтернативные гены с более или менее известной локализацией, которые, не оказывая воздействия на изучаемый трансгрессирующий признак и влияя достаточно определенным образом, облегчают генетический анализ этого признака, позволяя следить за наследованием того участка хромосомы, в котором эти сигналы расположены»

[19]. В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. Наиболее широко используемые ДНК-маркеры перечислены на рисунке 1. Их разделяют на три группы, согласно основному методу анализа: маркеры, исследуемые с помощью блот-гибридизации, ПЦР и ДНК-чипов [20].

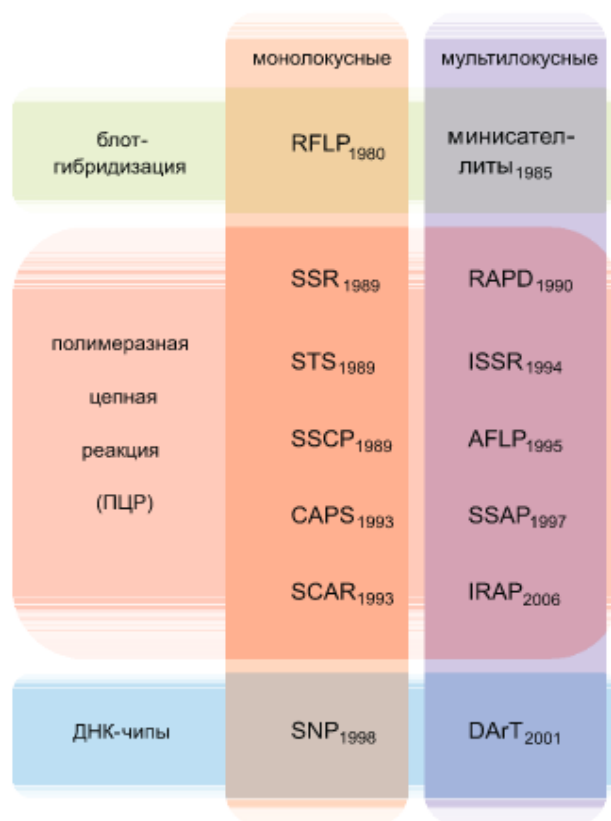


Рисунок 1 - Схематическая классификация молекулярных маркеров и год их первого упоминания в публикациях [20]

Преимуществом ДНК-маркирования является возможность использовать для анализа любые ткани и органы, независимо от стадии развития организма и имеет целый ряд преимуществ по сравнению с другими типами маркеров (таблица 1) [22].

Таблица 1 - Свойства ДНК маркеров [22]

Полезные свойства	– Стабильность наследования; – Отсутствие плейотропного эффекта; – Множественность аллелей; – Информативность о природе генетических изменений; – Возможность проведения ретроспективных исследований. – Возможность тестирования любых последовательностей генома;
--------------------------	--

	– Повсеместность распространения; – Возможность анализа материнского типа наследования (митохондриальная ДНК); – Возможность анализа отцовского типа наследования (Y-хромосома)
Методическое удобство	– Возможность определения в любых тканях. – Возможность определения на любых стадиях развития. – Длительность хранения образцов ДНК. – Возможность использования гербарного материала, ископаемых остатков и т.п.
Отсутствие ограничений в количестве маркеров	– Отсутствие ограничений в числе маркеров на образец. – Наличие маркеров для белок-кодирующих последовательностей. – Наличие маркеров для некодирующих последовательностей (интронные, межгенные, регуляторные области и другие). – Наличие маркеров для повторяющихся последовательностей

Основные классы молекулярных маркеров:

- AFLP (amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов;
- CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности;
- DArT (diversity array technology) – ДНК-чип технология для изучения разнообразия;
- IRAP (interretrotransposon amplified polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами;
- ISSR (inter simple sequence repeats) – межмикросателлитные последовательности;
- RAPD (random amplified polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК;
- RFLP (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов;
- SCAR (sequence characterized amplified region) – амплифицированная область, охарактеризованная нуклеотидной последовательностью;
- SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм.
- SSAP (sequencespecific amplification polymorphism) – полиморфизм сиквенсспецифичной амплификации;
- SSCP (single strand conformation polymorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК;
- SSR (simple sequence repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты);
- STS (sequence tagged site) – сайт/локус, маркированный нуклеотидной последовательностью [20].

Данная классификация отражает процесс «эволюции» ДНК-маркеров. Первая из трех перечисленных выше групп представляет собой первое поколение ДНК-маркеров, получивших широкое распространение в 1980 годы. В 1990 годы ключевые позиции заняли ПЦР-маркеры, в 2000 годы их существенно потеснили молекулярные маркеры, основанные на использовании ДНК-чипов. В последние два-три года для анализа полиморфизма ДНК все чаще используют метод прямого секвенирования генома или его отдельных участков. К молекулярным маркерам наравне с классическими генетическими применяют термины «локус», «аллель», «доминантный», «кодоминантный». Молекулярные маркеры подразделяют на монолокусные и мультилокусные. Монолокусные маркеры наследуются чаще всего по кодоминантному типу, мультилокусные – по доминантному [20].

Маркирование полезных признаков с помощью однонуклеотидных замен у крупного рогатого скота. Поиск генетических маркеров широко ведется среди однонуклеотидных полиморфизмов – генных мутаций, обусловленных выпадением, добавкой или заменой одного нуклеотида. Маркерные SNP могут быть локализованы в пределах генов количественных признаков (генов-кандидатов) и обуславливать возникновение их аллелей с различными фенотипическими эффектами либо находиться на значительном удалении от них, но характеризоваться стабильным наследованием.

Маркерные SNP, расположенные в пределах гена-кандидата, могут оказывать различный фенотипический эффект в зависимости от локализации и характера мутации. Наибольшим эффектом обладают мутации, возникающие в областях экзонов, кодирующих аминокислотную последовательность белка, и приводящие к изменению его первичной структуры. В большинстве случаев мутации, приводящие к изменению в структуре белка или влияющие на интенсивность его экспрессии, фенотипически проявляются в виде различных патологий. В некоторых случаях измененный белок оказывается более эффективным, так как интенсифицирует обмен веществ и предоставляет его обладателю эволюционные преимущества, в случае, если это дикий вид, и селекционные преимущества, если это искусственно разводимый сорт или порода. Однонуклеотидные замены, возникающие в периферических зонах, могут затрагивать последовательности регуляторных элементов гена и таким образом изменять эффективность его экспрессии. Мутации, возникающие в областях интронов – участков, вырезаемых в ходе посттрансляционных модификаций, чаще являются молчащими. Однако в тех случаях, когда интроны содержат регуляторные области, а также области альтернативного сплайсинга, нуклеотидные последовательности, находящиеся внутри интронов, участвуют в активации или репрессии работы гена, либо в посттрансляционных модификациях белка. В таком случае изменения нуклеотидной последовательности этих районов могут производить значительный фенотипический эффект.

Мутации, приводящие к возникновению аллелей генов, участвующих в формировании хозяйственно-полезных признаков, используются для поиска прямых ассоциаций с признаками продуктивности сельскохозяйственных животных [23 - 28].

Прежде чем внедрить использование генетических маркеров в селекцию животных, необходимо выполнить ряд мероприятий, таких как:

- 1) выделить спектр генов-кандидатов, которые могут служить молекулярно-генетическими маркерами QTL;
- 2) разработать тест-системы для анализа их аллельного полиморфизма;
- 3) определить частоты встречаемости аллельных вариантов данных генов у различных пород сельскохозяйственных животных;
- 4) провести корреляционные исследования;
- 5) оценить эффективность использования генетических маркеров в селекции.

Контрольные вопросы:

1. В каком случае гены могут использоваться в качестве генетических маркеров?
2. Что такое SNP?
3. Преимущества ДНК-маркеров
4. Для чего используют маркерные гены?
5. По какому принципу классифицируют ДНК-маркеры?

1.2 Генетическое маркирование признаков молочной продуктивности

В качестве общепринятых генов-маркеров молочной продуктивности коров выделяют гены, принимающие участие в контроле качественного состава молока: ген капа-казеина (*bCSN3*), ген лактоглобулина (*bLGB*) и α -лактальбумина (*b α -LA*), а также гены, контролирующие количественные характеристики молочной продуктивности, такие как удои, жирномолочность и белкомолочность: ген гипофизарного фактора роста-1 (*bPit-1*), ген гормона роста (*bGH*), ген рецептора гормона роста (*bGHR*) и пролактина (*bPRL*), а также ген инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*) и другие.

1.2.1 Полиморфизм гена каппа-казеина *bCSN3*

Казеины (от лат. caseus – сыр) составляют 80% от всех белков молока и относятся к наиболее ценным пищевым белкам, в состав которых входит полный набор незаменимых аминокислот. Кроме того, казеины являются источником пищевого кальция и фосфора [29]. У крупного рогатого скота известно четыре основных типа казеинов – α S1, α S2, β и κ . В молоке они

присутствуют в форме кальций-фосфатных мицелл (тончайших нитей), в стабилизации которых решающую роль играет каппа-казеин (к-казеин). Это единственный белок, на который действует сычужный фермент [30].

В 1972 году была расшифрована полная первичная аминокислотная структура белка каппа-казеина коровы, состоящая из 169 аминокислотных остатков: Asp4, Asn8, Thr15, Ser12, Ser P1, PyroGlu1, Glu12, Gln14, Pro20, Gly2, Ala14, Cys2, Val11, Met2, Ile12, Leu8, Tyr9, Phe4, Lys9, His3, Trp1, Arg5 [31]. Вычисленная молекулярная масса составила 19,037 кДа. А уже в 1988 году выделили ген каппа-казеина (CSN3) КРС и подробно описали его структуру.

Ген каппа-казеина (CSN3) находится в хромосоме 6, имеет размер 13 т.п.н. и состоит из 5 экзонов общей длиной 850 п.н. и 4-х интронов. По своей структуре он значительно отличается от остальных казеиновых генов. Все его интроны имеют относительно большую длину. Третий интрон содержит повторяющиеся последовательности типа Alu, а также полиморфные микросателлиты [32].

Следует отметить, что большая часть белок-кодирующей последовательности находится в одном большом экзоне IV, кодирующем функционально важный участок белка, расщепление которого приводит к разрушению мицеллярной структуры казеинового комплекса и створаживанию молока [33].

Полиморфизм каппа-казеина был открыт одновременно несколькими учеными [34, 35, 36]. В основе белкового полиморфизма каппа-казеина лежит генетический полиморфизм последовательности гена CSN3. Все аминокислотные замены в последовательности белка обусловлены нуклеотидными заменами в соответствующей кодирующей протеин последовательности ДНК [37].

Как и другие белки молока, каппа-казеин встречается в нескольких вариантах, выявляемых посредством электрофоретического разделения казеиновой фракции в полиакриламидном геле. Причинами белкового полиморфизма являются единичные аминокислотные замены (рисунок 2), приводящие к изменению электрофоретической подвижности.

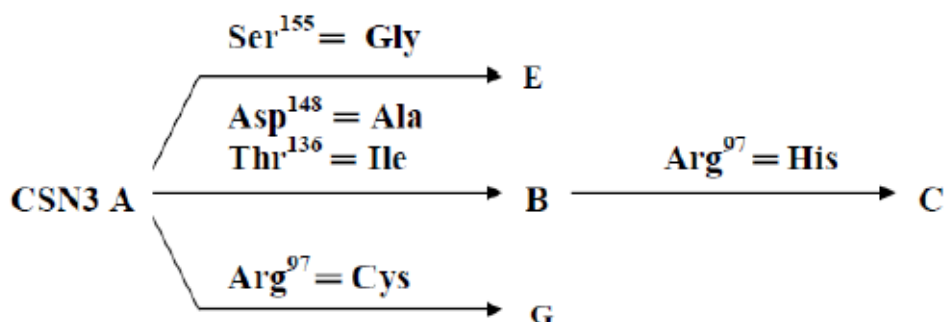


Рисунок 2 - Белковый полиморфизм каппа-казеина крупного рогатого скота [37]

На сегодняшний день описано тринадцать генетических вариантов *CSN3*: *A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *Az*, *H*, *X*, *I*, *A(1)* и *J* [38]. Наиболее часто у КРС встречаются *A*- и *B*-аллельные варианты *CSN3*, различающиеся двумя аминокислотными заменами в 136 (Thr→Ile) и 148 (Asp→Ala) положениях полипептидной цепи, вызванными соответствующими точковыми мутациями в позициях 5309 (C→T) и 5345 (A→C) [39].

Генетические варианты *A* и *B* гена *CSN3* присутствуют во всех породах КРС, но с различной частотой встречаемости. Так частота *B*-аллеля у пород, относящихся к *Bos taurus*, выше и находится в диапазоне от 0,34 до 0,56 (за исключением джерсейской), по сравнению с *Bos indicus*, у которых частота того же аллеля колеблется от 0,07 до 0,09 [40]. Согласно данным D. Vasicek et al. (1995), аллельный вариант *B* представлен у голштино-фризов с частотой 0,21, у животных чёрно-пёстрой породы (немецкий тип) – 0,22, у симментальской породы – 0,56 и у пинцгау – 0,24 [41]. Данные, опубликованные в США (Н. Hansen, 1990) показывают, что процент генотипов с *B*-аллелем гена *CSN3* для джерсейской породы составляет 80%, бурой швицкой – 65%, голштино-фризской – 20% [42]. Довольно высокая частота встречаемости этого же аллеля характерна для таких российских аборигенных пород, как: калмыцкая (0,324), костромская (0,405) и ярославская (0,475) [43].

Тестирование *A*- и *B*-аллелей представляет интерес с точки зрения практики, так как молоко коров, несущих в генотипе *B*-аллель каппа-казеина имеет по сравнению с *A*-аллельным вариантом лучшую температурную устойчивость, более короткое время коагуляции, лучшую свертываемость и содержит мицеллы меньшего диаметра, что гораздо предпочтительнее для производства сыров [44].

К.Ф. Ng-Kwai-Hang отмечает, что в молоке коров, несущих *BB*-генотип каппа-казеина, более высокое процентное содержание белка по сравнению с *AA*-генотипом каппа-казеина. При производстве сыра из молока коров с генотипом *BB* каппа-казеина, время коагуляции было короче на 24%, консистенция сгустка была лучше, а выход готовой продукции на 6% больше, чем при производстве сыра из молока коров, несущих гомозиготный генотип *AA* [45]. Схожие результаты наблюдались в работах: А. Comin et al., 2008; Т.М. Ахметов и др., 2009; Г.А. Бадин и Б.В. Шалугин, 2011; Г.М. Гончаренко и др., 2013 [46-49].

Европейская ассоциация животноводов и ряд крупных коммерческих фирм по животноводству предложили считать *BB* генотип каппа-казеина – экономически важным селекционным критерием для пород КРС, специализированных в молочном направлении продуктивности. По сообщению А.Ш. Тинаева во многих странах мира, например, Германии, Дании, Голландии, селекция по генотипам каппа-казеина включена в программы по разведению КРС [50].

Контрольные вопросы:

1. Какие гены являются генами-маркерами молочной продуктивности?
2. Сколько аллелей описано у гена каппа-казеина?
3. Какую из аллелей гена *bCSN3* можно использовать в качестве маркера молочной продуктивности?
4. С какими показателями молочной продуктивности связан полиморфизм ген каппа-казеина?
5. Где локализован ген каппа-казеина?

1.2.2 Полиморфизм гена альфа-лактальбумина (α -LA)

Альфа-лактальбумин - это важный белок сыворотки коровьего молока, а также молока других млекопитающих, кодируемый этим геном. Экспрессия гена альфа-лактальбумина повышается в ответ на гормон пролактин и приводит к повышению синтеза лактозы. Белок α -лактальбумин входит в состав гетеродимера регуляторной субъединицы синтетазы лактозы, а β -1,4-галактозилтрансфераза (*beta4Gal-T1*) является каталитической субъединицей. Эти белки активируют синтетазу лактозы, которая переносит остаток галактозы к молекуле глюкозы, образуя при этом дисахарид лактозу. В мономерной форме альфа-лактальбумин прочно связывает ионы цинка и кальция, что обуславливает бактерицидную и противоопухолевую функцию данного белка. Одна из форм фолдинга альфа-лактальбумина, называемая *hamlet*, вызывает апоптоз в опухолевых и недифференцированных клетках [51].

Белок - α -лактальбумин (α -LA), входящий в состав молочной сыворотки является важным признаком качества молока, характеризующим его полезные свойства. Белок α -LA — небольшой глобулярный протеин, состоящий из ста двадцати трех аминокислот и имеющий молекулярную массу четырнадцать кД, играет важную роль в биосинтезе лактозы. При участии эпителиальных клеток молочной железы, α -LA в комплексе с галактозилтрансферазой участвует в формировании фермента лактозсинтазы, который, в свою очередь, синтезирует лактозу в аппарате Гольджи, а лактоза, затем, в комплексе с α -LA секретируется в молоко. Содержание α -LA и лактозы в коровьем молоке составляет около 1,5 г/л, что соответствует 5%. Лактоза, содержащаяся в секреторных везикулах эпителиальных клеток молочных желез, создает внутри клетки повышенное осмотическое давление, благодаря которому внутрь везикул поступает вода. Таким образом, повышение концентрации α -LA, являющегося ключевым регулятором синтеза лактозы, вызывает пропорциональное увеличение выхода молока [52].

Ген, кодирующий бычий α -лактальбумин (*b α -LA*), локализован у КРС в 5 хромосоме и состоит из 2023 п.н., включая четыре экзона и три интрона. *b α -LA* характеризуется наличием нескольких полиморфных вариантов: в позициях +15, +21, +54 [53] и -1689 [52], относительно точки старта транскрипции 5'

фланкирующего региона. Вариабельность в этом регионе может приводить к различной способности связывания РНК-полимеразы и факторов транскрипции, участвующих в регуляции экспрессии гена. Теоретически, замены в последовательности генетических регуляторных элементов в данном участке могут изменять степень экспрессии мРНК, кодируемой этим геном [52]. Данные полиморфизмы являются следствием точковых мутаций, в частности в позиции -1689, замена аденина на гуанин приводит к образованию двух аллельных вариантов гена. Аденин в этой позиции был обозначен как $b\alpha$ -LA^A-аллель, а гуанин – как $b\alpha$ -LA^B-аллель [52, 55]. Lundén А. с соавторами была показана взаимосвязь между (-1689) полиморфизмом и концентрацией лактозы в молоке. Так у коров с $b\alpha$ -LA^{AA}-генотипом с 1 кг молока выделяется лактозы больше на 0,08 %, чем у особей с другими генотипами [56].

Таким образом, учитывая роль α -лактальбумина в биосинтезе лактозы и продукции молока в целом, ген $b\alpha$ -LA может быть использован как потенциальный генетический маркер молочной продуктивности КРС, в частности удойности и белковомолочности.

Контрольные вопросы:

1. Где локализован ген α -лактальбумина?
2. Какая аллель гена $b\alpha$ -LA связана с большим количеством лактозы в молоке?
3. Какова биологическая функция белка α -лактальбумина?
4. Кто показал связь между (-1689) полиморфизмом и концентрацией лактозы в молоке?
5. Структура белка α -лактальбумина.

1.2.3 Полиморфизм гена β -Лактоглобулина ($b\beta$ LG)

Бета-лактоглобулин – серосодержащий белок, являющийся, наряду с альбумином, основным белком молочной сыворотки, который не осаждается сычужным ферментом. Впервые был выделен в кристаллической форме в 1934 году из коровьего молока. При пастеризации молока β -LG денатурируется.

Бета — лактоглобулин содержится в молоке различных видов, в том числе собак и дельфинов и является основным сывороточным белком жвачных животных [57].

Бета — лактоглобулин составляет около 50% сывороточных белков молока. Белок имеет молекулярную массу 150000-106 Да. Содержит много сульфгидрильных групп. При нагревании молока часть SH - групп отщепляется в виде SH₂, что дает кипяченому молоку специфический запах [58]. В молоке с кислотностью pH 5,2 - 7,5 бета - лактоглобулин является димером, состоит из двух одинаковых групп с массой около 18-103 Да [59]. При кислотности выше pH 7,5 бета — лактоглобулин необратимо денатурирует, при

pH ниже 3,5 происходит обратимая диссоциация мономеров, а при pH между 3,5 — 5,2 белок обратимо приобретает форму тетрамеров / октамеров [60].

Последовательность аминокислот и трехмерная структура показывают, что бета — лактоглобулин относится к группе липокалинов (англ. lipocalins) — это группа транспортных белков с характерной вторичной структурой. Они содержат восемь антипараллельных пептидных последовательностей на основе бета-складчатой структуры, которые формируют цилиндр. Такой «цилиндр» содержит внутри лиганд-связывающий участок.

Бета—лактоглобулин крупного рогатого скота связывает широкий диапазон лиганд, возможно, это-одна из причин его присутствия в молоке, обеспечивающая выполнение им физиологической роли. Он участвует в транспорте гидрофобных лиганд, регулирует ферментацию и пассивный иммунитет у новорожденных. Однако эти функции между видами различаются.

Сравнивая последовательность белков группы липокалинов, оказалось, что гликоделин, найденный в оболочке матки во время ранней беременности, наиболее схож с LGB. Гликоделин - гликопротеин с сильной иммуносупрессивной и контрацептивной активностью. Секретируемый железистым эпителием эндометрия, он может играть роль иммуномодулятора, обеспечивает защиту полуаллогенного эмбриона от иммунной атаки материнского организма [61]. Предполагают, что транспорт молекул, необходимых для развития эмбриона, из его микроокружения, влияет на дифференцировку трофобласта, регулируя его эндокринную функцию [62], играет важную роль в подготовке эмбриона к имплантации, стимулируя функциональное созревание эндометрия [63]. У многих видов животных наибольшее количество бета — лактоглобулина содержится в молочной железе во время лактации, он является источником аминокислот для новорожденных, и эта функция возникла при дупликации гена гликоделина [64].

При электрофорезе на фореграмме выделяются 6 белков сыворотки: быстрая фракция, (З-лактоглобулин, а-лактальбумин, альбумин сыворотки крови, протеозопептонная фракция, иммуноглобулин. В силу малого размера частиц сывороточных белков их количество в молоке приблизительно в 1500 раз превышает число казеиновых мицелл, хотя по массе казеина содержится в 9 раз больше, чем сывороточных белков [65]. Кроме того, тепловая обработка способствует взаимодействию денатурированных сывороточных белков с каппа-казеином казеиновых мицелл. Образующиеся комплексы влияют на технологические свойства молока — термоустойчивость и способность к сычужному свертыванию.

Ген *bβLG* локализован в одиннадцатой хромосоме у КРС, имеет размер 4662 п.о. и состоит из семи экзонов и шести интронов. В настоящее время известно десять генетически обусловленных аллельных вариантов гена бета-лактоглобулина — А, В, С, D, Е, F, G, I, J, W. Наиболее часто встречаются четыре аллеля — А, В, С и D, которые отличаются друг от друга аминокислотным составом. Редкий вариант D отличается от вариантов А, В, С,

в позиции 45, имея замену аминокислоты глутаминовой кислоты на глутамин. Отличие варианта В выявляется в шестьдесят четвертой позиции, где в результате замены второго основания триплета GAT на GGT происходит замена аспаргиновой кислоты на глицин. Вариант С характеризуется заменой последнего основания в триплете CAG на CAC, что влечет за собой образование гистидина вместо глутамина в пятьдесят девятой позиции β LG. Исследование полиморфизма локуса β LG показало, что отличие аллеля А от В определяется в шестьдесят четвертой аминокислотной позиции (аспаргиновой кислоты в А, глицин в В) и в сто восемнадцатой позиции (валина в А, аланина в В).

Установлена взаимосвязь варианта В $b\beta$ LG с высокими показателями молочной продуктивности и белкомолочности, что согласуется с результатами электрофоретического анализа белков молока, проведенного и описанного Braunschweig с соавторами. Полученные данные обсуждаются с точки зрения применения предложенного метода для оптимизации селекционных методов повышения частоты аллеля $b\beta$ LG^B в линиях КРС. Также Braunschweig и Leeb сообщают, что у животных-носителей аллельного варианта В гена β LG отмечен низкий синтез матричной РНК и, как следствие, отсутствие экспрессии данного белка.

Благоприятный для молочной промышленности аллель В бета-лактоглобулина обнаруживается у большинства европейских пород крупного рогатого скота - айрширской, шортгорнской, красной датской, голштинской, в частности в большинстве скандинавских пород крупного I рогатого скота. Исследователями также обнаружены существенные различия между стадами внутри одной породы по встречаемости генотипов белков и по генным частотам аллелей. Так, по черно-пестрой породе встречаемость аллеля В колеблется от 0,345 до 0,668, аллеля А от 0,332 до 0,655 [66].

В этой связи, диагностика полиморфизма гена $b\beta$ LG, в частности обнаружение ценного аллеля В гена бета-лактоглобулина у КРС и выявление племенных животных-носителей данного аллеля является основным направлением в технологии получения высококачественного низкоаллергенного молока [67].

Контрольные вопросы:

1. В каком году впервые был выделен бета-лактоглобулин?
2. Биологическая роль белка β LG.
3. Сколько описано аллельных вариантов гена β LG?
4. Какая аллель гена бета-лактоглобулина связана с высокими показателями белкомолочности?
5. Структура белка бета-лактоглобулина.

1.2.4 Полиморфизм гена пролактина (*bPRL*)

Пролактин (PRL, лактогенный гормон, маммотропин, лютеотропный гормон) является одним из самых универсальных гормонов гипофиза с точки зрения его биологической функциональности. В настоящее время установлено более 100 разнообразных физиологических функций этого гормона [68]. Пролактин необходим для инициации и поддержания лактации, будучи также, в первую очередь, ответственным за синтез молочных белков, жиров, лактозы и других основных компонентов молока [69].

Пролактин является полипептидным гормоном, секретируемым главным образом передней долей гипофиза [68]. У КРС этот гормон состоит из 199 аминокислот [70]. Эксперименты по удалению гена пролактина доказали его роль в развитии молочной железы, образовании молока и экспрессии генов молочных белков [71]. Поэтому у КРС ген пролактина (*bPRL*) может являться идеальным кандидатом для анализа связи локусов количественных признаков (QTL) с показателями молочной продуктивности.

Ген *bPRL* локализован в области q21 хромосомы 23 и состоит из пяти экзонов и четырёх интронов (рисунок 3), протяжённостью 10 т.п.н [72]. Также установлено, что он тесно сцеплен с генами класса I и класса II главного комплекса гистосовместимости. Наиболее тесное сцепление отмечено между генами *bPRL* и *BoLA-DRB3* [73]. На основании анализа последовательности кДНК гена *bPRL* четырёх различных клонов было установлено семь возможных нуклеотидных замен. Одной из них является описанная Н.А. Lewin с соавт. (1992) "молчащая" А→G замена в экзоне III гена, возникающая в кодоне для 103 аминокислоты и приводящая к появлению полиморфного *RsaI*-сайта [74]. Этими же авторами впервые показано влияние данной замены у КРС на такие показатели молочной продуктивности как величина удоя, процентное содержание белка и жира в молоке. Позднее было подтверждено влияние *RsaI*-полиморфизма *bPRL* на показатели молочной продуктивности КРС [75]. В целом работ на эту тематику было проведено достаточно много, но все они противоречивы и требуют более детального изучения.



Рисунок 3 – Экзон-интронная структура гена *bPRL* [76]

Распределение частот генотипов и аллелей по *RsaI*-полиморфизму гена *bPRL* у КРС изучалось многими исследователями. В частности, в исследованиях М. Sodhi et al., проведённых на 23 аборигенных породах Индии (*Bos indicus*), было выявлено преобладание гетерозиготного генотипа АВ

(средняя частота 0,58) независимо от направления продуктивности и географического региона. Средняя частота гомозиготных генотипов составила 0,22 для генотипа *AA* и 0,20 для генотипа *AB*. Частоты аллельных вариантов *A* и *B* находились приблизительно на одинаковом уровне и равнялись 0,52 и 0,48, соответственно [77]. В работе A. Dybus et al. (2005), проведённой на животных чёрно-пёстрой и джерсейской пород, было установлено, что в чёрно-пёстрой породе преобладал аллель *A* (85,33%), в то время в джерсейской породе преобладал аллель *B* (69,19%). Такое различие частот аллельных вариантов определило и различия в распределениях генотипов у этих пород. Так в чёрно-пёстрой породе частота генотипа *AA* составила 71,07%, генотипа *BB* – 0,42%, в джерсейской – 9,19% и 47,57%, соответственно [78]. У таких аборигенных российских пород (*Bos taurus*) как якутская, ярославская, бестужевская и костромская I.V. Lazebnaya et al. (2013) установили частоты генотипов *bPRL-RsaI*. Так частота генотипа *AA* для этих пород составила 0,561, 0,425, 0,474, 0,556, генотипа *AB* – 0,341, 0,442, 0,421, 0,387, генотипа *BB* – 0,098, 0,133, 0,105, 0,056, соответственно. При этом частота аллеля *A* (0,646-0,750) во всех четырёх породах превосходила частоту аллеля *B* (0,250-0,354) в среднем в 2-2,5 раза. В голштинской породе КРС частота аллеля *A*, по данным М.Е. Михайловой и Е.В. Белой (2011) находилась на уровне 89,0%, по данным P. Chrenek et al. (1998) – 95,0% [79].

Участвуя в инициации и поддержании лактации у млекопитающих, пролактин может служить потенциальным генетическим маркером молочной продуктивности КРС, а как следствие и дополнительным критерием отбора при селекции.

Гены соматотропинового каскада, такие, как ген гипофизарного фактора роста-1 (*bPit-1*), ген гормона роста (*bGH*), ген рецептора гормона роста (*bGHR*) и ген инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*) также участвуют в регуляции процесса лактации. Ниже эта информация будет рассмотрена более подробно.

Контрольные вопросы:

1. Биологическая роль белка пролактина.
2. Где локализован ген пролактина?
3. Какой генотип гена *bPRL* с низкой жирностью молока у животных?
4. Ассоциацию какого полиморфизма гена пролактина исследуют с признаками молочной продуктивности крупного рогатого скота?
5. Какие еще гены участвуют в регуляции процесса лактации?

1.3 Генетическое маркирование признаков мясной продуктивности

В настоящее время в литературе имеются сообщения о нескольких маркерных генах, связанных с липидным метаболизмом и влияющих на мясные

качества крупного рогатого скота: тиреоглобулин (*bTG5*), диацилглицерол О-ацилтрансфераза (*bDGAT*), лептин, миостатин, калпаин и калпастатин.

1.3.1 Полиморфизм гена тиреоглобулина (*bTG*)

Тиреоглобулин (TG5) - гликопротеин, предшественник тироидных гормонов трийодтиронина (T3) и тетрайодтиронина (T4). Они высвобождаются в результате гидролиза йодированного тиреоглобулина и секретируются в кровь. Гормоны щитовидной железы играют важную роль в регуляции метаболизма и могут повлиять на рост, дифференциацию клеток тканей и гомеостаз жировых отложений, а также участвуют в процессах образования жировых клеток. Как известно, щитовидная железа состоит из мелких фолликул, выстланных однослойным кубовидным эпителием - тироцитами. Синтезируемый этими клетками предшественник тироидных гормонов, тиреоглобулин, поступает в просвет фолликула, где «дозревает», а затем проникает обратно в клетки. Ген гормона тиреоглобулина ранее рассматривался в качестве функционального и позиционного гена-кандидата мраморности мяса. На основании QTL исследований, проведенных на молочных породах крупного рогатого скота, а также из-за влияния этого гена на жировой метаболизм считают, что ген гормона тиреоглобулина связан с молочной продуктивностью и качественным составом молока.

Ген тиреоглобулина находится в области центромеры четырнадцатой хромосомы КРС. Он отмечен в качестве позиционального и функционального гена-кандидата QTL мраморности мяса. Тиреоглобулин (Thyroglobulin) – гликопротеин, предшественник тироидных гормонов трийодтиронина (T3) и тетрайодтиронина (T4), участвующих в образовании жировых клеток и формировании мраморности [80]. Ген тиреоглобулина КРС был секвенирован Parma et al. (1987), наличие различных аллелей выявлено Georges et al. (1987). Ассоциативная связь мраморности с маркером CSSM66, расположенным на четырнадцатой хромосоме КРС, показана Barendse et al. (1997). Точный механизм влияния полиморфности гена на формирование качественных признаков мясной продуктивности еще неизвестен, но установлена связь его вариантов, обусловленных SNP в 5'- нетранслируемой области гена *bTG5* с мраморностью, в частности, показателем IMF в длиннейшей мышце спины [81]. Гомозиготный или гетерозиготный по дельта-тимин аллелю (*bTG5^{TT}* или *bTG5^{CT}*) скот отличается более высокой мраморностью, чем гомозиготный по дельта-цитозин аллелю (*bTG5^{CC}*). Исследования проводились в группах КРС ангусской и шортгорнской пород, результаты подтверждены также в коммерческих линиях и породе Wagyu. На рынке представлен коммерческий тест мраморности GeneSTAR®, основанный на полиморфизме гена тиреоглобулина. Апробация проведена на поголовье более трех тысяч пятисот голов КРС с учетом породы и системы кормления. Самой высокой частотой встречаемости желательного аллеля характеризуется японская порода КРС

Wagyu (76%), которая, как известно, отличается чрезвычайно высокой мраморностью мяса.

Контрольные вопросы:

1. Какие гены, связанные с липидным обменом, являются маркерами мясной продуктивности?
2. Где локализован ген тиреоглобулина?
3. С каким признаком мясной продуктивности связан ген тиреоглобулина?
4. В каком году был секвенирован ген *bTG5*?
5. Какая аллель гена тиреоглобулина положительно ассоциирована с мраморностью крупного рогатого скота?

1.3.2 Полиморфизм гена диацилглицерол О-ацилтрансферазы (*bDGAT*)

Ген *bDGAT1* (Diacylglycerol O-Acyltransferase 1) кодирует фермент диацилглицерол О-ацилтрансфераза, который играет главную роль в синтезе триглицеридов. Триглицериды являются главными компонентами жира образующиеся путём связывания диацилглицерола с длинной цепью жирной кислоты ацилкоэнзима А (acyl-CoA) [82]. Фермент DGAT катализирует заключительный этап биосинтеза триглицеридов, который схематически представлен на рисунке 4.

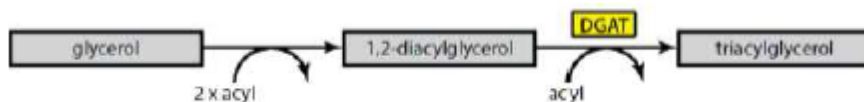


Рисунок 4 - Биосинтез триглицеридов у млекопитающих [82]

Исследования, проведённые на мышах, показали, что молочные железы самок, лишённых гена *bDGAT1*, вообще не продуцировали молоко в результате нарушенного синтеза триглицеридов в молочной железе [83]. После этого наблюдения ген *bDGAT1* был предложен в качестве функционального гена-кандидата признаков молочной продуктивности.

Ген *bDGAT1* у КРС локализован в области центромеры хромосомы 14, содержащей также QTL, влияющий на удой и состав молока. Изменения QTL вызваны динуклеотидной заменой $\text{ApA} \rightarrow \text{GpC}$ в экзоне VIII гена *bDGAT1*, приводящей к замене в белковом продукте лизина (аллель К) на аланин (аллель А) [84]. Мутация K232A в гене *bDGAT1* впервые была обнаружена R.J. Spelman с соавт. (2002), ими же было установлено, что аллельный вариант К ассоциирован с повышенным содержанием жира в молоке коров джерсейской, айрширской и голштино-фризской пород, в то время как аллельный вариант А ассоциирован с высокими удоями [85]. Аналогичные результаты были

получены позднее в работах: G. Thaller et al. (2003), J. Näslund et al. (2008), D. Sun et al. (2009), A. Molee et al. (2012) [86-89].

В обширных исследованиях, проведённых В. Кауре et al. (2004), был изучен полиморфизм гена *bDGAT1* у 38 пород КРС молочного, мясного и комбинированного направления продуктивности двух подвидов *Bos indicus* и *Bos taurus*. В общей сложности было проанализировано 1748 образцов ДНК взятых у животных из 13 стран пяти континентов. Авторы обнаружили, что у пород мясного направления продуктивности частота аллеля *K* гена *bDGAT1* находилась на невысоком уровне (1-34%), в то время как у молочных пород частота данного аллеля колебалась от очень низкого (2%), до довольно высокого значения (69%). Породы турецкая анатолийская чёрная, южная анатолийская красная, восточная анатолийская красная и серая степная характеризовались промежуточными значениями частоты аллеля *K* (21- 52%). В другой работе, проведённой G. Thaller et al. (2003) было установлено, что в рассматриваемых выборках пород флеквич и немецкой голштинской частота аллельного варианта *K* составила 0,072 и 0,548, соответственно. В джерсейской породе частота этого же аллеля варьировала от 0,69 до 0,88 [85, 90, 91].

Имеются сведения о положительной корреляции показателей активности фермента DGAT и мраморностью мяса в длиннейшей и полусухожильной мышцах в породах голштино-фризская и каролас. По данным В.М. Sorensen et al. (2005) у животных с желательным генотипом *KK* активность DGAT была более чем в 5 раз выше по сравнению с таковой у животных имеющих генотипы *AK* и *AA* [92]. G. Thaller et al. (2003) и L. Pannier et al. (2010) сообщают о достоверном влиянии полиморфизма этого гена на содержание внутримышечного жира [86, 93].

Из всего выше сказанного, очевидно, что молекулярное тестирование КРС по гену *bDGAT1* позволит проводить целенаправленную селекцию для получения животных с желательными потребительскими свойствами.

Контрольные вопросы:

1. Биологическая функция диацилглицерол О-ацилтрансферазы.
2. Какая аллель гена *bDGAT* более высокими показателями содержания молочного жира?
3. Где картирован ген диацилглицерол О-ацилтрансферазы?
4. Чем обусловлена мраморность мяса?
5. Какая мутация гена *bDGAT* влияет на мраморность мяса говядины?

1.3.3 Полиморфизм гена лептина (*bLep*)

Лептин – 16-кД-гормональный продукт гена тучности, участвует в контроле питания, расхода энергии, регулировании массы тела млекопитающих, воспроизводства и определенных функций иммунной системы

[94]. Синтезируется в основном в адипоцитах и при увеличении массы тела возрастает, соответственно, его периферийная концентрация [95].

Лептин является глобулярным белком, синтезируемым жировой тканью. Молекула лептина (16 кДа) состоит из 167 аминокислот с N-концевой секреторной сигнальной последовательностью из 21 аминокислот [96]. Относится к цитокинам - сигнальным белкам. Молекула лептина имеет четыре спиральные цепи с пятью - шестью полными оборотами. Основная физиологическая роль лептина проявляется снижением синтеза макроэргов и повышением затрат энергии [97]. Его механизм действия заключается в передаче в гипоталамус информации о массе тела и жировом обмене. Взаимодействие лептина со специфическими рецепторами, расположенными в гипоталамической области активирует выработку нервных импульсов, направленных в участки головного мозга, ответственные за регуляцию аппетита. Кроме того, действие лептина стимулирует симпатическую нервную систему, что в свою очередь ведёт к повышению артериального давления, частоты сердечных сокращений и процессов термогенеза, путём разобщения процессов окисления (клеточного дыхания) и фосфорилирования (синтез молекул АТФ) в митохондриях белой жировой ткани. В результате этих процессов большое количество энергии, которое запасается в жировой ткани в виде липидов, может быть преобразовано в тепло. Лептин часто называют гормоном насыщения. Считается, что он действует на гипоталамус, блокируя синтез и высвобождение нейропептида Y, вызывающего чувство голода.

Также при выращивании молодых коров было показано, что лептин играет важную роль в инициации половой зрелости.

Лептин может действовать как на уровне гипоталамуса, так и на уровне периферических тканей, например, гонадные ткани. Так было показано, что у крупного рогатого скота лептин непосредственно повлиял на стероидогенез яичников.

Ген лептина крупного рогатого скота расположен в четвертой хромосоме. Он состоит из трех экзонов и двух интронов. Только два экзона кодируют последовательность аминокислот лептина. Кодированная область гена лептина (ее длина составляет 501 п.н.) входит в состав второго и третьего экзонов, которые разделены интроном с длиной примерно 2 т.п.н. Область промотора охватывает около 3 т.п.н. [98].

Интересующие однонуклеотидные полиморфизмы расположены в разных зонах гена лептина. Их местоположение приведено в таблице 2 [99].

Таблица 2 - Описание отдельных полиморфизмов гена *bLEP*

Наименование SNP	Нуклеотидная замена	Область гена	Область белка лептина
1	2	3	4
C(-963)T	C/T	промотор	-

1	2	3	4
Y7F (A252T)	A/T	2 экзон	Сигнальная последовательность
R25C (C305T, R4C, C73T, LepKpn2I)	T/C	2 экзон	б-спираль А
A80V (LepHphI, A59V)	C/T	3 экзон	б-спираль В

Ген лептина - высокополиморфный ген. В нем расположены около шестидесяти однонуклеотидных замен. Причем, большинство из них расположено в интронных областях, что снижает их влияние на конформацию, аминокислотный состав и функцию белка лептина.

Лептин – возможно, один из лучших маркерных генов, характеризующих липидный обмен у животных и человека. Jolanta Oprzadek (2005), Geary et al. (2003) сообщают о положительной корреляции ($P < 0.01$) концентрации лептина в сыворотке крови с мраморностью мяса ($r = 0,35$ и $0,50$) в коммерческих кроссбредных линиях КРС. Buchanan et al. (2002) идентифицировали полиморфизм в кодирующей области гена лептина крупного рогатого скота в семьдесят третьей позиции от старта второго экзона: замена цитозина (С) на тимин (Т), кодирующая замену аминокислоты аргинин на цистеин (С/Т, Arg/Cys). Приводятся сведения об ассоциативной связи мутации гена лептин быка с содержанием жира в туше и уровнем лептин-мРНК. В исследованиях на четырех породах КРС показана связь аллеля *bLep^T* с высоким и аллеля *bLep^C* – с низким содержанием жира в туше, выявлена связь с повышенным жиротложением у мясного и с увеличенным надоем у молочного скота [100].

Гены комплекса соматотропинового каскада являются весьма перспективными для применения в маркер-зависимой селекции. Следовательно, для этих генов является перспективным поиск универсальных маркеров и мясной, и молочной продуктивности.

Контрольные вопросы:

1. Какую биологическую роль у млекопитающих играет лептин?
2. С какими признаками мясной продуктивности связан ген лептина?
3. Какая аллель гена *bLep* связана с низким содержанием жира в туше скота?
4. Какая мутация гена лептина связана с содержанием жира в мясе?
5. Где синтезируется лептин?

2 Маркирование молочной и мясной продуктивности по генам соматотропного каскада

Известно, что гормон роста и целый ряд других белков (прямо или косвенно необходимых для его функционирования) обеспечивают разнообразные молекулярные и клеточные эффекты, приводящие, в конечном счёте, к развитию и росту организма [104, 105, 108]. Эти белки составляют своеобразную ось («axis») или систему, которая запускает и контролирует совокупность метаболических процессов, ведущих к росту и связанных с клеточной дифференцировкой [104 - 106].

Функционирование системы гормона роста представляется в виде целого ряда последовательных молекулярных процессов, в которых принимают участие десятки других белков/пептидов. Компоненты этой системы участвуют в запуске секреции гормона роста, его транспорте в кровотоке, в передаче гормонального сигнала в клетке – мишени (внутриклеточный сигналинг) и, наконец, в целенаправленных изменениях генной экспрессии в клетках – мишенях [105, 107-109]. В целом, в системе гормона роста выделяют две ветви – «основную» и «боковую» или «дополнительную», а также три специальных регуляторных звена, обусловленных действием:

- 1) соматолиберина (гипоталамический релизинг-фактор гормона роста или соматокрин, GHRH);
- 2) соматостатина (SST, SRIF);
- 3) грелина («ghrelin», GHRL).

Каждое из этих регуляторных звеньев представляет собой целую цепь молекулярных событий, влияющих на секрецию гормона роста [108]. Боковая ветвь является одним из результатов воздействия гормона роста на многие клетки – мишени, ответ которых приводит к синтезу и секреции гормоноподобного белка, получившего название инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) [104, 105, 108]. Ряд авторов, подчеркивая данное обстоятельство, включают в название системы указание на участие в ней IGF-1 – система или ось ГР/ИФР. Вместе с тем не исключается возможность и независимой от гормона роста продукции IGF-1, который может играть самостоятельную роль в регуляции клеточной пролиферации [105, 110, 111].

Центральной фигурой в системе ГР/ИФР, естественно, считают сам гормон роста, который продуцируют высокодифференцированные соматотрофные клетки гипофиза. Синтез гормона роста обеспечивает ген *bGH*. Установлено, что он входит в кластер из пяти родственных генов, располагающийся на сравнительно коротком участке полинуклеотидной последовательности [112]. При реализации биологических эффектов гормона роста по основной ветви особое значение принадлежит нескольким белковым продуктам одного гена, получившего название – ген рецептора гормона роста (*bGHR*). Этот ген и его продукты к настоящему времени достаточно хорошо изучены [105, 108, 113, 114]. Установлено, что ген *bGHR*, направляет синтез трансмембранного белка и именно этот полноразмерный продукт (зрелый белок – 620 а.о.;

предшественник – 638 а.о.), образуя функционально активный димер, выполняет роль рецептора гормона роста (РГР).

Индукцируемый ГР синтез ИФР-1 был обнаружен в клетках печени, в мышцах и в ряде других тканей, включая предстательную железу [105, 108, 109, 115, 116]. Согласно современным представлениям ИФР-1 функционирует в организме животных и человека не только как ростовой фактор, но выступает и в качестве эндокринного агента, секретируемого в кровотоке и участвующего в нормальных и патологических процессах многих клеток – мишеней [104-106, 115].

Таким образом, регуляция синтеза гормона роста представляет собой многоуровневый каскад взаимодействий белок-рецептор, тесно связанных между собой. Нарушение, и, тем более, выпадение любого звена влечет за собой изменения в работе соматотропиновой оси, которые могут привести как к различиям в фенотипических проявлениях количественных признаков продуктивности у сельскохозяйственных животных, так и к заболеваниям, развивающимся на разных этапах онтогенеза.

Контрольные вопросы:

1. Какие гены соматотропинового каскада являются перспективными маркерами мясной и молочной продуктивности крупного рогатого скота?
2. Понятие соматотропного каскада.
3. Биологическая роль соматотропинового каскада?
4. Структура системы гормона роста.
5. Какой ген является ответственным за синтез гормона роста?

2.1 Гипофизарный фактор транскрипции

Гипофизарный фактор транскрипции (PIT-1) участвует в регуляции экспрессии генов пролактина (*bPRL*), соматотропина (*bGH*) и тиреотропного гормона, а также регулирует дифференциацию и пролиферацию клеток гипофиза в раннем эмбриогенезе и определяет развитие зон, ответственных за синтез соматотропина [117-120].

Белок PIT-1 (рисунок 5) является членом POU-домена, в который входит группа транскрипционных регуляторов, имеющих важную роль в дифференциации и пролиферации клеток [121]. POU является бинарным ДНК-связывающим доменом [122]. Он включает два высоко консервативных региона [123]. Эти регионы ответственны за высокое сродство с ДНК генов соматотропина, пролактина и других. Ингибирование синтеза PIT-1 приводит к заметному снижению экспрессии генов пролактина и гормона роста и к значительному снижению пролиферации клеточных линий, продуцирующих эти гормоны

Белок PIT-1 состоит из двести девяносто одной аминокислоты, узнает мотив ATGNATA(A/T)(A/T) [124].

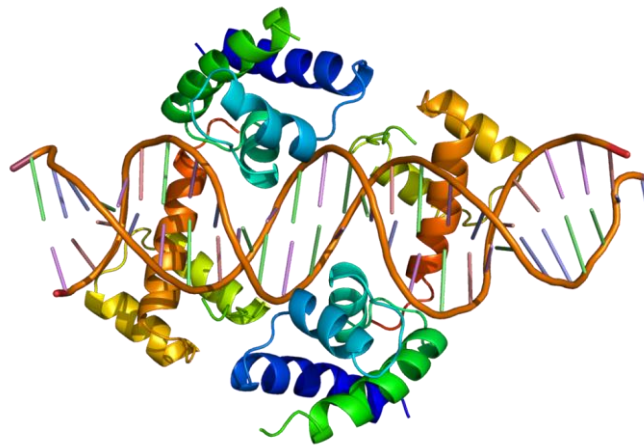


Рисунок 5 - Белок гипофизарного фактора транскрипции

Ген *bPit-1* человека больше 14 кб, расположен в локусе 3p11 [125]. Ген *bPit-1* мыши локализован в шестнадцатой хромосоме [126]. Ген *bPit-1* крупного рогатого скота расположен в центромерной зоне первой хромосомы между локусами TGLA57 и RM95 [127]. Мутации в гене *bPit-1* приводят к гипоплазии гипофиза, синдрому врожденного гипотиреоза у мышей, а также к отсутствию соматотропина [126]. Удаление из организма гена *bPit-1* приводит к эмбриональной смертности [128, 129].

У млекопитающих *bPit-1* имеет три варианта сплайсинга. Основной тип, *Pit-1-α*, два других – *Pit-1-β* и *Pit-1-Т* [130, 131]. Все варианты сплайсинга являются биологически активными. Каждый из вариантов избирательно воздействует на промоторные зоны генов мишеней. *Pit-1-α* активирует промоторы *Pit-1-β* и *Pit-1-α*. *Pit-1-β* активирует промотор гена соматотропина [132]. *Pit-1 Т* стимулирует экспрессию TSH-β [133, 134].

Контрольные вопросы:

1. Биологическая функция гипофизарного фактора транскрипции.
2. На какой хромосоме расположен ген *bPit-1* мышей?
3. Из скольких аминокислот состоит белок гипофизарного фактора транскрипции?
4. Сколько вариантов сплайсинга имеет ген гипофизарного фактора транскрипции у млекопитающих?
5. К чему приведет удаление гена *bPit-1*?

2.1.1 Структура гена *bPit-1* и механизм регуляции его экспрессии

Бычий ген *bPit-1* локализован на первой хромосоме [127]. Исследования структуры гена *bPit-1* показали, что он имеет шесть экзонов и его способность регулировать работу разных генов обусловлена наличием различных вариантов сплайсинга. У млекопитающих *bPit-1* имеет три различных варианта сплайсинга, основной тип - *Pit-1a*, и два других - тип *Pit-1b* и *Pit-1t* [130, 131, 135]. Все варианты сплайсинга биологически активны. Эти разные варианты по-разному воздействуют на промоторные элементы регулируемых генов. Вариант *Pit-1a* строго активизирует *Pit-1a* и *Pit-1b* промоторы [136, 137]. Вариант *Pit-1b* содержит 26-аминокислотную вставку в трансактивационном домене благодаря альтернативному сплайсингу транскрипта гена *bPit-1* и первого интрона [121, 130, 138]. В результате он утрачивает способность активировать промотор гена *bPRL* и предпочтительно активирует промотор *bGH* гена [130, 135]. Форма *Pit-1t* содержит в трансактивационном домене инсерцию четырнадцати аминокислот, благодаря чему стимулирует только *TSH-b* ген. Такая форма экспрессируется только в клетках производных тиротрофов [132, 133]. Наличие альтернативного сплайсинга обуславливает различия в физиологическом эффекте мутаций данного гена в зависимости от места их возникновения. Участие первого интрона в образовании *Pit-1b* формы, регулирующей работу гена гормона роста, позволяет предположить, что присутствие точковых мутаций в этой области может быть ассоциировано с развитием признаков продуктивности у домашнего скота регулируемых непосредственно соматотропином.

Молекулярный механизм участия белковых продуктов экспрессии гена *bPit-1* в регуляции работы генов гормона роста и пролактина заключается в следующем. В генах *bGH* и *bPRL* регуляторная область, расположенная выше сайта транскрипции, содержит А/Т регион общий для обоих генов и необходимый для их экспрессии [139-141]. Ген *bPit-1* был клонирован в 1988 году благодаря его аффинности к этим А/Т богатым сайтам и была показана его роль в контроле транскрипции этих генов [119, 121, 124, 128]. Дальнейшие исследования показали так же его участие в регуляции экспрессии гена β -субъединицы тиротроид-стимулирующего гормона [142-145], гена рецептора ГН-высвобождающего гормона (growth hormone releasing hormone receptor (*bGHRH-R*)) [146]. Имуно-гистологический анализ выявил высокую экспрессию гена *bPit-1* в трех типах клеток гипофиза: соматотрофы, лактотрофы и тиротрофы [144, 147], которые секретируют гипофизарные гормоны ГН, PRL, и TSH- β , соответственно. Было показано, что *bPit-1* играет важную роль в дифференциации и пролиферации этих трех типов клеток [128].

Контрольные вопросы:

1. Структура гена гипофизарного фактора транскрипции.

2. Сколько экзонов имеет ген гипофизарного фактора транскрипции?
3. Где локализован ген *bPit-1* крупного рогатого скота?
4. Присутствие мутаций в какой области гена гипофизарного фактора транскрипции может ассоциироваться с продуктивностью крупного рогатого скота?
5. В каком году был клонирован ген гипофизарного фактора транскрипции?
6. В каких клетках гипофиза установлена высокая экспрессия гена *bPit-1*?

2.1.2 Биологическая роль белка Pit-1

Физиологическая роль белка Pit-1 в развитии клеток и секреции гормонов была продемонстрирована на мутациях гена *bPit-1* у мышей и человека. Так мутации гена *bPit-1* приводят карликовости у мышей [126]. Мутация у Snell dwarf мышей, идентифицированная как одиночная рецессивная аутосомная мутация, препятствует развитию клеток гипофиза, которые секретируют гормон роста, пролактин и тиреотропин. Это нарушает пролиферацию соматотрофов, лактотрофов и тиротрофов и приводит к отсутствию экспрессии генов гормона роста, пролактина и тиреотропина [148-150].

Другая мутация у карликовых мышей Jackson mouse представляет собой значительное изменение структуры гена *bPit-1* и отсутствию экспрессии *bPit-1* [126]. Такие мыши так же имеют недоразвитый гипофиз и характеризуются комбинированным дефицитом гормона роста, пролактина и β -субъединицы тиреотропина.

У человека и грызунов Pit-1 выполняет сходные функции. Как и следовало ожидать, возникновение мутаций в гене *bPit-1* у человека вызывает комбинированный гормональный дефицит гипофизарных гормонов сопровождающийся различными эндокринных заболеваний [151].

Имеются данные в пользу того, что мутации, возникающие в гене *bPit-1*, могут быть ассоциированы со скоростью роста, признаками мясной и молочной продуктивности у животных, в том числе и домашнего скота. В частности, было обнаружено, что ген *bPit-1* ассоциирован с мясными признаками у свиней [152, 153].

Контрольные вопросы:

1. На мутациях генов у каких организмов демонстрируется физиологическая роль гена гипофизарного фактора транскрипции?
2. К чему приводят мутации гена гипофизарного фактора транскрипции у мышей?
3. Каковы последствия в организме мышей при отсутствии экспрессии гена гипофизарного фактора транскрипции?
4. Какие последствия вызывает мутация гена *bPit-1* у человека?

5. У каких животных ген *bPit-1* ассоциируется с признаками мясной продуктивности?

2.1.3 Полиморфизм гена *bPit-1*

В настоящее время выявлено значительное количество точковых мутаций гена *bPit-1* у представителей различных пород, как мясного, так и молочного направления. Три мутации - *Pit1I3H* (С- и D-аллели), *Pit1I3N* (М- и N-аллели) и *Pit1I3NL* (G- и H-аллели), локализованы в третьем интроне. Эти мутации выявляются с помощью рестриктаз *HinfI*, *NciI* и *NlaIII*, соответственно. Так же по одной мутации *Pit1I4N* (Е- и F-аллели), *Pit1I5*, *Pit1E6H* (О- и Р-аллели) были обнаружены в четвертом, пятом интронах и шестом экзоне гена *bPit-1*. Нуклеотидные замены в четвертом интроне и шестом экзоне идентифицируются эндонуклеазами *BstNI* и *HinfI*, соответственно [134, 154].

Несколько новых мутаций гена *bPit-1* были выявлены при исследовании американской популяции голштинского крупного рогатого скота. Так, были идентифицированы три молчащие трансверсии: G→А во втором экзоне, Т→С, А→G, С→А в третьем экзоне .

Таблица 3 – Точковые мутации гена *bPit-1*

Мутация	Аллели	Рестриктаза	Место мутации
1	2	3	4
<i>Pit1I3H</i>	С- и D	<i>HinfI</i>	3 интрон
<i>Pit1I3N</i>	М- и N	<i>NciI</i>	3 интрон
<i>Pit1I3NL</i>	G- и H	<i>NlaIII</i>	3 интрон
<i>Pit1I4N</i>	Е- и F	<i>BstNI</i>	4 интрон
<i>Pit1I5</i>	О-и Р		5 интрон
<i>Pit1E3H</i>	А-и С	<i>StuI</i>	3 экзон
<i>Pit1E6H</i>	А-и В	<i>HinfI</i>	6 экзон

Для гена *bPit-1* идентифицирован полиморфизм, распознаваемый рестриктазой *HinfI*. Молекулярной основой для данного полиморфизма является молчащая мутация (G→А), локализованная в шестом экзоне [155]. Несмотря на то, что данная мутация не приводит к аминокислотной замене белка и теоретически не должна влиять на его физиологические свойства, рядом авторов выявлены различные виды ассоциации этого полиморфизма, как с признаками мясной, так и молочной продуктивности у представителей разных пород. Высокая частота аллеля *bPit1-HinfI*^А (0.26, 0.757, 0.296, 0,35) была выявлена в исследованиях Moody D.E. et al. (1995), Klauzinska et al. (2001), Oprzadek et al. (2003), Dybus A. et al. (2004) Moravcikova N. et al. (2013), Тюлькин С.В [127, 157 - 159]. Низкая частота аллеля *bPit1-HinfI*^А (0.18, 0.15 и 0.15) наблюдалась в исследованиях Renaville et al. (1997), Woollard et al. (1994), Hori-Oshima и Barreras-Serrano (2003) [120, 134, 160].

В некоторых литературных источниках имеются данные о преобладании *bPit1-HinfI^B*-аллеля в группах крупного рогатого скота разных пород. В работе Dybus A. et al. (2004) по изучению генетической структуры по гену *bPit-1* в группах коров польской черно-пестрой породы частота *bPit1-HinfI^B* -аллеля составляла 0,757 [156]. Такую же частоту *bPit1-HinfI^B*-аллеля выявил Noor R.R. et. al (2015) при исследовании полиморфизма *Pit1-HinfI* в популяции крупного рогатого скота *Bos javanicus* в Индонезии [161]. Михайлова М.Е. (2008) в группе быкопроизводящих коров черно-пестрой породы зафиксировала частоту *bPit1-HinfI^B*-аллеля 0,64 [162]. Mohammad Ali E. et. al. (2009) в группе коров голштинской породы выявил частоту этого аллеля – 0,744 [163]. Hori-Oshima S. et. al установил, что доля *bPit1-HinfI^{BB}*-генотипа составляет более 71% [160].

В настоящее время работы по выявлению новых полиморфных вариантов для гена *bPit1* продолжаются.

Так, выявлены три новых полиморфизма гена: С→G замена в области первого интрона, миссенс-мутация Т→С приводящая к замене фенилаланина (ТТС) на серин (ТСС) в пятьдесят седьмом положении белка и молчащая G→A замена в области второго экзона. Данная замена детектируема с помощью метода ПЦР-ПДРФ и распознается рестриктазой TagI. Данный полиморфизм протестирован на китайских популяциях голштинского и ангусского скота, а также на животных породы Qinchuan, Jiaxian Red, Luxi. Значимой ассоциации с признаками мясной продуктивности выявлено, однако, не было [164].

W. Huang et al. (2008) при исследовании американской популяции голштинского скота так же выявлено несколько новых мутаций гена *bPit1*. В частности, ими идентифицировано три молчащие мутации: G→A замена во втором экзоне, Т→С и А→G замена в третьем экзоне. Так же в третьем экзоне ими выявлена мутация, приводящая к аминокислотной замене пролина на гистидин в семьдесят шестом положении белка. Данная однонуклеотидная замена идентифицируется с помощью метода ПЦР-ПДРФ и распознается с помощью рестриктазы StuI. Рестриктаза распознает С аллель. Полиморфизм *bPit1-StuI* исследован на данной популяции с целью выяснить его влияние на развитие признаков молочной продуктивности. Было отмечено, что носители редкого генотипа *Pit1-StuI^{AA}*, характеризуются большей длительностью периода лактации более высокими показателями общей молочной продуктивности [165].

Контрольные вопросы:

1. Какие мутации гена *bPit-1* известны в настоящее время?
2. Какой наиболее распространенный метод определения точковых мутаций генов?
3. Какими исследователя была отмечена высокая частота *bPit1-HinfI^A* аллеля?

4. Какое влияние на молочную продуктивность американской популяции голштинского скота оказывает редкий генотип *Pit1-StuI^{AA}*?

5. С помощью каких рестриктаз выявляют мутации *Pit1I3H*, *Pit1I3N* и *Pit1I3NL*?

2.1.4 Ассоциация полиморфных вариантов гена *bPit1* с признаками мясной и молочной продуктивности

Исследования ассоциации полиморфных вариантов гена *bPit1* с признаками мясной и молочной продуктивности у крупного рогатого скота в настоящее время широко проводятся за рубежом в рамках различных селекционных программ. Такие работы в основном направлены на поиск новых мутаций и выявление их ассоциации с признаками мясной или молочной продуктивности, для какой - либо отдельной, наиболее распространенной на данной территории, породы.

Наибольший интерес с точки зрения применения в молекулярном маркировании хозяйственно полезных признаков, представляют собой мутации, приводящие либо к изменению работы гена-кандидата (возникающие в его регуляторной области), либо приводящие к изменению структуры и свойств транслируемого с этого гена белка (мутации, возникающие экзонах и приводящие к аминокислотным заменам, либо в области интронов, в случае участия их в альтернативном сплайсинге).

Основным методом их детекции является метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, применяющий рестриктазы способные распознавать уникальные последовательности нуклеотидов (нормальные или мутантные). Поэтому название исследуемого полиморфного варианта обычно включает название гена и рестриктазы используемой для его распознавания с указанием участка гена, в котором данная мутация расположена.

В настоящее время выявлено значительное количество точковых мутаций гена *bPit1* у представителей различных пород, как мясного, так и молочного направления.

Ассоциация полиморфизмов с мясной продуктивностью. Исследования ассоциации полиморфных вариантов гена *bPit1* с признаками мясной продуктивности ведутся на различных породах.

Наиболее исследованным из них является *bPit1-HinfI* полиморфизм, впервые описанный Woollard J. (1994) [134] и впоследствии идентифицированный как молчащая G→A замена в области шестого экзона [156]. Несмотря на то, что данная мутация не приводит к аминокислотной замене белка и теоретически не должна влиять на его физиологические свойства, рядом авторов выявлены различные виды ассоциации этого полиморфизма, как с признаками мясной, так и молочной продуктивности у представителей разных пород. Так, в работе Renaville R. (1997) данная мутация исследована на голштино-фризской породе. Редкий аллель, характеризующийся

отсутствием сайта рестрикции для фермента HinfI обозначен как А аллель. Наиболее частый аллель, разрезаемый рестриктазой HinfI обозначен как В аллель. Было выявлено, что аллель *bPit1*-HinfI^A ассоциирован с повышенной продуктивностью молока, более высоким содержанием молочного белка и более высокими показателями по признакам мясной продуктивности. В то же время носители редкого аллеля характеризуются более низким содержанием молочного жира [120].

Также ассоциация данного полиморфизма с признаками мясной продуктивности исследована в следующих работах.

Renaville R. (1997) у бельгийского голубого скота определил генотип *bPit1*-HinfI^{AA}, как более редкий в исследуемой популяции. По его данным телята с генотипом *bPit1*-HinfI^{BB} обладали более высоким весом тела в возрасте семь месяцев по сравнению с телятами носителями генотипов *bPit1*-HinfI^{AB} и *bPit1*-HinfI^{AA}, в то время, как в возрасте тринадцать месяцев по показателю веса тела, предпочтительным оказался генотип *bPit1*-HinfI^{BB}. По мнению автора, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что аллель *bPit1*-HinfI^B ассоциирован с более высокой массой тела в раннем периоде постнатального развития [120].

Zwierzchowski в 2001 году при изучении мясных пород польского скота, также выявил положительную ассоциацию со скоростью роста в ранний период постнатального развития у телят носителей аллеля *bPit1*-HinfI^A. При исследовании *bPit1*-HinfI полиморфизма у Piedmontese скота он отмечает значительно меньшую частоту встречаемости аллеля *bPit1*-HinfI^A по сравнению с другим аллелем. Им так же были исследована ассоциация данного полиморфизма со скоростью роста животных, размером и качеством мяса [166]. Однако данные об ассоциации *bPit1*-HinfI^B аллеля с весом тела телят в раннем возрасте, полученные Renaville, в исследованной популяции пьемонтского скота подтверждения не получили [167].

Rogério в 2006 году, исследуя данный полиморфизм у зебу и кроссбридного скота мясных пород обнаружил, что у представителей таких пород, как симментальская, ангусская, канхимская, и неллорская гораздо выше частота аллеля *bPit1*-HinfI^A. Исследование ассоциации аллелей с мясными признаками у этих пород показало, что для них данный полиморфизм не является молекулярным маркером мясной продуктивности [168].

Кроме того, группой ученых университета штата Огайо США под руководством профессора Дэвиса М. проведен ряд исследований ассоциации других полиморфных вариантов гена *bPit1* с признаками мясной продуктивности у представителей ангусского скота [169]. Ими было обнаружено три полиморфизма в области третьего интрона: *bPit1*-HinfI (ААТ делеция у мутантного аллеля), *bPit1*-Nla III (G → C транзиция у редкого аллеля), и *bPit1*-NciI и один полиморфизм в области четвертого интрона *bPit1*-BstNI (G → T транзиция у мутантного аллеля). Однако, ни для одного из исследованных полиморфизмов не было выявлено значительной ассоциации на

со скоростью роста, ни с параметрами туши [170-172]. Так же ими был исследован ранее описанный другими авторами полиморфизм шестого экзона *bPit1*-HinfI. Для данной мутации была выявлена значительная взаимосвязь с темпами прироста на ранних этапах постnatalного развития.

Kai Xue провел анализ между полиморфизмом *bPit1*-HinfI и чертами роста крупного рогатого скота Nanyang. Частоты аллелей в популяции составили 0.465/0.535 соответственно. Kai Xue установил превосходство коров Nanyang с *bPit1*-HinfI^{BB}-генотипом по следующим признакам: масса при рождении, средний прирост, длина тела и охват груди за шесть и двенадцать месяцев ($P < 0,05$). Также было выявлено, что вес тела в двенадцать месяцев у особей с *bPit1*-HinfI^{BB}-генотипом ($p < 0,05$) был значительно больше, чем у животных с другими генотипами. Эти результаты показывают, что аллель *bPit1*-HinfI^B гена *bPit1* положительно коррелирует с характером роста крупного рогатого скота [173].

Zwierchowski и Dybus не выявили ассоциаций вариантов гена *bPit-1* с мясной продуктивностью КРС [166, 174]. Zhao в группе мясного скота ангусской породы не выявил никаких существенных ассоциаций вариантов *bPit-1* со скоростью роста животных [154].

Ассоциация полиморфизмов с признаками молочной продуктивности.

Исследования ассоциации полиморфных вариантов гена *bPit-1* с признаками молочной продуктивности проводятся так же на различных породах, однако сводятся в основном к исследованию *bPit1*-HinfI полиморфизма.

Renaville R. (1997) в исследованиях на итальянской голштино-фризской породе показал, что коровы носители аллеля *bPit1*-HinfI^A обладали более высокими показателями общей молочной продуктивности и более низким содержанием жира в молоке [120]. Такие же данные получены Parmentier et al. (1999) [175].

Zwierchowski L. в 2002 году также подтвердил наличие положительной ассоциации *bPit1*-HinfI^A аллеля с ежедневной продуктивностью молока и содержанием молочного жира при исследовании польского черно-пестрого скота [176].

В 2004 году K. De Mattos обнаружил, что гетерозиготные *bPit1*-HinfI^{AB} Гырбыки более предпочтительны по сравнению с *bPit1*-HinfI^{BB} быками по молочной продуктивности их дочерей [118].

Таким образом, можно отметить, что, во-первых, не всегда совпадают данные, полученные на разных породах, во-вторых, один и тот же аллель в пределах одной породы по-разному влияет на признаки мясной и молочной продуктивности. Эти отличия в эффекте аллеля у представителей мясных и молочных пород подтверждают нефункциональную роль данного полиморфизма. Возможно в данное явление вовлечен сцепленный с *bPit1* функциональный локус, который собственно и влияет на молочную продуктивность и который может быть расположен ближе или дальше от

локуса *bPit1*-HinfI у представителей разных пород [177]. Другим объяснением такого эффекта может служить существование некоторого дополнительного генетического фактора. Длительная дивергенция между *B. Indicus* и *B. Taurus* могла привести к возникновению некоторых геномных различий. Поэтому, безусловно, возможно, что присутствие одинаковых аллелей отличается по физиологическому эффекту из-за присутствия других фоновых геномных влияний.

Для гена *bPit1* идентифицирован полиморфизм, распознаваемый рестриктазой StuI. Данная мутация обуславливается трансверсией С→А в третьем экзоне и вызывает замену аминокислоты пролин на аминокислоту гистидин в семьдесят шестом положении белка. Данный полиморфизм в настоящее время практически не изучен, однако, имеются данные о влиянии его на молочную продуктивность. Так, Huang W. et al. выявил, что животные с генотипом *bPit1*-StuI^{AA} характеризуются более длительным лактационным периодом и более высокими показателями удоя по сравнению с животными генотипа *bPit1*-StuI^{CC} [165].

Таким образом, приведенные литературные данные показывают значимость полиморфизмов *bPit1*-HinfI и *bPit1*-StuI в формировании признаков мясной продуктивности.

Контрольные вопросы:

1. Какой из полиморфизмов гена гипофизарного фактора транскрипции является наиболее изученным?
2. В трудах какого исследователя впервые упоминается *bPit1*-HinfI полиморфизм?
3. На каких породах крупного рогатого скота проводились исследования ассоциации полиморфных вариантов гена *bPit1* с признаками мясной и молочной продуктивности?
4. Какая аллель *bPit1*-HinfI положительно связана с характером роста у животных?
5. Какой из полиморфизмов гена гипофизарного фактора транскрипции в настоящее время является наименее изученным?

2.2 Гормон роста (GH)

2.2.1 Структура гена *bGH*. Регуляция экспрессии гена гормона роста *bGH*

Ген бычьего гормона роста (*bGH* или *bST*) картирован на девятнадцатой хромосоме и является участником мультигенного семейства, которое включает так же пролактин, и плацентарные лактогены [178]. Его протяженность составляет примерно 1800 п.о. и включает пять экзонов (I-V), которые

кодируют матричную РНК размером 786 п.о., и четыре интрона (A-D). По большей части его последовательность сходна с таковой у мышей и человека [142]. Промоторный регион *bGH* расположен на расстоянии пятисот пар оснований выше точки старта транскрипции и содержит сайты связывания для полимеразы и транскрипционного фактора. На более удаленном расстоянии расположена энхансерная последовательность, которая обеспечивает тканеспецифичную экспрессию гена [179]. Ген *bGH* репрессируется соленсером, находящимся выше регуляторной области.

Регуляция экспрессии гена гормона роста *bGH*. Экспрессия гена *bGH* регулируется на трех уровнях: гормональном (внутренней средой организма), клеточно-специфическом и базовом (нижний уровень регуляции).

На гормональном уровне синтез *bGH* стимулируется в гипофизе под воздействием ГН-высвобождающего гормона (соматотропина или ГН RH). Синтез гормона роста активизируется так же тиреоидным гормоном, ретинолом и глюкокортикоидами. Активин снижает синтез *bGH* матричной РНК посредством снижения концентрации Pit-1 [180]. Синтез гормона роста подавляется так же инсулином. Секреция гормона роста так же регулируется другими нейрогормонами и нейропептидами, такими, как белок гистидин, изолейцин, гипофизарная аденилат циклаза, тиротропин высвобождающий гормон, галанин и дофамин [181].

Тканеспецифический уровень регуляции синтеза гормона роста в гипофизе осуществляется под контролем Pit-1 [182]. На базовом (нижнем) уровне регуляция экспрессии гена *bGH* осуществляется посредством нескольких не-тканеспецифических факторов транскрипции, представляющих собой регуляторные нуклеотидные повторы, контролирующие пространственную конфигурацию ДНК и возможность доступа факторов экспрессии регуляторным областям гена [183, 184].

Контрольные вопросы:

1. Где локализован ген бычьего гормона роста?
2. Какова структура гена гормона роста?
3. Механизм регуляции экспрессии гена гормона роста.
4. На каких уровнях происходит регуляция экспрессии гена *bGH*?
5. Как происходит регуляция *bGH* на гормональном уровне?

2.2.2 Характеристика белка гормона роста и его биологический эффект

Белок соматотропина представляет собой одонитевой полипептид размером примерно двадцать два кД, включающий от ста девяносто до ста девяносто девяти аминокислотных остатка [185]. Конформация белка

представляет собой двухпетлевую структуру, поддерживаемую за счет двойных внутринитевых дисульфидных мостиков. Пептидные гормоны не проникают внутрь клеток мишеней и взаимодействуют с белковыми рецепторами, расположенными на их поверхности, в плазматической мембране. Поэтому их механизм действия принципиально отличается от такового стероидных гормонов.

Основной биологический эффект *bGH* заключается в стимуляции постнатального роста и стимуляции метаболизма (липидного, белкового, углеводного и минерального), а также на лактацию и состав молока [186]. Все эти эффекты достигаются путем активации экспрессии множества генов включая *IGF-I*. Начальным этапом этого сложного процесса является связывание белковых молекул последовательно с двумя мембрано-ассоциированными GH-рецепторными (GH R) молекулами и начало трансмембранной передачи сигнала в клетку [187, 188]. Димеризованный рецептор GH активирует внутриклеточную тирозин протеин киназу, которая фосфорилирует тирозины в белках, передающих сигнал ниже по цепи. Это, в свою очередь, приводит к стимуляции митоген-активируемых протеин киназ и подавлению транскрипции [189, 190].

В настоящее время установлено, что гормон роста обладает широким спектром метаболических функций:

1) **Синтез белка.** ГР стимулирует транспорт аминокислот в мышечные клетки и, кроме того, усиливает синтез белка, причем независимо от влияния на транспорт аминокислот. У животных, получающих ГР, возникает положительный азотный баланс, что отражает общее повышение белкового синтеза и снижение содержания аминокислот и мочевины в плазме и моче. Указанные изменения сопровождаются повышением уровня синтеза РНК и ДНК в отдельных тканях. В этом отношении действие ГР сходно с некоторыми эффектами инсулина;

2) **Углеводный обмен.** В плане влияния на углеводный обмен гормон роста является антагонистом инсулина. Гипергликемия, возникающая после введения ГР, — результат сочетания сниженной периферической утилизации глюкозы и ее повышенной продукции печенью в процессе глюконеогенеза. Действуя на печень, ГР увеличивает содержание в ней гликогена, вероятно, вследствие активации глюконеогенеза из аминокислот. ГР может вызывать нарушение некоторых стадий гликолиза, а также торможение транспорта глюкозы. Обусловлен ли данный эффект прямым действием ГР на транспорт или он является результатом подавления гликолиза, пока не установлено. Ингибирование гликолиза в мышцах может быть также связано с мобилизацией жирных кислот из триацилглицероловых резервов. При длительном введении ГР существует опасность возникновения сахарного диабета;

3) **Липидный обмен.** При инкубации жировой ткани с ГР *in vitro* усиливается высвобождение неэстерифицированных (свободных) жирных кислот и глицерола. Введение ГР *in vivo* вызывает быстрое (30—60 мин)

повышение содержания свободных жирных кислот в крови и их окисления в печени. В условиях недостаточности инсулина (например, при диабете) может возрастет кетогенез. Эти эффекты так же, как и действие ГР на углеводный обмен, скорее всего не опосредуются IGF-1;

4) **Минеральный обмен.** ГР или, что более вероятно, IGF-1 способствует положительному балансу кальция, магния и фосфата и вызывает задержку натрия, калия и хлора. Первый эффект, возможно, связан с действием ГР на кости: он стимулирует рост длинных костей в области эпифизарных пластинок у детей и аппозиционный или акральный рост у взрослых. У детей ГР усиливает и образование хряща;

5) **Пролактиноподобные эффекты.** ГР связывается с лактогенными рецепторами и поэтому обладает многими свойствами пролактина, в частности способностью к стимуляции молочных желез, лактогенеза и роста зоба у голубей.

Контрольные вопросы:

1. Структура белка гормона роста.
2. Какие биологические функции выполняет гормон роста?
3. Какую роль в минеральном обмене играет гормон роста?
4. В чем заключается участие гормона роста в липидном обмене?
5. В чем заключается основной биологический эффект гормона роста?

2.2.3 Ассоциация полиморфных вариантов гена гормона роста с признаками мясной и молочной продуктивности

Учитывая значительную роль в процессе роста и лактации, ген *bGH* является потенциальным объектом для изучения ассоциации его молекулярных вариантов с признаками продуктивности крупного рогатого скота. У представителей различных пород крупного рогатого скота было описано несколько полиморфных вариантов гена соматотропина, их перечень представлен в таблице 4.

Таблица 4 - Локализация однонуклеотидных замен гена гормона роста.

Локализация	Положение	Изменения	Авторы (порода, у которой мутация впервые выявлена)
1	2	3	4
5'-фланкирующая область	125-142	Вставка-делеция TGC	J.Yao et. Al. 1996 (голландский скот).
	193	Инсерция С	Ferraz et.al. 2006 (мясные породы)
	253	С→Т	W. Ge et.al 2003 (ангусский скот)
	303	С→Т	W. Ge et.al 2003 (ангусский скот)

1	2	3	4
5`- фланкирующая область	313	C→T	W. Ge et.al 2003 (ангусский скот)
	354	C→G	Ferraz et.al. 2006 (мясные породы)
	502	C→T	A.Lagziel, E. Lipkin 1999 (голштинский скот)
	591	G→C	A.Lagziel, E. Lipkin 1999 (голштинский скот)
	609-613	AAG делеция	Ferraz et.al. 2006 (мясные породы) Rodrigues 1998
Интрон 1	728	G→T	Ferraz et.al. 2006 (мясные породы)
	781	C→T	Ferraz et.al. 2006 (мясные породы)
Интрон 3	837	C→G	Zhang et al. 1993 (мясные породы)
	1547	C → T	J.Yao et. Al. 1996 (голштинский скот) A.Lagziel, E.Lipkin 1999 (голштинский скот)
	1692	C → T	J.Yao et. Al. 1996 (голштинский скот)
Интрон 4	1947	T→G	A.Lagziel, E.Lipkin 1999 (голштинский скот)
	2017	C → T	J.Yao et. Al. 1996 (голштинский скот) A.Lagziel, E Lipkin 1999 (голштинский скот)
Экзон 5	2141	C→G	J.Yao et. Al. 1996 (голштинский скот). A.Lagziel, E. Lipkin 1999 (голштинский скот) W. Ge et.al 2003(ангусский скот)
	2291	A→C	J.Yao et. Al. 1996 (голштинский скот). A.Lagziel, E. Lipkin 1999 (голштинский скот)
3`- фланкирующая область	2565	A→G	A.Lagziel, E.Lipkin 1999 (голштинский скот)
	2567	G→T	A.Lagziel, E.Lipkin 1999 (голштинский скот).
	2731	Два и три повтора TC	A.Lagziel, E.Lipkin 1999 (голштинский скот)

Большая часть выявленных полиморфных сайтов расположена в нетранслируемых интронах, некоторые - в регуляторной последовательности и лишь один из них расположен в транслируемой области пятого экзона, в положении - 2141 и представляет собой трансверсию C→G.

Именно она и привлекает наибольшее внимание в исследованиях, связанных с поиском ассоциаций полиморфных вариантов гена гормона роста с признаками мясной и молочной продуктивности у крупного рогатого скота.

С помощью метода ПЦР-ПДРФ, используя рестрикционный фермент AluI Lusy et al. (1993) выявил два аллеля, отвечающих за две альтернативные формы бычьего соматотропина с остатком лейцина или валина в положении 127. Было показано, что инъекции рекомбинантного бычьего GH с остатком валина

лактующим коровам более интенсивно повышало жирность молока по сравнению с применением GH-Leu127 [191]. Это наблюдение подтверждает, что аллель, кодирующий валин содержащий протеин, является предпочтительным для молочной продуктивности. С другой стороны, Lусу et al. (1993) показали значительно более высокую молочную продуктивность генотипа *bGH-AluI^{LV}* у джерсейских коров и отсутствие эффекта в их образцах голштинских, Guernsey, Ayrshire или джерсейских быков. В большинстве исследований животные с генотипом *bGH-AluI^{VV}* (две копии гена с Валином в сто двадцать седьмом положении) демонстрировали более низкие темпы роста [192-194], чем животные с генотипом *bGH-AluI^{LL}* и *bGH-AluI^{LV}*. Они так же обладали более низкими показателями веса, ежедневного прироста веса и другими. [195, 196]. Имеются так же данные о том, что по этим признакам преимущественным является генотип *bGH-AluI^{LV}*. Недавно Zwerzchowski et. al. [166] было показано, что *bGH-AluI^{VV}* мясные быки имели более высокий суточный прирост веса по сравнению с быками обладавшими другими генотипами. С другой стороны, Di Stasio et al. [167], изучая Piedmontese cattle, показал отсутствие связи между полиморфизмом гена *bGH-AluI* и признаками мясной продуктивности. Имеющиеся на данный момент данные позволяют предположить, что фенотипические эффекты гена *bGH* на рост и мясные количественные признаки отличны между собой. Возможно, что L/V полиморфизм является всего лишь генетической маркерной системой, связанной с другими, недостаточно изученными, факторами. М. Switonski [197] была высказана идея о том, что разногласия в имеющихся данных могут быть обусловлены тем, что исследования проводились на разных популяциях, представленных молочными и мясными породами.

В своих работах по исследованию эффекта L/V полиморфизма на молочную продуктивность R.S. Pawar так же указывает на неоднозначность наблюдаемых взаимосвязей [198]. Им получены данные, свидетельствующие о значительном влиянии генотипа по GH локусу на признаки молочной продуктивности. В частности, общий удой у коров с *bGH-AluI^{LL}* генотипом был значительно ниже, чем у коров с генотипом *bGH-AluI^{LV}* и *bGH-AluI^{VV}*. Причем различия по данному признаку между генотипами *bGH-AluI^{LV}* и *bGH-AluI^{VV}* оказались незначительными, что позволило ему высказать предположение о доминировании *bGH-AluI^V*-аллеля. Напротив, Grochowska and Zwierzchowski [176,195] обнаружили значительную взаимосвязь между наличием *bGH-AluI^L*-аллеля и высокой молочной продуктивностью у голштинов. Исследования же Van der Welf et al. [199] значительной ассоциации между GH локусом и молочной продуктивностью не выявили вовсе.

Хатами С.Р. и Ильясов А.Г. в группах коров ярославской, черно-пестрой и у бестужевской пород, установили, что самое высокое содержание жира в молоке, наблюдается у коров с гетерозиготным генотипом *bGH-AluI^{LV}* [200, 201]. Михайлова М.Е. (2008) определила, что самые высокие показатели по общему удою также характерны для коров черно-пестрой породы с *bGH-AluI^{LV}*

генотипом, но наиболее высокое содержания жира в молоке демонстрируют животные с генотипом *bGH-AluI^{LL}* [160].

Хабибрахманова Я.А. отмечает, что у коров холмогорской породы с генотипом *bGH-AluI^{VV}* наблюдался наибольший удой по первой и наивысшей лактации. Наибольшие значения выхода молочного жира и белка по наивысшей лактации наблюдаются у животных с генотипом *bGH-AluI^{VV}* (361 кг и 288 кг), что больше на 11% и 10%, чем у генотипа *bGH-AluI^{LV}*. Коровы черно-пестрой породы с генотипами *bGH-AluI^{LV}*, *bGH-AluI^{VV}* по первой лактации имели лучший удой, чем коровы с генотипом *bGH-AluI^{LL}*. Наибольшие значения жирномолочности и белкомолочности показали коровы с генотипом *bGH-AluI^{LV}*. Однако, коровы с генотипом *bGH-AluI^{LL}* имели большее содержание белка и жира в молоке. По наивысшей лактации коровы с генотипом *bGH-AluI^{VV}* имели наиболее высокие показатели удоя [202].

Dario C. получил данные, что у коров итальянской джерсейской породы с генотипом *bGH-AluI^{LL}* более высокий надой молока, по сравнению с *bGH-AluI^{LV}* генотипом. Генотип *bGH-AluI^{LL}* существенно отличается от генотипа *bGH-AluI^{LV}* содержанием жира (4.95% и 4.13%) и белка (4.00% против 3.47%) в молоке [203]. Аналогичную зависимость выявил и Chung E.R., он также установил, что в молоке коров джерсейской породы с генотипом *bGH-AluI^{LL}* более высокое содержание белка, чем у животных с *bGH-AluI^{LV}* генотипом [75]. Лусу М.С. с соавторами сообщили, что *bGH-AluI^L* аллель тесно связана с более высокими параметрами молочной продуктивности у американских голштинов [204].

Транзиция С→G в восьмьсот тридцать седьмом положении третьего интрона, описанная Zhang et al. (1993), может быть детектирована методом ПЦР-ПДРФ с помощью рестриктазы *MspI* [205]. При исследовании данного полиморфизма у датского и норвежского скота, Ној et al. (1993) обнаружил, что *MspI* (-) аллель является более частым у линий, селективируемых на молочную жирность [206]. Lee et al. (1993, 1994) также обнаружил положительную ассоциацию *MspI* (-) аллеля с высокой жирностью молока у голштинских коров [207-208]. Lagziel et al (1999) обнаружил значительный повышающий эффект *MspI* (-) аллеля на процентное содержание белка и общую продуктивность молочного белка за 305 суточные лактации [209]. Авторы считают, что наблюдаемый эффект имеет место благодаря локусу, сцепленному с *bGH*, но находящемуся вне его. Напротив, по данным Yao et al. (1996), которые детектировали этот сайт методом SSCP, предпочтительным с точки зрения продуктивности молока, молочного жира и белка является аллель *MspI* (+) [210].

По данным Furu et al. (1998), *MspI* (+/-) генотип, локализованный в третьем интроне, сцеплен с инсерцией/делецией размером примерно 0,9 кБ, локализованной в 3'-фланкирующем регионе, несущем сайт регуляции транскрипции. По данным этих авторов, полученным при

исследовании быков голштинской породы, данный полиморфизм не приводит к различиям в признаках генетической ценности животных [211].

Объектом для изучения ассоциаций данного полиморфизма с признаками продуктивности являются различные породы крупного рогатого скота от широко распространенных общепризнанных лидеров, до пород, локально разводимых на конкретной территории. A. Dubus et al. (2004) исследовали представителей черно-пестрой и голштино-фризской породы польского скота. В работе показано, что животные с генотипом MspI (+/+) обладали более высокими показателями удоя по сравнению с обладателями генотипа MspI (+/-) и MspI (-/-) [212].

Третий полиморфизм с применением рестриктазы TaqI был описан Rocha et al. (1992). Falaki et al. (1996a, 1996b) выявил ассоциацию данного полиморфизма у симментальских коров, и отсутствие ассоциации у голштино-фризских быков [213, 214]. Полиморфизм GH- TaqI существует благодаря инсегии/делеции размером примерно 1000 п.н. в области 3'-конца гена [206, 215]. В гене бычьего соматотропина существуют так же другие полиморфные сайты, которые будут интересны для исследований их ассоциации с признаками молочной продуктивности.

Necht и Geldermann (1996) показали семь мутаций в гене гормона роста. Шесть из них были идентифицированы в 5'-фланкирующем регионе и одна в первом интроне. Некоторые из этих вариантных сайтов являются потенциально связывающими сайтами для транс взаимодействующих факторов (таких, как СААТ/энхансер, связывающий протеин и тиротид гормон распознающий элемент) и вероятно вовлечены в регуляцию экспрессии гена гормона роста [216].

Rodrigues et al. (1998) идентифицировал полиморфный сайт в промоторной зоне гена. Этот полиморфизм представляет собой делецию тринуклеотида ААГ, локализованного на девять нуклеотидов выше ТАТААА последовательности [217].

К сожалению, в этих последних исследованиях ассоциация с признаками продуктивности не исследована.

Таким образом, можно отметить, что исследования полиморфных вариантов гена гормона роста как гена-кандидата для маркер-сопутствующей селекции имеют значительные перспективы, учитывая его несомненную роль в контроле процессов роста и лактации. С другой стороны, некоторая противоречивость получаемых данных свидетельствует о недостаточности знаний о механизмах формирования его фенотипического эффекта. Так же необходимо учитывать возможность того, что фенотипический эффект исследуемых полиморфизмов в некоторых случаях обусловлен не собственно полиморфизмом, а является результатом сцепления с другим локусом, непосредственно ответственным за формирование признака. Исходя из выше перечисленных аспектов, для своего исследования гена гормона роста, как ключевого участника соматотропиновой оси мы выбрали AluI полиморфизм,

так как он, во-первых, обуславливает аминокислотную замену в структуре белка, во-вторых, его ассоциация с признаками молочной продуктивности практически не изучалась на отечественных породах крупного рогатого скота, в третьих представляет значительный интерес его исследование в связке гаплотипов по ключевым генам соматотропиновой оси.

Таким образом, можно отметить, что исследования полиморфных вариантов гена гормона роста как гена-кандидата для маркер-сопутствующей селекции имеют значительные перспективы, учитывая его несомненную роль в контроле процессов роста. С другой стороны, некоторая противоречивость получаемых данных свидетельствует о недостаточности знаний о механизмах формирования его фенотипического эффекта.

Контрольные вопросы:

1. Какие известны полиморфные варианты гена гормона роста?
2. Какими учеными и на каких породах скота был исследован полиморфизм *bGH*-AluI?
3. К какой аминокислотной замене приводит полиморфизм *bGH*-AluI?
4. Кем был открыт полиморфизм гена гормона роста, распознаваемый с помощью рестриктазы MspI?
5. Какой из полиморфизмов гена *bGH* является наиболее перспективным для изучения его влияния на продуктивность крупного рогатого скота?

2.3 Рецептор гормона роста (GH R)

2.3.1 Структура гена рецептора гормона роста *bGH* R. Особенности экспрессии

GHR кодируется одиночным геном, который локализован на двадцатой хромосоме у КРС [218, 219]. Он содержит одиночный трансмембранный домен, содержащий двадцать четыре аминокислоты, экстрацеллюлярный (гормон-связывающий) домен и длинный цитоплазматический домен (сигнал-индуцирующий) [220].

Изначально предполагалось, что данный ген содержит десять экзонов, со стартовым кодоном трансляции во втором экзоне [221], однако последние исследования выявили, что *bGHR* ген у разных видов содержит множественные лидирующие экзоны (экзоны 1) [222, 223]. В настоящее время известно, что *bGHR* состоит из девяти экзонов в транслируемой части (со 2 по 10) и девяти экзонов в 5'-некодирующем регионе, который включает девять нетранслируемых экзонов: 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I [224]. 5'-регуляторная область данного гена содержит составные промоторные элементы, энхансеры, репрессоры, детермианты тканеспецифичной экспрессии гена и другие регуляторные элементы [225]. Экзоны нетранслируемой области

подвергаются альтернативному сплайсингу и каждый из них имеет личный сайт начала транскрипции. У *Bos Taurus* обнаружен LINE-1 элемент, размером примерно 1,2 кб, расположенный выше экзона 1А [226].

Регуляция экспрессии гена рецептора гормона роста *bGHR*. О механизмах, регулирующих экспрессию этого гена, известно очень мало. Инициация транскрипции в различных лидирующих экзонах и сплайсинг разных лидирующих экзонов на втором экзоне приводит к образованию множественных матричных РНК рецептора гормона роста, которые отличаются между собой 5'-нетранслируемым регионом [227], что приводит к образованию не идентичных белковых продуктов.

Гетерогенность нетранслируемого 5' региона рецептора гормона роста продемонстрирована у разных видов млекопитающих. Девять вариантов mRNA GHR идентифицированы у человека (V1–V9; [228]) и крупного рогатого скота (1А–1I; [225]). У КРС вариант 1А исключительно экспрессируется в печени и транскрипционно контролируется печеночным фактором (liver-enriched factor) и гепатоцит-нуклеарным фактором-4 (HNF-4; [229]). Более того, имеются сведения в пользу экспрессии различных транскриптов в ходе развития и ткане-зависимой регуляции [228, 230].

Контрольные вопросы:

1. Структура гена рецептора гормона роста?
2. На какой хромосоме локализован ген *bGHR* крупного рогатого скота?
3. Каков механизм регуляции экспрессии гена рецептора гормона роста?
4. Какова структура белка рецептора гормона роста?

2.3.2 Характеристика белка рецептора гормона роста GHR и его биологическая функция

Белок рецептора гормона роста (growth hormone receptor, GHR) представляет собой мембрано-ассоциированный белок, содержащий 620 а.о. Молекула рецептора состоит из трех функциональных доменов: экстрацеллюлярного (расположенного на поверхности клетки), трансмембранного (расположенного в пределах мембраны) и интрацеллюлярного или цитоплазматического (расположенного внутри клетки). Экстрацеллюлярный домен состоит из двести сорока остатков аминокислот и является N-терминальным, трансмембранный домен включает триста пятьдесят остатков, внутриклеточный домен состоит из двадцати четырех остатков аминокислот и является C-терминальным. GHR принадлежит к цитокинин/гематопоэтическому семейству рецепторов, участники которого, имеют сходства между собой по структуре и свойствам [231-233].

Экстрацеллюлярный домен гормона роста состоит из двух функциональных частей: одна выполняет функцию связывания с гормоном

роста [234], другая, прилегающая к мембране, связана с трансмембранным доменом с помощью линкера, состоящего из одиннадцати аминокислотных остатков. Внутриклеточный домен содержит консервативные последовательности, являющиеся сайтами связывания с сигнальными пептидами, такими, как JAK-2 [189].

Биологическая функция GHR состоит в передаче действия гормона роста на клетки, т.е. сигнальная трансдукция через клеточную мембрану.

Первый этап сигнальной трансдукции включает присоединение GH к GHR и димеризацию двух молекул GHR. Димеризация приводит к связыванию цитоплазматического домена с интрацеллюлярной протеин киназой JAK-2 и другими киназами, которые в свою очередь другие киназы, энзимы и нуклеарные протеины, являющиеся сигнальными преобразователями и активаторами транскрипции. Таким образом, посредством различных последовательных биохимических событий, в конечном счете, активируется транскрипция генов инсулина, инсулиноподобного фактора-1 и множества других генов [228, 235, 236].

Присутствие GHR в различных тканях и клетках свидетельствует о широком диапазоне влияния гормона роста на физиологические процессы организма. GHR был идентифицирован в печени, сердце, почках, сердечной и скелетной мускулатуре, кишечнике, желудке, надпочечниках и многих других тканях и органах [237]. Естественно, что мутации, приводящие к изменению структуры белка рецептора, приводят и к изменению его способности трансдуцировать сигнал гормона роста. А так как для гена рецептора характерным является альтернативный сплайсинг, то большое значение приобретают так же мутации, возникающие в областях интронов и, несомненно, мутации регуляторных областей. Соответственно, при рассмотрении данного гена, как гена-кандидата для использования в маркер-сопутствующей селекции, значительное внимание уделяется исследованию аллелей гена, полиморфных не только по кодирующим, но и по фланкирующим областям. В настоящее время интенсивные исследования гена рецептора гормона роста направлены на выявление его полиморфных вариантов, в частности одиночных нуклеотидных замен как в экспрессируемых, так и в регуляторных областях.

Контрольные вопросы:

1. Структура белка рецептора гормона роста?
2. Из скольких функциональных доменов состоит белок рецептора гормона роста?
3. В чем состоит биологическая функция рецептора гормона роста?
4. В каких органах присутствует рецептор гормона роста?

2.3.3 Ассоциация полиморфных вариантов гена рецептора гормона роста с признаками мясной и молочной продуктивности

Несколько полиморфных последовательностей было идентифицировано в гене рецептора гормона роста. Их список представлен в таблице 5.

Таблица 5 - Локализация однонуклеотидных замен гена рецептора гормона роста

Локализация	Положение относительно точки старта	Полиморфизм	Авторы (порода, у которой мутация впервые выявлена)
1	2	3	4
5'-фланкирующий регион	-887	C→T (AccI)	Aggrey (1999) Голштинский скот
	-1177	A→T (AluI)	Aggrey (1999) Голштинский скот
	-232	C→T (StuI)	Aggrey (1999) Голштинский скот
	-1104	C→T (Fnu4HI/TseI)	A Maj (2002) черно-пестрый скот
	-154	A → G (NsiI)	Ge W (1999) ангусский скот
Экзон 8		T→A фенилаланин на тирозин в положении 279	Blott (2003) джерсейский, голштино-фризский, черно-пестрый скот
Экзон 10	200	G→A аланин на треонин (NarI)	Ge W 2000 (ангусский скот)
Экзон 10		A→T аспарагин на треонин в положении 528	Blott (2003) джерсейский, голштино-фризский, черно-пестрый скот
	1681	A→G серин на глицин в положении 541	Ge W (2000) ангусский скот

Исследования полиморфизмов периферической части гена. В 1999 году Aggrey et al. при изучении голштинских быков области региона было выявлено три полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с использованием рестриктаз AluI, StuI, и AccI. Рестриктаза AccI распознает транзицию C→T в положении -887. Аллелю AccI (+), разрезаемому рестриктазой, соответствует нуклеотид C. Полиморфизм по StuI рестриктазе выявляет транзицию C→T в положении -232. Рестриктаза AluI распознает A→T замену в положении -1177 [238]. Аллелю AluI (+), разрезаемому рестриктазой, соответствует нуклеотид A. Ассоциация данных полиморфизмов с признаками продуктивности изучалась впоследствии различными учеными.

Относительно *bGHR*-AluI полиморфизма, у голштинской породы Aggrey et al было показано, что животные с генотипом *bGHR*-AluI (+/+) имеют более высокое содержание жира в молоке, по сравнению с животными, с генотипами *bGHR*-AluI (+/-) и *bGHR*-AluI (-/-) [238]. В работах A Maj при изучении

ассоциации полиморфизма *bGHR*-AluI с признаками мясной продуктивности у животных польской черно-пестрой породы, показано, что животные-носители аллеля *bGHR*-AluI(–) обладали более высокими показателями по таким параметрам, как вес тела и масса вырезки [239]. При этом наибольшие результаты по этим признакам были характерны для животных с генотипом *bGHR*-AluI (–/–) [240].

Исследования *bGHR*-StuI полиморфизма 5'-промоторной зоны гена рецептора гормона роста также проводились (молочные признаки у голштинского скота, Aggrey et al. 1999). Животные с генотипами *bGHR*-StuI(+/-) обладали более высоким содержанием, жира и белка в молоке, по сравнению с животными обладающими генотипами *bGHR*-StuI(+/-) и *bGHR*-StuI(-/-).

При исследовании полиморфизма по *bGHR*-AccI в работах Aggrey et al. статистически значимой ассоциации генотипа с молочными признаками выявлено не было. В дальнейшем эти полиморфные замены были исследованы другими авторами. Maj A с соавторами обнаружил, что животные мясных пород, обладавшие *bGHR*-AccI (+/-) генотипом, имели больший ежедневный прирост по сравнению с *bGHR*-AccI (–/–) животными, а так же давали наибольшее содержание полезной вырезки по сравнению с AccI +/- животными [241]. В то же время у животных молочной, польской черно-пестрой породы, никакой ассоциации с мясной продуктивностью выявлено не было [240]. При исследовании польской черно-пестрой породы на предмет связи AccI полиморфизма с признаками молочной продуктивности А. Maj было обнаружено, что он связан с некоторыми параметрами молочной продуктивности (общая энергия) и состава молока (процент сухого вещества) [241].

Новый полиморфизм был обнаружен А Maj и соавт. в положении -1104 5'фланкирующей области и представляет собой транзицию С→Т. Данный полиморфизм обнаруживается с помощью рестриктазы Fnu4HI /TseI: *bGHR*-Fnu4HI (+) соответствует аллель, содержащий в данном положении нуклеотид С [239].

В ходе исследования мясных пород, таких как лимузинская, ангусская и герефорды, было показано, что животные с генотипом *bGHR*-Fnu4HI (+/+) обладали большим суточным приростом и большей конверсией корма по сравнению с животными, обладателями генотипа Fnu4HI (+/-) и Fnu4HI (–/–). Генотип *bGHR*-Fnu4HI (+/+) был ассоциирован со значительно более высокой скоростью роста между 13 и 15 месяцами жизни [239]. При исследовании данного полиморфизма на представителях молочной породы, польской черно-пестрой, не было выявлено ассоциации ни с признаками мясной [240], ни с признаками молочной продуктивности [242].

В 1999 году Ge W. с соавторами при исследовании популяции ангусского скота была обнаружена одиночная нуклеотидная замена (SNP) в области промоторной зоны первого экзона [243]. Данная нуклеотидная замена

впоследствии была идентифицирована как $A \rightarrow G$ транзигия в положении -154 и распознается рестриктазой NsiI. Аллель *bGHR-NsiI* (+) в данном положении содержит нуклеотид G [244]. Maj A. исследовал данный полиморфизм на мясных породах, таких как ангусский скот, лимузинский и герефорды. FLP-NsiI генотип оказался ассоциированным с ежедневным поглощением корма. Генотип *bGHR-NsiI* (–/–) или *bGHR-NsiI* (+/–) был ассоциирован с меньшим потреблением корма, а также у животных с генотипом *bGHR-NsiI* (–/–) был более высокий показатель процента постной вырезки по сравнению с другими генотипами [239]. Ассоциация данного полиморфизма с признаками мясной продуктивности была так же исследована группой Maj A. на молочной черно-пестрой породе польского скота. И в этом случае положительная ассоциация по мясным показателям была характерна для аллеля *bGHR-NsiI* (+). Хотя ассоциация была выявлена по другим параметрам, например, вес холодной туши и так далее [240]. При изучении на данной породе параметров молочной продуктивности, предпочтительным оказался аллель *bGHR-NsiI* (–). Животные с генотипом *bGHR-NsiI* (–/–), по сравнению с животными с генотипом *bGHR-NsiI* (+/+), давали больше молока с большим содержанием основных белковых компонентов, таких как жир, белок и лактоза [242].

Исследования кодирующей части гена рецептора гормона роста.

Исследования кодирующей части гена рецептора гормона роста проводились параллельно с исследованиями регуляторных зон.

В 2000 году Ge W. et al. было выявлено несколько полиморфных вариантов гена, обусловленных наличием одиночных нуклеотидных замен (SNP) в области десятого экзона. Из них нуклеотидная замена $G \rightarrow A$ приводит к замене аминокислот в последовательности белка аланин (GCC)→треонин (ACC). В случае данного полиморфизма рестриктаза NarI узнает нуклеотид G. Другая замена $A \rightarrow G$ приводит к замене серин(AGC)→глутаминовая кислота (GGC) и может быть идентифицирована с помощью рестриктазы AluI [245]. Однако, ассоциация этих полиморфных вариантов с признаками продуктивности (ни мясной, ни молочной) не изучалась.

Кодирующая часть гена была так же исследована в 2003 году Blott et al. на предмет выявления SNP у джерсейского, голштино-фризского и черно-пестрого скота. Было выявлено несколько полиморфных вариантов, два из которых изменяют аминокислотную последовательность рецептора гормона роста [226].

$A \rightarrow T$ замена в десятом экзоне приводит так же к замене аспаригина на треонин (N528T) в цитоплазматическом домене. Обе аминокислоты являются полярными незаряженными остатками. Эти остатки являются менее консервативными в ходе эволюции и могут заменяться или аспарагином (человек, кролик, свинья и куры), либо серином (овцы, мыши и крысы). Однако данные по ассоциации этого полиморфизма с признаками продуктивности отсутствуют [226].

Замена Т→А в восьмом экзоне вызывает неконсервативную замену нейтрального фенилаланина на незаряженный, но полярный остаток тирозина (F279Y). Соответствующий остаток фенилаланина локализован в трансмембранном домене гена рецептора гормона роста и является консервативным для всех изученных млекопитающих. Blott выявила значительную ассоциацию фенилаланин/тирозин полиморфизма в трансмембранном домене с большим молочный продуктивностью и составом молока у животных немецкой и новозеландской популяции голштинских коров [226]. По данным авторов, животные, обладатели аллеля Y, характеризовались более высокой общей продуктивностью молока, в то время как у животных носителей аллеля F общая продуктивность была ниже, а процентное содержание белка и жира в молоке было более высоким. Механизм формирования такого эффекта до конца не выяснен. Предполагается, что отмеченный эффект обусловлен тем, что ароматическое кольцо тирозина содержит реактивную карбоксильную группу, которая делает его менее гидрофобным, чем такой же ароматический и нейтральный фенилаланин [246]. В дальнейшем мутация F279Y была исследована Luca Fontanesi et al. (2007) на животных итальянской голштино-фризской породы, итальянской черной, итальянской симментальской, джерсейской пород. Была отмечена довольно высокая частота предпочтительного аллеля у представителей итальянских популяций исследованных пород [247]. Предполагается, что обнаруженная мутация является одной из причин, объясняющих QTL двадцатой хромосомы, обнаруженные при ее картировании [248, 249]. В 2006 году Viitala S. et al. также была подтверждена положительная роль мутации F279Y на общую продуктивность и состав молока при исследовании популяции финского айрширского скота (Finnish Ayrshire) [250].

Замена нуклеотидов Т → А в восьмом экзоне гена рецептора гормона роста вызывает замену аминокислотной последовательности от фенилаланина к тирозину и идентифицируется эндонуклеазой рестрикции SspI. В настоящее время практически не изучено влияние *bGHR-SspI* полиморфизма на мясные признаки крупного рогатого скота, однако рядом ученых доказана ассоциация данного полиморфизма с молочной продуктивностью. Исследованиями, проводимыми на разных породах, было выявлено, что замена аминокислотной последовательности от фенилаланина к тирозину приводит к снижению содержания жира и белка в молоке. Исследование Rahmatalla S.A. подтверждает влияние полиморфизма *bGHR-SspI* на удои, а также на содержание белка и жира в молоке немецкой популяции голштинского скота, так, гомозиготные коровы с генотипом *bGHR-SspI^{YY}* ($p < 0,05$) имеют более высокое содержание жира и белка по сравнению с животными других генотипов. В дополнение к ранее сделанным выводам, в исследовании Rahmatalla S.A. было также обнаружено значительное влияние полиморфизма гена рецептора гормона роста на содержание казеина и лактозы голштинской

породы [251]. Таким образом, можно отметить, что для молочной продуктивности предпочтительным является аллель *bGHR-SspI^V*.

Jolanta Komisarek, предполагает, что полиморфизм *bGHR* в двести семьдесят девятом положении может влиять на изменчивость удоя молока, а также на содержание молочного жира и белка джерсейской породы крупного рогатого скота [252]. Viitala S. также сообщает о связи полиморфизма *bGHR-SspI* с удоем, процентным содержанием белка и жира айрширской породы крупного рогатого скота [253].

Учитывая значительную роль рецептора гормона роста в формировании внутриклеточного ответа на воздействие гормона роста, необходимость исследования данной проблемы становится абсолютно очевидной. Причем, такие данные представляют не только теоретический интерес, направленный на выявление механизмов взаиморегуляции генов, но и практический интерес для развития маркер-зависимой селекции. Наибольший интерес представляет полиморфизм Т→А в восьмом экзоне, приводящий к замене фенилаланина на тирозин в трансмембранном домене. Так как, во-первых, данный полиморфизм достоверно приводит к изменению структуры белка, во-вторых, ассоциация его с признаками молочной продуктивности практически не изучена ни на голштинской, ни на черно-пестрой породе.

Контрольные вопросы:

1. Какие полиморфизмы были идентифицированы у гена рецептора гормона роста?
2. Молекулярная основа *bGHR-SspI* полиморфизма
3. Какая аллель полиморфизма *bGHR-SspI* является наиболее перспективной для молочной продуктивности скота?
4. На каких породах изучали разные полиморфные варианты гена рецептора гормона роста?

2.4 Инсулиноподобный фактор-1. Структура и экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*).

Инсулиноподобные факторы (IGF-I и IGF-II) являются факторами множественного действия, которые наряду с инсулином регулируют рост, развитие, лактацию и участвуют в реализации различных физиологических функций в ряду тканей и специфических клеток.

У млекопитающих *bIGF-1* ген состоит из шести экзонов и составляет 90 кб хромосомальной ДНК [254]. Для гена *bIGF-1* характерно два лидирующих экзона, так же наличие в области 5' фланкирующих регионов первого и второго экзонов нескольких сайтов старта транскрипции. Применение различных ССТ регулируется на основе тканеспецифичности и множеством физиологических условий [255, 256].

Двумя альтернативными лидирующими экзонами продуцируются два класса транскриптов. Транскрипты первого класса (образующиеся с первого экзона), являются основными транскриптами во всех тканях, включая печень, на всех стадиях развития. Транскрипты второго класса локализованы в зрелой печени постоянно и в некоторых других тканях в течение короткого периода неонатального развития [255, 257]. Транскрипты второго класса более восприимчивы к гормону роста, чем транскрипты первого класса [258], в то время как транскрипты первого класса, кроме гормона роста, чувствительны так же к другим факторам.

Регуляция экспрессии гена *bIGF-1*. Регуляция экспрессии *bIGF-1* осуществляется на четырех уровнях: транскрипция, сплайсинг и стабилизация мРНК, трансляция и посттрансляция. Множественные сайты старта транскрипции, альтернативные промоторы и лидирующие экзоны избирательно транскрибируются на разных этапах развития и под действием различных факторов. Синтез и секреция *bIGF-1* регулируется различными гормонами, но в большей степени гормоном роста. Употребляемые в пищу вещества также стимулируют синтез и секрецию *bIGF-1* [259-261].

Синтез *bIGF-1* в основном осуществляется в печени, откуда он экскретируется в плазму крови и на основе тканеспецифичности действует как эндокринный фактор на органы-мишени. К органам-мишеням IGF в том числе относится и молочная железа. В некоторых тканях белок IGF-1 синтезируется локально [262-264]. В частности, IGF-1 мРНК экспрессируется в молочной железе коров, тем самым подтверждая возможность его локального синтеза. Причем имеющиеся данные подтверждают, что способностью к синтезу IGF-1 обладают не секреторные эпителиальные, а стромальные клетки молочной железы [263]. Ronge было показано, что концентрация IGF-1 в крови обратно коррелирует с процессом лактации [263]. В то время как концентрация IGF-2 в ходе лактации остается практически неизменной.

Контрольные вопросы:

1. Какие биологические функции выполняет инсулиноподобный фактор роста?
2. Из скольких экзонов состоит ген инсулиноподобного фактора-1 роста у млекопитающих?
3. Структура гена *bIGF-1*
4. Механизм регуляции экспрессии гена *bIGF-1*?
5. Где преимущественно происходит синтез *bIGF-1*?

2.4.1 Характеристика белка IGF-1 и биологическая роль

IGF принадлежат к семейству структурно родственных полипептидов, которое так же включает инсулин и релаксин. Участники этого семейства

демонстрируют 40-50% аминокислотную гомологию друг с другом [269]. Последовательность бычьего IGF-1 является идентичной таковой у человека. Зрелый IGF-1 пептид является однопептидным, состоящим из семидесяти аминокислот (молекулярный вес 7.646 Д). Данный полипептид состоит из функциональных доменов А, В, С, и D. Домены А и В обладают высокой гомологией с доменами А и В инсулина. Домен А является важным для связывания IGF-1 с собственным рецептором и запускающих последующих внутриклеточных событий. Домен В участвует в связывании с IGF-ассоциированными белками, участвующими в его транспорте, депонировании и реализации некоторых физиологических эффектов [265].

IGF-1 является важнейшим эндокринным посредником действия соматотропного гормона, почему и называется также соматомедином. Он производится гепатоцитами печени в ответ на стимуляцию их соматотропиновых рецепторов. В периферических тканях именно IGF-1 обеспечивает практически все физиологические эффекты соматотропного гормона. IGF-1 также обеспечивает обратную связь с гипоталамусом и гипофизом по соматотропной оси: от уровня IGF-1 в крови зависит секреция соматотропин-рилизинг-гормона и соматотропного гормона. При низком уровне IGF-1 в крови секреция соматотропин-рилизинг-гормона и соматотропина возрастает, при высоком — снижается. Также IGF-1 регулирует секрецию соматостатина: высокий уровень IGF-1 приводит к возрастанию секреции соматостатина, низкий — к её снижению. Этот механизм является ещё одним способом регуляции уровня соматотропного гормона в крови. Уровень IGF-1 в крови зависит от действия на печень не только соматотропного гормона, но и половых стероидов и тиреоидных гормонов, глюкокортикоидов, инсулина. При этом инсулин, андрогены, эстрогены повышают секрецию IGF-1 печенью, а глюкокортикоиды её снижают. Это является одной из причин синергизма инсулина, соматотропина, половых и тиреоидных гормонов в отношении процессов роста и развития организма, роста и дифференцировки тканей.

На молекулярном уровне биологический эффект IGF-1 заключается в том, что он регулирует экспрессию примерно тридцати генов на уровне транскрипции [266]. Это гены, кодирующие некоторые важные функциональные протеины, такие как рецепторы, транспортные белки и ферменты. Биохимический внутриклеточный эффект IGF-1 заключается в стимуляции транспорта глюкозы и аминокислот через клеточную мембрану, окисление глюкозы и синтез липидов, гликогена, белка, РНК и ДНК [267-270]. На тканевом уровне, IGF-1 стимулирует митоз (клеточную пролиферацию) и дифференциацию клеток, в том числе и клеток молочной железы [271-273]. На тканево-организменном уровне, IGF-1 стимулирует рост костной ткани [274], развитие мышц [273], а также регулирует функции почек [275], развитие и регенерацию нервной системы [276], синтез половых гормонов, оогенез и сперматогенез, а также процесс лактации [276].

Контрольные вопросы:

1. Структура белка инсулиноподобного фактора роста.
2. Биологическая роль IGF-1?
3. Какую биологическую роль играет инсулиноподобный фактор роста на молекулярном уровне?
4. Какое воздействие оказывает IGF-1 на тканевом уровне?
5. Какое второе название инсулиноподобного фактора роста?

2.4.2 Полиморфизм гена *bIGF-1* и его ассоциация с признаками мясной и молочной продуктивности

Работ по изучению влияния генотипа на молочные признаки довольно мало. У крупного рогатого скота и овец был обнаружен полиморфизм динуклеотидных [CA] повторов в области 5'-фланкирующего региона первого экзона на расстоянии примерно 1 кб от первого кодона [277, 278]. Moody et al. (1994) показали значительный эффект полиморфизма CA повторов в 5'-регионе на вес и вес годовалых телят у мясного крупного рогатого скота [279].

У гена *bIGF-1* были обнаружены и описаны три полиморфных сайта в промоторной области. Первый (CA) полиморфизм обусловлен динуклеотидными повторами, локализован в промоторе P1 [280], внутри которого идентифицируется A→C трансверсия в позиции -977 (GenBankAcc. No. DQ975234) [278]. Второй полиморфизм обусловлен T→C переходом в положении -512, также он известен как одиночный нуклеотидный полиморфизм (SNP) *bIGF-1*-SnaBI (GenBankAcc. No. AF017143) [281, 282]. Lien S. et al. (2000) обнаружили делецию в четвертом положении (TTTG) в пределах четвертого интрона и один однонуклеотидный полиморфизм в пятом интроне (*bIGF-1*-DpnII) (GenBank Acc. No. AF210383-387) [283]. Девять новых SNP внутри интронов и 3'-областей были генотипированы Mullen M.P. et al. (2011).

Наиболее изученной формой полиморфизма *bIGF-1* является однонуклеотидный полиморфизм, распознаваемый SnaBI-рестриктазой, который находится в 5' фланкирующей области первого экзона. Данный полиморфизм обуславливается T→C нуклеотидной заменой. Различные исследователи проанализировали ассоциации этого полиморфизма с молочной продуктивностью крупного рогатого скота [284-287].

Ge et al. была идентифицирована T (аллель A)→C (аллель B) транзиция у телят ангусского скота [281, 288]. Транзиция расположена в первом кодоне (ATG) первого экзона и распознается с помощью SnaBI рестриктазы. Мутантный *bIGF-1*-SnaBI^B аллель показан как предпочтительный по некоторым признакам мясной продуктивности, в частности, прирост веса за первые двадцать дней постнатального развития. Jae-Но Kim (1998) исследовала этот однонуклеотидный полиморфизм на предмет ассоциации с мясными и молочными признаками у представителей ангусского, симментальского

Charolais и герефордов. Она обнаружила, что коровы с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{AA}* обладали большей продуктивностью молока в сутки. Такие коровы так же приносили телят с более высоким весом при рождении [289]. С. Li et al. (2004) так же исследовала эту мутацию у ангусского скота. Однако значительной ассоциации этого полиморфизма с признаками мясной продуктивности выявлено не было [290]. Siadkowska E (2006) исследовала *SnaBI* -полиморфизм на польской популяции голштино-фризской породы. Ею было отмечено, что обладатели генотипа *bIGF-1-SnaBI^{AB}* характеризуются более высокой продуктивностью молочного жира и белка по сравнению с *bIGF-1-SnaBI^{AA}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}* генотипами [287].

Исследования ассоциации полиморфизма *bIGF-1-SnaBI* с признаками молочной продуктивности проводились различными учеными на разных породах крупного рогатого скота. Так, Mehmannaavaz Y. et al. [291], Bonakdar E. et al. [292] показали, что животные иранской популяции голштинского скота с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{AB}* отличались от особей с гомозиготными генотипами более высоким содержанием жира и белка в молоке. Кроме того, Siadkowska E. et al. [287] также выявила положительную ассоциацию генотипа *bIGF-1-SnaBI^{AB}* с высоким процентом молочного жира и белка у польских популяции коров голштинской породы.

Помимо связи полиморфизма гена *bIGF-1-SnaBI* с молочной продуктивностью, имеются данные о его влиянии и на признаки мясной продуктивности. Ge W. et al. при исследовании семьсот шестидесяти особей ангусской породы обнаружил, что животные с генотипом *bIGF1-SnaBI^{BB}* отличаются от животных с другими генотипами более высоким среднесуточным приростом в первые двадцать дней после отъема [281]. Szewczuk M. et al. выявил связь генотипа *bIGF1-SnaBI^{BB}* с более высокой массой тела у 2-месячных телят голштино-фризской породы, а также с последующим выходом молока, жира и белка [293]. X. Dela Rosa Reyna et al. отметил положительную ассоциацию генотипа *bIGF1-SnaBI^{BB}* с такими чертами мясной продуктивности, как масса туши и суточный привес у мексиканского скота [294]. Curi R.A et al. обнаружил, что у зебу с генотипом *bIGF1-SnaBI^{BB}* наблюдались большие подкожные жировые отложения и масса тела, чем у особей с другими генотипами [295]. Li C. et al. отметил, что генотип *bIGF1-SnaBI^{BB}* у крупного рогатого скота породы *Bos Taurus* связан с высокими показателями массы тела при отъеме [290].

Некоторыми исследователями отмечается положительная ассоциация генотипа *bIGF1-SnaBI^{AB}* с чертами мясной продуктивности у крупного рогатого скота. Так, Othman E. et al. обнаружил положительные ассоциации генотипа *bIGF1-SnaBI^{AB}* с живым и убойным весом, а также с весом жира и мяса ценных отрубов египетских буйволов [296]. Siadkowska E. et al. также подтвердила ассоциацию полиморфизма *bIGF1-SnaBI* с признаками мясной продуктивности польской популяции голштино-фризского скота. Так, особи с генотипом *bIGF1-*

SnaBI^{AB} характеризовались высокой живой массой тела при забое и высоким весом жира и мяса ценных отрубов [287].

Приведенные литературные данные подтверждают связь полиморфизма *bIGF1*-SnaBI с признаками мясной продуктивности крупного рогатого скота, причем наиболее благоприятным является аллель *bIGF1*-SnaBI^B.

Новый полиморфизм, *bIGF1*-TasI был выявлен в 2007 г. S. Zych et.al у представителей голштино-фризской породы. Полиморфизм депонирован под номером DQ975234 GenBank. A→C трансверсия наблюдается в положении -193 внутри сигнальной AATA последовательности, расположенной в пределах микросателлита гена бычьего инсулин-подобного фактора-1. Ген *bIGF1* экспрессируется в разных тканях (включая мышечную и ткань молочной железы) [297] в виде двух классов мРНК, производимых с P1 и P2 промоторов соответственно. Данный полиморфизм области динуклеотидных повторов [CA]_n, локализованный в 5'-регионе, предположительно может быть связанным с регуляторными элементами P1 промотора. К настоящему времени данных о его ассоциации с признаками молочной или мясной продуктивности нет.

Таким образом, является несомненным интерес, который представляет исследование гена IGF-1 в роли гена кандидата с учетом его участия в процессе лактации. С точки зрения поиска полиморфных сайтов, ассоциированных с концентрацией IGF-I в крови и влияющих на проявление признаков продуктивности, наибольший интерес представляют два промоторных региона, чувствительная к гормону роста область внутри второго интрона и экзоны, кодирующие белок.

Контрольные вопросы:

1. Какие обнаружены полиморфные варианты гена инсулиноподобного фактора роста-1?
2. Какой полиморфизм IGF-1 является наиболее изученным?
3. Молекулярная основа *bIGF1*-SnaBI полиморфизма.
4. Какая аллель полиморфизма *bIGF1*-SnaBI является наиболее благоприятной для мясной продуктивности?
5. Ученые, исследовавшие *bIGF1*-SnaBI полиморфизм.

3 Исследование полиморфных генов молочной и мясной продуктивности крупного рогатого скота методом ПЦР-ПДРФ

Стандартным методом выявления полиморфизма структурных генов на уровне ДНК является ПЦР-анализ с последующим рестрикционным гидролизом образующихся фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Суть метода заключается в амплификации определенного фрагмента ДНК, содержащего анализируемую точковую мутацию, с последующим расщеплением наработанного ампликона соответствующей рестриктазой для идентификации аллелей анализируемого гена. Он рутинно используется для диагностики аллельного полиморфизма ряда генов-кандидатов, связанных с локусами хозяйственно-полезных признаков сельскохозяйственных животных [298].

Благодаря таким свойствам, как простота и надежность, данный метод получил широкое распространение и до сих пор популярен, хотя и имеет некоторые ограничения – во-первых, он позволяет детектировать только полиморфизмы единичных нуклеотидов, расположенные в сайтах рестрикции, а во-вторых, годится лишь для детекции уже известных полиморфизмов единичных нуклеотидов [299].

Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) состоит из нескольких стадий. Прежде всего, проводят выделение геномной ДНК. Далее ДНК-фрагмент, содержащий исследуемую последовательность, амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции. Затем амплифицированный фрагмент гидролизуют подходящей рестриктазой. Рестрикт разделяют гель-электрофорезом и после проводят идентификацию фрагментов ДНК.

Способ ПДРФ-анализа обширно используют при молекулярно-генетических изучениях популяций, так как присутствие в геноме индивида рестрикционных фрагментов ДНК известного размера, представляет собой отличный генетический маркер и в то же время фенотипический признак, очень близко связанный с генотипом особи. Что дает возможность контролировать распространение данного маркера в популяции, передавая его из поколения в поколение и используются для составления генетических карт изученных особей классическими генетическими методами. ПДРФ – маркеры из-за их строгой привязки к известным локусам гена не проигрывают по информационному содержанию общим биохимическим маркерам и часто становятся более подходящие, чем сложные фенотипические признаки (например, окрас радужки глаза, окрас шерстного или волосяного покрова, внешний вид листа или цветка у растений), которые определяются большим количеством локусов генов [База знаний по биологии человека. ПДРФ-анализ (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism) метод [300].

Контрольные вопросы

1. Проведите хронологию происходящих процессов: а) приготовление рестрикционной смеси для ПЦР; б) выделение ДНК; в) постановка ПДРФ-анализа; г) постановка ПЦР; д) визуализация полученного продукта и статистическая обработка результатов

2. Каков механизм действия ферментов рестрикции ДНК?

3. Из скольких стадий состоит ПДРФ-анализ?

4. Последовательность в молекуле ДНК, в месте расположения которой рестрикционная нуклеаза разрезает: а) сайт узнавания; б) сайт прикрепления; в) сайт рестрикции; г) специфический сайт

5. Соотнесите термины и понятия:

1. Праймер	а) спонтанное или индуцированное изменение структуры гена;
2. Мутация	б) нуклеозид, к которому присоединена одна или более фосфатных групп;
3. Нуклеотид	в) короткий олигонуклеотид, который гибридизуется с матрицей и служит затравкой при ее копировании;
4. Лocus	г) место на хромосоме, где находится специфический ген.

3.1 Пробоподготовка и выделение ДНК из образца

Взятие биологического материала. При отборе материала необходимо соблюдать меры, предупреждающие заражение людей, контаминирование объектов внешней среды, возможность переноса возбудителя от одной пробы к другой. Трудность исключения контаминации заключается в том, что инактивированные микроорганизмы остаются источниками нуклеиновых кислот, поэтому обработка, например, рук, инструментов спиртом не предотвратит контаминации проб посторонней ДНК.

Один из основных принципов предотвращения контаминации - аккуратность. Необходимо следить за тем, чтобы инструменты, руки и прочие поверхности, соприкасающиеся с биоматериалом, пробой, не контактировали с другой пробой либо чистыми посудой, инструментами, руками.

Другой принцип - использование одноразовой, пластиковой посуды, контейнеров и перчаток.

Третий принцип - разрушение нуклеиновых кислот на поверхностях инструментов, мебели. Инструменты, перед отбором очередной пробы необходимо очищать и обжигать над пламенем спиртовки. Помещение перед началом работы желательно обрабатывать ультрафиолетовым излучением в течение часа. После работы помещение, мебель и инструменты желательно очистить от остатков биоматериала. Инструменты, стеклянную посуду, кюветы можно залить 5% раствором хлорамина, после чего удалить хлорамин стерильной дистиллированной водой. Для мытья кювет можно использовать автоклавированную тряпку.

Четвертый принцип - сохранение нуклеиновых кислот в пробе от разрушающего действия нуклеаз (ферментов, разрушающих нуклеиновые кислоты). На стадии отбора биоматериала, его хранения и транспортировки, данный принцип реализуется путем создания неблагоприятных для работы нуклеаз условий - замораживание, либо высушивание проб [301].

1. *Отбор цельной крови.* У крупного рогатого скота кровь отбирают из ярёмной или хвостовой вены в объёме не менее 5 мл одноразовой иглой (диаметр 0,8 - 1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа "Vacuett" (сиреневые крышки - 6% ЭДТА) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 1:9). Перед взятием крови иглы необходимо простерилизовать кипячением. Кровь от каждого животного берут индивидуальной иглой. Место взятия крови тщательно дезинфицируют спиртом или 5% раствором йода. После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется и выделение ДНК/РНК станет невозможным). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив. Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя, так как он является мощным ингибитором ПЦР.

Следует строго соблюдать температурные режимы хранения и транспортирования отобранного материала. Транспортирование осуществляют в термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом. При хранении материала более суток его необходимо заморозить при температуре минус 20°C.

2. *Отбор волосяных луковиц.* Для отбора волосяных луковиц поверхность кожи животного в зоне ушной раковины и волосы обрабатывают спиртом, после чего проводят аккуратное выдергивание волос. Необходимо следить, чтобы на концах взятых волос оставались волосяные луковицы, потому что именно они используются для анализа. От одного животного необходимо выдернуть 30-40 волос с луковицами. Вырванные волосы упаковывают в плотный бумажный пакет, после чего транспортируют или хранят в сухом, темном месте.

Все образцы должны иметь необходимую информацию: порода, пол, кличка, год и место рождения, идентификационный номер, а также данные о продуктивности животных в зависимости от цели исследования.

Выделение ДНК из исследуемого объекта. Самым первым и важным этапом ПЦР-ПДРФ является выделение ДНК из различного материала, которое предопределяет качество пробоподготовки и успех дальнейших исследований. От качества его исполнения зависит успех всех последующих этапов исследования. Неправильный выбор метода выделения ДНК или его неверное осуществление могут привести либо к получению загрязненной ДНК, непригодной для исследования, либо вообще к потере ДНК [302].

Выбор метода выделения ядерной ДНК определяется в зависимости от исходного материала, а также цели исследования и необходимого времени хранения выделенной ДНК. Имеется множество методов выделения нуклеиновых кислот, такие как детергентный, фенольный, фенольно-детергентный, а также сорбционные способы экстракции, которые получили широкое распространение благодаря эффективному получению препаратов ДНК приемлемой чистоты и концентрации из биоматериала [303].

Этапы выделения ДНК включают быстрый лизис клеток, удаление фрагментов клеточных органелл и мембран с помощью центрифугирования, ферментативное разрушение белков протеиназами и экстрагирование ДНК из раствора с помощью фенола и хлороформа. Затем ДНК осаждают, как правило, этанолом и после удаления надосадочной жидкости растворяют в буферном растворе [304].

Колоночное выделение ДНК. Метод колоночного выделения использует способность ДНК и РНК адгезироваться к поверхности диоксида кремния в присутствии хаотропных ионов, и легко смываться в их отсутствии. Данный метод пришел из органической химии, где на первых этапах набивались стеклянные колонки различными материалами, в том числе диоксидом кремния, потом ДНК и РНК смывались, и далее колонка разбиралась и набивалась заново. Чтобы исключить эти трудоемкие этапы, было предложено использовать одноразовые пластиковые колонки, уже с прослойкой диоксидом кремния, которые идеально подходят по размеру к обычным пробиркам Eppendorf на 1,5 и 2 мл.

Колоночный метод выделения ДНК обладает рядом преимуществ:

- Быстрота выделения (20-40 минут в зависимости от количества образцов биоматериала);
- Эффективное связывание ДНК с мембраной колонки позволяет получить наибольший выход ДНК из образца;
- Высокая степень очистки достигается благодаря оптимизированному составу компонентов лизирующего и промывочных растворов;
- Чистота выделенной ДНК составляет 1,8-1,9 по соотношению A260/A280;
- Выделение ДНК на колонках существенно уменьшает расход дополнительного пластика;
- Отсутствие токсичных реагентов (фенол, хлороформ и т.д.)

Одним из недостатков колоночного метода выделения ДНК является сложность получения неповрежденных длинных молекул ДНК, он рекомендуется для выделения молекул не более 50 тысяч п.н. Для анализа более крупных молекул подойдут наборы для выделения ДНК в растворе - более специализированные и сложные в использовании комплекты реагентов.

Для выделения ДНК колоночным методом можно использовать коммерческий набор PureLink Genomic DNA Mini Kit (рисунок 6). Набор позволяет выделять геномную ДНК из крови, тканей, клеток, слюны, бактерий, мазков и пятен крови, формалин-фиксированных парафиновых тканей.



Рисунок 6 – Набор для ручного выделения ДНК «Pure Link Genomic DNA Kits»

Выделение ДНК с использованием коммерческого набора «Pure Link Genomic DNA Kits»

Состав набора:

- колонки PureLink® Spin Column;
- сборные трубки;
- пробирки 1.5 мл;
- протеиназа К;
- РНКазы А;
- лизирующий раствор;
- промывочный буфер 1;
- промывочный буфер 2;
- элюирующий раствор.

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, водяная баня либо твердотельный термостат для микропробирок, микроцентрифуга для микропробирок (скорость вращения не менее 10000 об/мин), вортекс (прибор для встряхивания и перемешивания, дозаторы с переменным объемом: 10-100 мкл и 200-1000 мкл), пробирки типа «Eppendorf» 1.5 мл, штативы для микропробирок, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Установить водяную баню или термостат при температуре 55 ° С.
2. Добавить 200 мкл крови в микропробирки Pure Link с фильтром, при этом на дозаторы лучше надевать наконечники с фильтром, так как кровь может содержать посторонние примеси.
3. Добавить 20 мкл протеиназы К в образец для лизирования клетки.
4. Добавить 20 мкл РНКазы А, смешать, инкубировать 2 минуты при комнатной температуре.

5. Добавить 200 мкл лизирующего раствора и хорошо перемешать на вортексе, чтобы получить гомогенный раствор.
 6. Инкубировать при 55 ° С в течение 10 минут.
 7. Добавить 200 мкл 96-100% этанола в лизат и хорошо перемешать.
 8. Извлечь колонку PureLink® Spin Column в сборную трубку из упаковки.
 9. Добавить лизат (~ 640 мкл) в колонку PureLink®.
 10. Центрифугировать колонку при 10000 об/мин в течение 1 минуты при комнатной температуре.
 11. Удалить сборную трубку и поместить спин-колонку в чистую сборную трубку.
 12. Добавить 500 мкл промывочного буфера 1, центрифугировать 1 минуту при 10000 об/мин.
 13. Удалить сборную трубку и поместить спин-колонку в чистую сборную трубку.
 14. Добавить 500 мкл промывочного буфера 2 центрифугировать на максимальной скорости 3 минуты.
 15. Удалить сборную трубку и поместить спин-колонку в стерильную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.
 16. Добавить 50 мкл элюирующего раствора, пробирку инкубировать 1 мин. при комнатной температуре. Центрифугировать при максимальной скорости 1 минуту. Пробирка содержит очищенную геномную ДНК.
- Если исследования с ДНК будут продолжены непосредственно после выделения, очищенную ДНК хранят в холодильнике при температуре 4 °С. Для более продолжительного хранения ДНК необходимо заморозить при температуре 20 °С.

Выделение ДНК методом осаждения на магнитных частицах.

Использование магнитных твёрдых носителей в биохимических и молекулярно-биологических процессах имеет ряд преимуществ по сравнению с другими немагнитными методами выделения нуклеиновых кислот. Основной принцип заключается в том, что частицы, обладающие магнитным моментом, могут быть извлечены из раствора при наложении магнитного поля, например, при использовании постоянного магнита. Данный метод является быстрым, простым и эффективным для разделения частиц после связывания с нуклеиновыми кислотами или на стадии элюирования. Таким же образом можно изолировать компоненты разрушенных клеток, которые ингибируют ДНК-полимеразу в ПЦР. Основными ингибиторами ПЦР являются ионы кальция, полисахариды, фенольные соединения, гумусовые вещества, белки (коллаген, гемоглобин, иммуноглобулин) [305]. Ингибиторы могут находиться в биологическом материале, а могут быть добавлены в процессе обработки образца или выделения нуклеиновой кислоты. Такими веществами могут быть порошок из перчаток [305], различные соли (например, хлориды натрия и

калия), а также органические молекулы (например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), этанол, изопропиловый спирт или фенол) [306].

Материалы для изготовления магнитных частиц различны: синтетические полимеры, пористое стекло или магнитные частицы из неорганических магнитных материалов, например, поверхностно-модифицированный оксид железа. Особенно популярными являются суперпарамагнитные частицы, которые не взаимодействуют между собой в отсутствии магнитного поля. Данные частицы будут магнититься только в магнитном поле, а после удаления из него будут терять магнетизм.

Для автоматического выделения нуклеиновых кислот используются магнитные частицы со стеклянным покрытием [307]. Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации, его можно воспроизвести на роботизированных пипеттирующих рабочих станциях. Однако возможны потери продукта вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце [308].

Преимуществами автоматического выделения нуклеиновых кислот являются высокая скорость выделения нуклеиновых кислот, по сравнению с другими данный метод является менее трудоемким, высокие выход и чистота продукта, достоверность результата за счет исключения ошибок, связанных с человеческим фактором.

Выделение ДНК методом осаждения на магнитных частицах можно провести с помощью автоматизированной системы для выделения нуклеиновых кислот из клеток Automate Express DNA extraction system (рисунок 7), используя набор реагентов Charge Switch Forensic DNA Purification Kit (Life technologies, Invitrogen (рисунок 8)).



Рисунок 7 – Автоматизированная система для выделения нуклеиновых кислот из клеток Automate Express DNA extraction system



Рисунок 8 – Набор для автоматического выделения нуклеиновых кислот Charge Switch Forensic DNA Purification Kit

Выделение ДНК на автоматизированной системе Automate Express DNA extraction system коммерческим набором Charge Switch Forensic DNA Purification Kit

Состав набора:

- лизирующий буфер;
- протеиназа К;
- картриджи;
- наконечники;
- элюирующие пробирки;
- пробирки 1,5 мл.

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, водяная баня либо твердотельный термостат для микропробирок, вортекс (прибор для встряхивания и перемешивания), дозаторы с переменным объемом: 10-100 мкл и 200-1000 мкл), пробирки типа «Eppendorf» 1.5 мл, штативы для микропробирок, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Установить водяную баню или термостат при температуре 55 ° С.
2. Подготовка лизис-микса: на каждый образец смешать 1 мл лизирующего буфера и 10 мкл протеиназы К.
3. Добавить 1 мл лизис-микса в пробирку.
4. Добавить биоматериал к лизис-миксу, убедившись, что образцы были полностью погружены в смесь; перемешивать в течение 10-15 секунд.
5. Инкубировать образцы в течение одного часа при температуре 55 ° С.
6. Удалить нерастворившийся материал одноразовым пинцетом или переместить лизат в новую пробирку.

7. Запустить автоматизированную систему Automate Express DNA extraction system, включив кнопку питания.

8. Открыть дверцу инструмента (нажав на дверь); затем снять стойку для картриджа.

9. Загрузить картридж в стойку так, чтобы он защелкнулся. Необходимо убедиться в том, что выемки в картридже совпадают с вырезами в стойке для картриджей. Если необходимо обработать менее 13 образцов, можно оставить пустые слоты в стойке.

10. Загрузить пробирки с элюирующим раствором и пробирки для ДНК в стойку:

- загрузить первый ряд (обозначенный как E) элюирующими пробирками;
- второй ряд (обозначенный как T1) оставить пустым;
- загрузить третий ряд (обозначенный как T2) наконечниками iPrep™;
- загрузить четвертый ряд (обозначенный как S) пробирками без колпачков, содержащих лизат (~ 1 мл).

Если необходимо обработать менее 13 образцов, наконечники и пробирки загружают в тех же положениях, что и картриджи.

11. Вставить стойку с картриджами, а также стойку с наконечниками с пробирками в прибор Automate Express DNA extraction system. Закрыть дверцу инструмента.

12. Нажать «Пуск» на главном экране.

13. Убедиться, что отображается имя используемого набора реагентов Charge Switch Forensic DNA Purification Kit.

14. Следовать инструкциям на экране, затем нажать «Старт».

15. В конце прогона инструмент подаст короткий звуковой сигнал.

16. Открыть дверцу инструмента. Удалить и закрыть элюирующие пробирки, содержащие очищенную нуклеиновую кислоту.

Если исследования с ДНК будут продолжены непосредственно после выделения, очищенную ДНК хранят в холодильнике при температуре 4 °С. Для более продолжительного хранения ДНК необходимо заморозить при температуре 20 °С.

Контрольные вопросы

1. Каковы принципы отбора биологического материала?

2. Порядок взятия крови крупного рогатого скота.

3. Каковы основные этапы выделения и очистки нуклеиновых кислот при использовании колоночного метода?

4. Заполнить таблицу «Методы выделения ДНК»

Метод выделения	Этапы выделения	Преимущества метода	Недостатки метода

5. Выделить ДНК из крови крупного рогатого скота колоночным методом.

3.2 Качественная и количественная оценка ДНК

Измерение концентрации нуклеиновых кислот является рутинной практикой во многих молекулярно-биологических лабораториях. Определение концентрации и качества препарата нуклеиновых кислот – один из ключевых начальных шагов в экспериментах, включающих ПЦР, секвенирование и др. Для оценки качества и концентрации нуклеиновых кислот в лабораторной практике используют качественные и количественные методы.

Качественный метод оценки концентрации нуклеиновых кислот основан на проведении электрофоретического разделения в агарозном геле препарата нуклеиновой кислоты и контрольного образца с известной концентрацией (например, коммерческий маркер размерности ДНК). При этом для более точного определения количества нуклеиновой кислоты используют стандартное разведение контрольного образца. Качество ДНК оценивается по наличию четкого, или не четкого бэнда или его отсутствию. При отсутствии деградации ДНК выявляют четкую дискретную полосу. При наличии деградации той или иной степени на дорожке наблюдают несколько фрагментов ДНК различной молекулярной массы. При недостаточной очистке препарата ДНК от белковых фракций, на электрофореграмме наблюдается «шмер» ниже расположения полосы, соответствующей ДНК.

Достоинством этого метода является то, что кроме оценки наличия и концентрации выделенной ДНК имеется возможность установить величину фрагментов выделенной ДНК, т.е. оценить степень ее деградации. К недостаткам метода следует отнести относительно невысокую чувствительность метода, кроме того, при выделении ДНК из объектов, загрязненных бактериальной микрофлорой, не представляется возможным отличить ДНК животного от бактериальной ДНК, что может привести к ошибочному занижению количества ДНК, вносимого в реакционную смесь при постановке реакции амплификации, и соответственно к неудовлетворительному результату.

Проведение электрофореза на агарозном геле

Необходимые реактивы: агароза, ТБЕ-буфер, дистиллированная вода, краска для электрофореза

Необходимое оборудование и материалы: микроволновая печь, камера для горизонтального электрофореза, заливочный столик с гребенками, источник тока, трансиллюминатор для агарозно-этидиевых гелей, дозаторы с переменным объемом 2-10 мкл, наконечники для дозаторов объемом 2-10 мкл, мерный стакан объемом 100 мл, лента лабораторная «Parafilm M», спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Приготовить 10 %-ный раствор ТБЕ-буфера. Для этого в мерный стакан на 100 мл налить 90 мл дистиллированной воды, добавить туда 10 мл ТБЕ-буфера и хорошо перемешать.

2. Приготовить агарозу. К готовому раствору ТБЕ буфера добавить 0,5-1,5 г агарозы и перемешать. Гель варить в микроволновой печи при мощности 500 В – 1 мин (Не использовать фольгу в качестве крышки для стакана!!!) или на водяной бане, на плитке до полного растворения крупинки агарозы. При этом не допускается перегревание и закипание раствора.

3. Остудить гель до 60–50°C, добавить 8 мкл краски и залить в заливочную форму (как правило, размер геля 15×10 см), использовать гребенку, которая формирует карман объемом до 20 мкл.

4. Подготовить пробы ДНК – на ленту «Parafilm M», нанести 2 мкл красителя, к каплям красителя добавить 5 мкл ДНК, перемешать пипетированием.

5. После застывания геля пробы нанести в отдельные карманы. В одну лунку для контроля качества выделенной ДНК вносят маркер молекулярной массы «pGEM DNAmarker». Электрофорез проводить 15 мин при 80-100 В.

6. Рассмотреть гель с помощью трансиллюминатора в УФ-свете

В случае успешного проведения работы в трансиллюминаторе в УФ-лучах (290–330 нм) на электрофореограмме можно будет увидеть дорожки с продуктом гидролиза ДНК. Не включать трансиллюминатор без закрытого защитного щитка или очков во избежание ожога роговицы глаз.

Количественный (спектрофотометрический) метод оценки концентрации нуклеиновых кислот основан на их способности поглощать ультрафиолетовый свет при определенной длине волны. Белки и нуклеиновые кислоты поглощают свет в ультрафиолетовом спектре в пределах длин волн между 210 и 300 нм. Для определения количества ДНК или РНК измеряют поглощение раствора в областях с длинами волн 260 и 280 нм. Для оценки качества (содержания примесей) препарата нуклеиновых кислот используют отношение A_{260}/A_{280} , которое для чистого препарата ДНК приблизительно равно 1,8, а для РНК – примерно 2,0. Важно отметить тот факт, что примеси РНК в растворе ДНК не могут быть выявлены методом спектрофотометрии.

Современные спектрофотометры рассчитывают концентрацию нуклеиновых кислот автоматически с использованием специального программного обеспечения. В настоящее время существуют как обычные кюветные, так и спектрофотометры для микрообъемов, позволяющие проводить измерения в объемах 0,5-2,0 мкл. При этом измерение производится непосредственно в капле жидкости, которую наносят на неподвижный модуль прибора. Сверху на каплю опускают подвижный модуль прибора, в результате чего из образца формируется столбик жидкости между подвижным и

неподвижным модулями. Прибор измеряет поглощение света в столбике образца.

Измерение концентрации ДНК с помощью спектрофотометра Dynamica Halo DNAmaster

Необходимые реактивы: пробы ДНК, элюирующий раствор

Необходимое оборудование и материалы: спектрофотометр Dynamica Halo DNAmaster, дозаторы с переменным объемом (1–10 мкл), наконечники для дозаторов (1–10 мкл), безволокнистые тампоны или салфетки, спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Включить прибор, выбрать необходимый режим измерения с помощью кнопок на экране.

2. Выбрать необходимую крышку для кюветы. Измерение ДНК проводят с кюветой 1 мм (factor 10) – для измерения концентрации ДНК в пределах от 13 до 850 нг/мкл или с кюветой 0,2 мм (factor 50) – для измерения концентрации ДНК в пределах от 63 до 4250 нг/мкл.

3. Перед измерением концентрации ДНК необходимо на кювету нанести 4 мкл элюирующего раствора. Кювету закрыть крышкой, установить в держатель. На приборе нажать кнопку «Zero».

4. Остаток раствора на кювете убрать при помощи безволокнистых тампонов или салфеток.

5. Нанести на кювету 4 мкл образца ДНК, закрыть крышкой, установить в держатель. На приборе нажать кнопку «Read». На экране прибора будет выдана концентрация ДНК в нг/мкл и чистота (A260/280).

6. Остаток раствора на кювете убрать при помощи безволокнистых тампонов или салфеток.

7. Повторить пункт 5 с другим образцом. При определении концентрации большого количества образцов ДНК результаты необходимо периодически сбрасывать элюирующим раствором (например, после каждого 5-го измерения).



Рисунок 9 - Спектрофотометр Dynamica Halo DNAmaster

Измерение концентрации ДНК с помощью Qubit® 3.0 Fluorometer

Необходимые реактивы: пробы ДНК, стандарты № 1 и № 2 для проведения анализа на Qubit, буфер для проведения анализа на Qubit, реагент для проведения анализа на Qubit.

Необходимое оборудование и материалы: Qubit® 3.0 Fluorometer, вортекс, микропробирки 0.5 мл, дозаторы с переменным объемом (1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1.5 мл, штативы для микропробирок, спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Приготовить смесь для определения концентрации ДНК. Рассчитать необходимое количество реактивов по формулам:
 - N образцов ДНК + 2 (мкл) – для реагента Qubit;
 - (N образцов ДНК + 2)*199 – для буфера Qubit.
2. Перемешать буфер с реагентом на вортексе.
3. В пробирку добавить 190 мкл готовой смеси и 10 мкл стандарта № 1. Перемешать на вортексе.
4. В пробирку добавить 190 мкл готовой смеси и 10 мкл стандарта № 2. Перемешать на вортексе.
5. В пробирку добавить 190 мкл готовой смеси и 10 мкл образца ДНК. Перемешать на вортексе.
6. Далее на Qubit, пошагово следуя инструкции на приборе, определить концентрацию ДНК для каждого образца. Включить прибор, → выбрать тип измеряемых молекул ДНК и набор (HS/BR); → провести калибровку (New calibration), → внести в прибор стандарт 1, затем стандарт 2, → далее измерить образцы, для расчета концентрации в исходном образце, необходимо указать

количество внесенного образца.



Рисунок 10 – Прибор для определения концентрации ДНК Qubit® 3.0 Fluorometer

Контрольные вопросы:

1. В чем принцип метода спектрофотометрического определения концентрации нуклеиновых кислот?
2. При какой длине волны оценивают концентрацию ДНК спектрофотометрическим методом: а) 260нм и 280нм; б) 280нм и 300нм; в) 180нм и 280нм; г) 200нм и 350нм.
3. Какая масса агарозы необходима для приготовления 150 мл 2.5%-ного геля?
4. Приготовить 1 % агарозный гель для проведения гель-электрофореза. Растворить 1 г агарозы в 99 мл 1хТВЕ (1 % гель). Нагреть до 100 °С для растворения агарозы, постоянно перемешивая раствор, и медленно охладить до 40–50 °С. Добавить в раствор агарозы бромистый этидий. Затем с помощью специальной кюветы и гребенки сформировать гель с лунками.
5. Определить качество выделенной ДНК методом электрофореза.

3.3 Проведение ПЦР-ПДРФ для генов молочных белков

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом является стандартным анализом точковых мутаций для диагностики аллельного полиморфизма генов-кандидатов, связанных с продуктивными качествами сельскохозяйственных животных. По длине фрагментов (ПДРФ) делают вывод об отсутствии или наличии точковой мутации, а также о гомозиготности или гетерозиготности особи [309].

Метод ПЦР-ПДРФ дал возможность идентифицировать генотипы белков молока на ранних стадиях развития животного, что значительно ускоряет решение некоторых актуальных задач современной селекции. Использование ПЦР облегчает процедуру анализа и открывает возможность массовых исследований ДНК сельскохозяйственных животных и проведения

практической селекции на уровне генотипов. Преимущество генной диагностики объясняется тем, что она базируется непосредственно на анализе наследственной информации, лежащей в основе того или иного признака [310].

Широкое применение метода ПЦР ускорило и упростило диагностику точковых мутаций, которые являются причиной полиморфизма большинства генов белков молока. Высокая чувствительность метода позволяет определить аллели, различающиеся заменой лишь одного полиморфизма большинства генов белков молока [310].

3.3.1 Постановка ПЦР-ПДРФ для гена каппа-казеина (*bCSN3*)

Проведение амплификации гена каппа-казеина *bCSN3*

Необходимые реактивы: пробы ДНК, буферный раствор, деионизированная вода, хлорид магния, Taq-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), праймеры для исследуемого участка гена *bCSN3*.

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, холодильник с морозильной камерой на -20°C , амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Для установления генотипов крупного рогатого скота по локусу каппа-казеина используют следующие праймеры [311]:

VAR5: 5'-atagccaaatatatcccaattcag t-3';

VAR3: 5'-tttattaataagtccatgaatctt g-3'.

2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР. Смесь без ДНК матрицы приготовить в одной пробирке и затем аликвотировать по индивидуальным.

На 1 реакцию понадобится 18,5 мкл реакционной смеси. Необходимо взять:

- 0,5 мкл смеси dNTP;
- 2 мкл реакционного буфера;
- 1,5 мкл прямого и 1,5 мкл обратного праймеров;
- 1,8 мкл хлорида магния;
- 0,3 мкл Taq-полимеразы;
- 10,9 мкл деионизированной воды.

Перемешать все компоненты. Taq-полимеразу добавить в последнюю очередь, вынув ее из морозильной камеры холодильника и поместив на лед.

3. Полученную реакционную смесь раскапать в подготовленные пробирки.

4. Добавить в каждую пробирку, кроме пробирки с отрицательным контролем, по 1,5 мкл матричной ДНК.

5. Поместить пробирки в амплификатор и запустить соответствующий режим, который должен соответствовать праймерам, используемым в реакции.

Режим амплификации:

1. 95°C – 5 мин;

2. 94°C – 60 с;

3. 58°C – 60 с;

4. 72°C – 60 с;

5. Стадии 2–4 повторяются 35 раз;

6. 72°C – 5 мин.

6. Если образцы не анализируются сразу после окончания амплификации, их следует поместить в холодильник на –20°C.

Рестрикционный анализ гена каппа-казеина *bCSN3*

Необходимые реактивы: амплификат, рестриктаза HindIII, рестрикционный буфер «W» с добавлением BSA (СибЭнзим, Россия), бидистиллированная вода, 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™, раствор с красителями для нанесения образцов на гель), раствор бромистого этидия, маркер молекулярных масс 50 п.н., агароза, 10×ТБЕ буфер.

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, камера для электрофореза, заливочный столик с гребенками, микроволновая печь или плитка, источник тока, трансиллюминатор для агарозно-этидиевых гелей, холодильник с морозильной камерой на –20°C, амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), мерный стакан (100 мл – 1 шт., 1000 мл – 1 шт.), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, лента лабораторная «Parafilm M», спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Обработать 10 мкл полученного амплификата 20 ед. эндонуклеазой рестрикции HindIII в 1хбуфере «W» с добавлением BSA (СибЭнзим, Россия).

2. Полученную смесь перемешать на вортексе и инкубировать в термостате в течение 8 часов при 37°C. Все операции проводить на лабораторном столе,

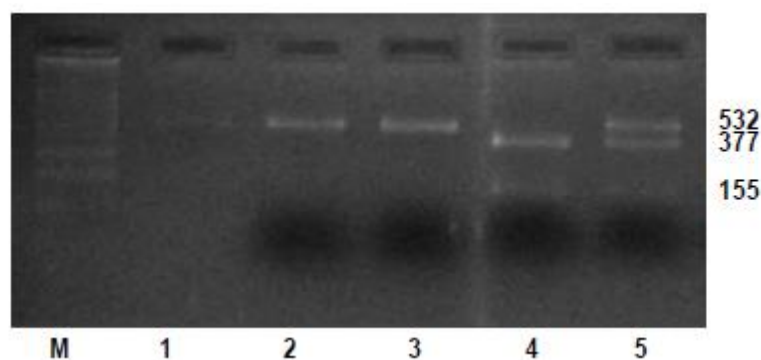
ферменты либо поместить в лед, либо кратковременно извлекать из морозильной камеры.

3. Приготовить 2%-ный агарозный гель для проведения электрофореза.

4. Нанести на гель рестрицированные образцы, маркер молекулярных масс.

5. Рассмотреть гель с помощью трансиллюминатора в УФ-свете.

Фрагменты разделяются в 2% агарозном геле и визуализируются в УФ после окрашивания бромистым этидием (рисунок 11).



М- маркер молекулярного веса;

1, 2, 3 –генотипы АА;

4 - генотип ВВ;

5 – генотип АВ;

Рисунок 11 - Результаты рестрикции амплификатов с использованием эндонуклеазы *Hind*III.

Аллель А не имеет сайта рестрикции, поэтому после рестрикции А – аллелей изначальный ПЦР продукт остается неизменным (рис. 1). Аллель В имеет сайт рестрикции для рестриктазы *Hind*III, поэтому в результате рестрикции образуются два фрагмента: 377 и 155 п.н. Присутствие в образце трех фрагментов свидетельствует о гетерозиготном генотипе АВ (рис. 1).

Контрольные вопросы

1. Из каких компонентов состоит реакционная смесь?

2. Составьте реакционную смесь по гену каппа-казеина *bCSN3*, которая готовится в объеме 18,5 мкл и содержит 2 мкл 1хTaq-буфера, 0,5 мкл дНТФ (dNTP's), 1,8 мкл $MgCl_2$, 1,5 мкл каждого праймера, 0,3 мкл Taq-полимеразы, 0,5 мкл геномной ДНК.

3. Проведите постановку ПЦР, используя программу: «горячий старт» – 5 минут при 95 °С; 35 циклов: денатурация – 60 секунд при 94 °С, отжиг – 60 секунд при 58 °С, синтез – 1 минута при 72 °С; достройка – 5 минут при 72 °С.

4. Приготовьте 2 % агарозный гель для проведения гель-электрофореза: – растворите 2 г агарозы в 100 мл 10 %-ном растворе 1хTBE. Нагрейте до 100 °С для растворения агарозы, постоянно перемешивая раствор, и медленно охладите до 40–50 °С. Добавьте в раствор агарозы бромистый этидий. Затем с помощью специальной кюветы и гребенки сформируйте гель с лунками.

5. Проведите визуализацию амплификата по гену каппа-казеина *bCSN3* методом горизонтального электрофореза. Детекция результатов амплификации по гену *bCSN3*: 8 мкл продукта амплификации + 0,5 мкл красителя раскapat в 2 % агарозный гель (110 W, 30–35 мин.). Длина амплифицированного фрагмента: 532 п.н. Для электрофореза используется 1хTBE буфер. Визуализация и анализ результатов осуществляются на системе гель-документации.

3.3.2 Постановка ПЦР-ПДРФ для гена альфа-лактальбумина (*bLALBA*)

Проведение амплификации гена альфа-лактальбумина (*bLALBA*)

Необходимые реактивы: пробы ДНК, буферный раствор, деионизированная вода, хлорид магния, Taq-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), праймеры для исследуемого участка гена *bLALBA*.

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, холодильник с морозильной камерой на –20°С, амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Для установления генотипов крупного рогатого скота по локусу альфа-лактальбумина используют следующие праймеры

ALF-LAC1: 5'- aagagttggatggaatcacc -3';

ALF-LAC2: 5'- ttcaaattgctggcatcaagc -3' [52].

2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР. Смесь без ДНК матрицы приготовить в одной пробирке и затем аликвотировать по индивидуальным.

На 1 реакцию понадобится 20 мкл реакционной смеси. Необходимо взять:

– 2 мкл смеси dNTP;

– 2 мкл реакционного буфера;

- 1 мкл прямого и 1 мкл обратного праймеров;
- 2 мкл хлорида магния;
- 0,4 мкл Таq-полимеразы;
- 10,9 мкл деионизованной воды.

Перемешать все компоненты. Таq-полимеразу добавить в последнюю очередь, вынув ее из морозильной камеры холодильника и поместив на лед.

3. Полученную реакционную смесь раскапать в подготовленные пробирки.

4. Добавить в каждую пробирку, кроме пробирки с отрицательным контролем, по 2 мкл матричной ДНК.

5. Поместить пробирки в амплификатор и запустить соответствующий режим, который должен соответствовать праймерам, используемым в реакции.

Режим амплификации:

1. 94°C – 5 мин;
2. 94°C – 60 с;
3. 63°C – 60 с;
4. 72°C – 60 с;
5. Стадии 2–4 повторяются 30 раз;
6. 72°C – 10 мин.

6. Если образцы не анализируются сразу после окончания амплификации, их следует поместить в холодильник на –20°C.

Рестрикционный анализ гена альфа-лактальбумина (*bLALBA*)

Необходимые реактивы: амплификат, рестриктаза Sdu1, 10х рестрикционный буфер, бидистиллированная вода, 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™, раствор с красителями для нанесения образцов на гель), раствор бромистого 10 мг/мл этидия, маркер молекулярных масс 50 п.н. DNA Ladder (Fermentas), агароза, 10×ТБЕ буфер

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, камера для электрофореза, заливочный столик с гребенками, микроволновая печь или плитка, источник тока, трансиллюминатор для агарозно-этидиевых гелей, холодильник с морозильной камерой на –20°C, амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), мерный стакан (100 мл – 1 шт., 1000 мл – 1 шт.), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, лента лабораторная «Parafilm M», спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. В реакционную смесь общим объемом 20 мкл вносят 2мкл 10х буфера для рестриктазы Sdu1, 1 мкл фермента Sdu1, 8 мкл амплификата. Объем смеси доводят бидистиллированной водой до 20 мкл.

2. Полученную смесь перемешать на вортексе и инкубировать в термостате в течение 8 часов при 37°C. Все операции проводить на лабораторном столе, ферменты либо поместить в лед, либо кратковременно извлекать из морозильной камеры.

3. Приготовить 2%-ный агарозный гель для проведения электрофореза.

4. Нанести на гель рестриктированные образцы, маркер молекулярных масс. Продукты рестрикции разделить в готовом агарозном геле в течение 2-х часов при напряжении 40 В.

5. Рассмотреть гель с помощью трансиллюминатора в УФ-свете

После рестрикции эндонуклеазой Sdu1 полученных амплификатов на электрофореграмме наблюдается следующая картина: наличие двух полос размером 328 и 102 п.н. соответствует генотипу AA; четырех полос размером 328, 211, 117 и 102 п.н. - генотипу АВ, трех полос размером 211, 117 и 102 п.н. - генотипу ВВ (Рисунок 12).

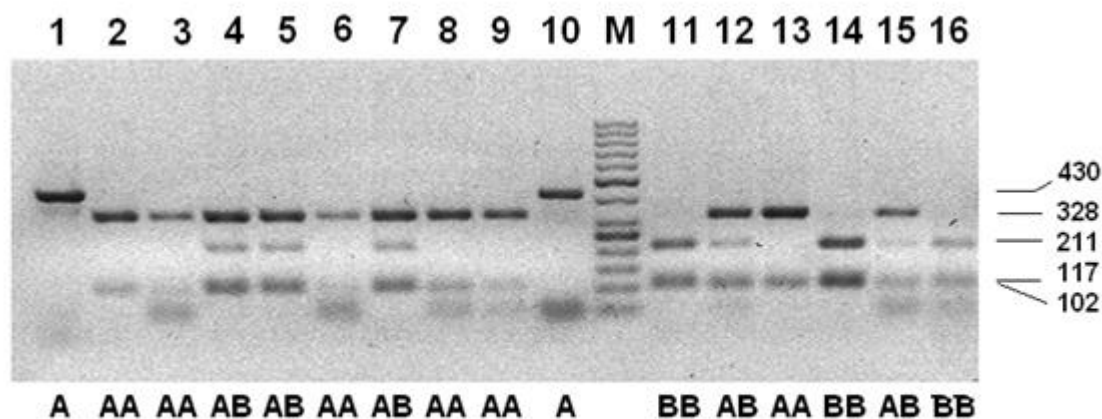


Рисунок 12 - ПЦР-ПДРФ анализ вариантов гена альфа-лактальбумина крупного рогатого скота

Контрольные вопросы

1. Каковы основные условия проведения рестрикции?
2. Из каких этапов состоит цикл ПЦР?
3. Составьте реакционную смесь по гену альфа-лактальбумина (bLALBA), которая готовится в объеме 20 мкл и содержит 2 мкл реакционного

буфера, 2 мкл дНТФ (dNTP's), 2 мкл MgCL₂, 1 мкл каждого праймера, 0,4 мкл Taq-полимеразы, 2 мкл геномной ДНК.

4. Проведите постановку ПЦР, используя программу: «горячий старт» – 5 минут при 94°C; 30 циклов: денатурация – 1 минута при 94°C, отжиг – 1 минута при 63°C, синтез – 1 минута при 72°C; достройка – 10 минут при 72°C.

5. Какой длиной фрагменты образуются после обработки амплификата гена bLALBA рестриктазой Sdu1?

3.3.3 Постановка ПЦР-ПДРФ для гена бета-лактоглобулина (*βLG*)

Проведение амплификации гена бета-лактоглобулина (*βLG*)

Необходимые реактивы: пробы ДНК, 10х ПЦР-буфер, деионизированная вода, хлорид магния, Taq-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), праймеры для исследуемого участка гена *βLG*.

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, холодильник с морозильной камерой на –20°C, амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Для установления генотипов крупного рогатого скота по локусу бета-лактоглобулина используют следующие праймеры

LG5a: 5'-ctattgtcctcgtagaggaagc-3';

LG3a: 5'-agaaagccctggataagcagcc-3' [67].

2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР. Смесь без ДНК матрицы приготовить в одной пробирке и затем аликвотировать по индивидуальным.

На 1 реакцию понадобится 20 мкл реакционной смеси. Необходимо взять:

- 2 мкл смеси dNTP;
- 2 мкл 10х ПЦР-буфера;
- 1 мкл прямого и 1 мкл обратного праймеров;
- 2 мкл хлорида магния;
- 0,4 мкл Taq-полимеразы;
- 10,9 мкл деионизованной воды.

Перемешать все компоненты. Taq-полимеразу добавить в последнюю очередь, вынув ее из морозильной камеры холодильника и поместив на лед.

3. Полученную реакционную смесь раскапать в подготовленные пробирки.

4. Добавить в каждую пробирку, кроме пробирки с отрицательным контролем, по 2 мкл матричной ДНК.

6. Поместить пробирки в амплификатор и запустить соответствующий режим, который должен соответствовать праймерам, используемым в реакции.

Режим амплификации:

1. 94°C – 5 мин;

2. 95°C – 60 с;

3. 59°C – 50 с;

4. 72°C – 50 с;

5. Стадии 2–4 повторяются 30 раз.

6. 72°C – 5 мин.

7. Если образцы не анализируются сразу после окончания амплификации, их следует поместить в холодильник на –20°C.

Рестрикционный анализ гена бета-лактоглобулина (*βLG*)

Необходимые реактивы: амплификат, рестриктазы PvuII и PstI, 10x рестрикционный буфер, бидистиллированная вода, 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™, раствор с красителями для нанесения образцов на гель), раствор бромистого 10 мг/мл этидия, маркер молекулярных масс 50 п.н. DNA Ladder (Fermentas), агароза, 10×ТБЕ буфер

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, камера для электрофореза, заливочный столик с гребенками, микроволновая печь или плитка, источник тока, трансиллюминатор для агарозно-этидиевых гелей, холодильник с морозильной камерой на –20°C, амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), мерный стакан (100 мл – 1 шт., 1000 мл – 1 шт.), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, лента лабораторная «Parafilm M», спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Для идентификации аллелей гена бета-лактоглобулина продукты ПЦР разделяли на две аликвоты и обрабатывали рестрикционными энзимами PvuII и PstI.

2. В реакционную смесь общим объемом 20 мкл вносят 2 мкл 10x буфера для рестриктазы PvuII (PstI), 1 мкл фермента PvuII (PstI), 8 мкл амплификата. Объем смеси доводят бидистиллированной водой до 20 мкл.

3. Полученную смесь перемешать на вортексе и инкубировать в термостате в течение 8 часов при 37°C. Все операции проводить на лабораторном столе,

фрагменты либо поместить в лед, либо кратковременно извлекать из морозильной камеры.

4. Приготовить 2%-ный агарозный гель для проведения электрофореза.

5. Нанести на гель рестрицированные образцы, маркер молекулярных масс. Продукты рестрикции разделить в готовом агарозном геле в течение 2-х часов при напряжении 40 В.

6. Рассмотреть гель с помощью трансиллюминатора в УФ-свете.

Рестриктаза *RvuII* позволяет выявить варианты А, В и D гена бета-лактоглобулина, а рестриктаза *PstI* – вариант С. Наличие двух специфических фрагментов рестрикции по *RvuII* длиной 774 и 474 п.н. соответствует аллелю А. Точковая мутация в нуклеотидной последовательности варианта В обуславливает образование дополнительного сайта рестрикции *RvuII* и приводит к образованию трех специфических для аллеля В фрагментов длиной 774, 297 и 177 п.н. Результатом нуклеотидной замены в аллеле D гена бета-лактоглобулина является образование еще одного специфического для *RvuII* сайта, и как следствие, - появление четырех рестрикционных фрагментов длиной 563, 297, 211 и 177 п.н.

Рестрикция с использованием эндонуклеазы *PstI* позволяет диагностировать аллель С гена бета-лактоглобулина. В нуклеотидной последовательности варианта С имеется лишь один общий для всех аллелей сайт узнавания *PstI*, в то время как в вариантах А, В и D присутствует дополнительный рестрикционный сайт для эндонуклеазы *PstI*. При гидролизе по *PstI* последовательности варианта С в геле визуализируются два фрагмента длиной 182 п.н. и 1066 п.н., в то время как при гидролизе аллелей А, В и D помимо общего фрагмента длиной 179 п.н. образуются два специфических фрагмента длиной 896 и 170 п.н. (рисунок 13)

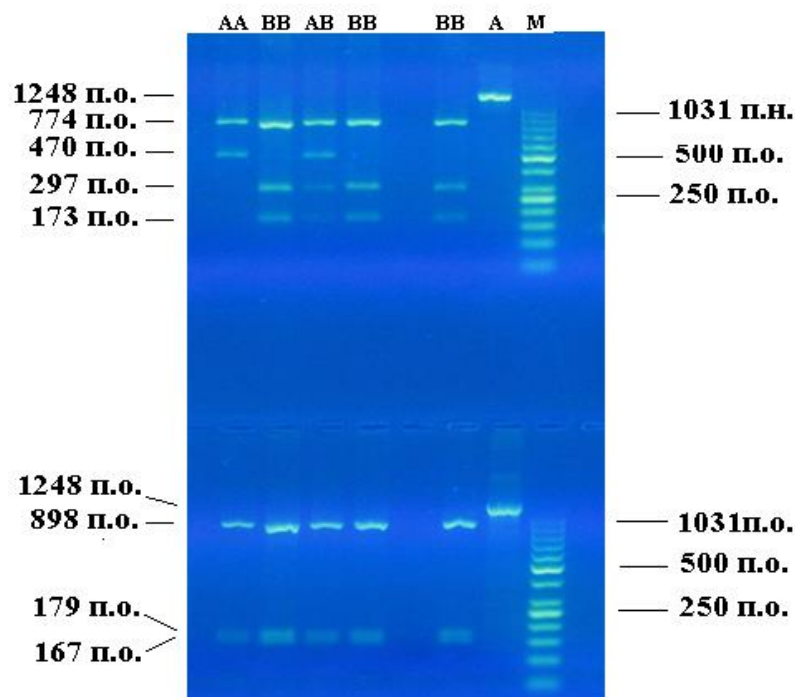


Рисунок 13 - ПЦР-ПДРФ анализ вариантов гена бета-лактоглобулина крупного рогатого скота

На рисунке 14 приведена схема ПЦР анализа гена бета-лактоглобулина крупного рогатого скота с указанием длин образующихся фрагментов в зависимости от генотипа животных [53].

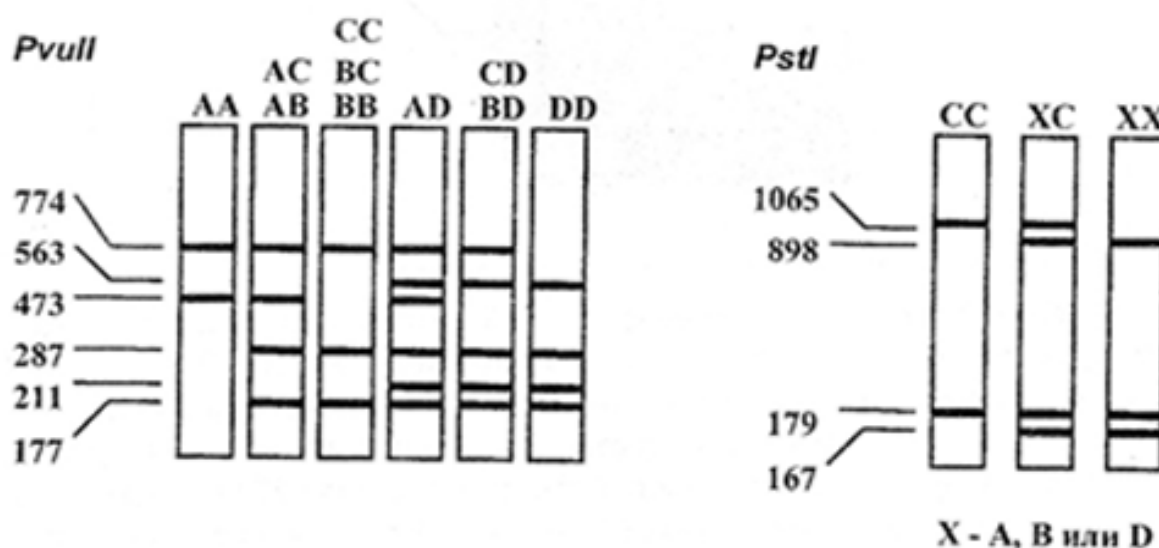


Рисунок 14 - Схема распределения рестрикционных фрагментов в зависимости от генотипа по бета-лактоглобулину

Контрольные вопросы

1. Составьте реакционную смесь по гену бета-лактоглобулина (βLG), которая готовится в объеме 20 мкл и содержит 2 мкл 10х буфера, – 2 мкл $MgCl_2$, – 2 мкл дНТФ (dNTP's), 1 мкл каждого праймера, 0,4 мкл Taq-полимеразы, 2 мкл геномной ДНК.
2. Проведите постановку ПЦР, используя программу: горячий старт – 5 мин при 94°C; 30 циклов: денатурация – 1 минута при 95°C; отжиг – 50 секунд при 59°C; синтез – 50 секунд при 72°C; достройка – 5 мин при 72°C.
3. Проведите визуализацию амплификата по гену бета-лактоглобулина (βLG) методом горизонтального электрофореза. Детекция результатов амплификации по гену бета-лактоглобулина: 8 мкл продукта амплификации + 0,5 мкл бромфенол голубого, раскапать в 1,5% агарозный гель ($V=110$, 30-35 мин.).
4. Проведите рестрикцию амплифицированного участка гена βLG . Для рестрикции амплифицированного участка гена βLG используют эндонуклеазы $RvuII$ и $PstI$. Реакцию проводят при температуре 37 °C. Продукты рестрикции гена разделяют электрофоретически в 2 % агарозном геле в TBE буфере с использованием бромистого этидия при напряжении 40 В в течение двух часов.
5. Какие фрагменты гена βLG образовались после рестрикции?

3.4 Проведение ПЦР-ПДРФ для генов соматотропинового каскада

Мясное скотоводство является перспективной отраслью животноводства и важным резервом увеличения производства высококачественного мяса говядины. Для успешного его развития необходимо проводить углублённую селекционную работу с учётом современных достижений генетики. При этом следует иметь в виду, что оценка животных по генетическим маркерам является более эффективной, если в неё включены гены одного физиологического пути, так как в таком случае экспрессия одного гена влияет на экспрессию всех остальных.

Большой интерес для повышения мясной продуктивности крупного рогатого скота представляют гены соматотропинового каскада, белковые продукты которых являются ключевыми звеньями одной гуморальной цепи, участвующей как в процессе лактации, так и в процессах роста и развития млекопитающих ($bPit-1$, bGH , $bGHR$, $bIGF-1$). Следовательно, изучение полиморфизмов этих генов является перспективным с точки зрения поиска маркеров, ассоциированных с признаками и молочной, и мясной продуктивности у крупного рогатого скота [101-103].

3.4.1 Постановка ПЦР-ПДРФ гена гипофизарного фактора транскрипции-1 (*bPit-1*)

Проведение амплификации гена гипофизарного фактора транскрипции-1 (*bPit-1*)

Необходимые реактивы: пробы ДНК, 10х ПЦР-буфер, деионизированная вода, хлорид магния, Taq-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), праймеры для исследуемого участка гена гипофизарного фактора транскрипции-1 (*bPit-1*).

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, холодильник с морозильной камерой на -20°C , амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Для установления генотипов крупного рогатого скота по локусу гипофизарного фактора транскрипции-1 используют следующие праймеры

StuI-F: 5'-caaatgggtccttttctgttcag-3';

StuI-R: 5'-ctttaaactcatggcaaatttc-3' [165];

HinFI-F: 5'-aaaccatcatctcccttctt-3';

HinFI-R: 5'-aatgtacaatgtcttctgag-3' [120].

2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР. Смесь без ДНК матрицы приготовить в одной пробирке и затем аликвотировать по индивидуальным.

На 1 реакцию понадобится 20 мкл реакционной смеси. Необходимо взять:

- 0,3 мкл смеси dNTP;
- 2 мкл 10х ПЦР-буфера;
- 1,5 мкл прямого и 1,5 мкл обратного праймеров;
- 2 мкл хлорида магния;
- 0,4 мкл Taq-полимеразы;
- 11,2 мкл деионизированной воды.

Перемешать все компоненты. Taq-полимеразу добавить в последнюю очередь, вынув ее из морозильной камеры холодильника и поместив на лед.

3. Полученную реакционную смесь раскапать в подготовленные пробирки.

4. Добавить в каждую пробирку, кроме пробирки с отрицательным контролем, по 1,5 мкл матричной ДНК.

5. Поместить пробирки в амплификатор и запустить соответствующий режим, который должен соответствовать праймерам, используемым в реакции.

Режим амплификации:

- 1 95°C – 5 мин;
2. 95°C – 45 с;
3. 55°C – 45 с;
4. 72°C – 45 с;
5. Стадии 2–4 повторяются 34 раза;
6. 72°C – 10 мин.

6. Если образцы не анализируются сразу после окончания амплификации, их следует поместить в холодильник на –20°C.

Рестрикционный анализ гена гипофизарного фактора транскрипции-1 (bPit-1)

Необходимые реактивы: амплификат, рестриктазы *StuI* и *HinFI*, 10х рестрикционный буфер, бидистиллированная вода, 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™, раствор с красителями для нанесения образцов на гель), раствор бромистого 10 мг/мл этидия, маркер молекулярных масс TrackIt™ 50 bp DNA Ladder, агароза, 10×ТБЕ буфер

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, камера для электрофореза, заливочный столик с гребенками, микроволновая печь или плитка, источник тока, трансиллюминатор для агарозно-этидиевых гелей, холодильник с морозильной камерой на –20°C, амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), мерный стакан (100 мл – 1 шт., 1000 мл – 1 шт.), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, лента лабораторная «Parafilm M», спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Для идентификации аллелей гена гипофизарного фактора транскрипции-1 продукты ПЦР разделяли на две аликвоты и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *StuI* и *HinFI*.

2. В реакционную смесь общим объемом 15 мкл вносят 1 мкл 10х буфера для рестриктазы *StuI* (*HinFI*), 0,5 мкл фермента *StuI* (*HinFI*), 5 мкл амплификата. Объем смеси доводят бидистиллированной водой до 15 мкл.

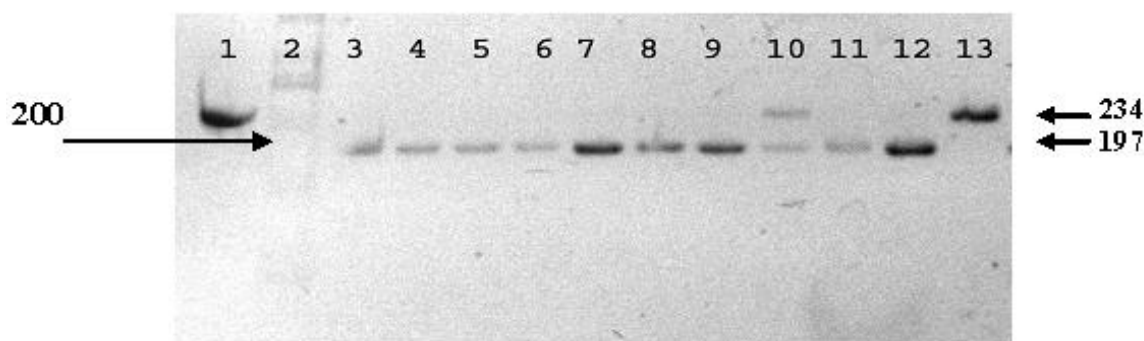
3. Полученную смесь перемешать на вортексе и инкубировать в термостате в течение 16 часов при 37°C. Все операции проводить на лабораторном столе, ферменты либо поместить в лед, либо кратковременно извлекать из морозильной камеры.

4. Приготовить 2%-ный агарозный гель для проведения электрофореза.

5. Нанести на гель рестрицированные образцы, маркер молекулярных масс. Продукты рестрикции разделить в агарозном геле в течение 30 минут при напряжении 150 В.

6. Рассмотреть гель с помощью трансиллюминатора в УФ-свете.

Исследование полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bPit-1* в третьем экзоне, обусловленного трансверсией С→А, вызывающей замену аминокислоты пролин на гистидин в белковой последовательности, проводился с помощью рестриктазы *StuI*. Сайтом узнавания для рестриктазы *StuI* является последовательность AGG↓CCT. В ходе ферментации разрезается фрагмент, содержащий нуклеотид С, соответствующий аллелю *bPit-1-StuI^C* [151]. В случае присутствия А нуклеотида сайт рестрикции исчезает, а такой аллель обозначен как аллель *bPit-1-StuI^A*. Длина амплификата гена *bPit-1* в третьем экзоне составляет 234 п.н. Длина фрагментов после рестрикции составляет 197 и 37 п.н. На электрофореграмме видны варианты полос определенной длины, характерные для две полосы 197 и 37 п.н. (генотип *bPit-1-StuI^{CC}*), три полосы 234, 197, 37 п.н. (генотип *bPit-1-StuI^{AC}*). Фрагмент рестрикции 37 п.н. на агарозном геле не визуализируется (рисунок 15).



Дорожка 1 – ПЦР-продукт 234 п.н. фрагмента гена *bPit-1-StuI*;

Дорожка 2 – маркер молекулярных масс O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва;

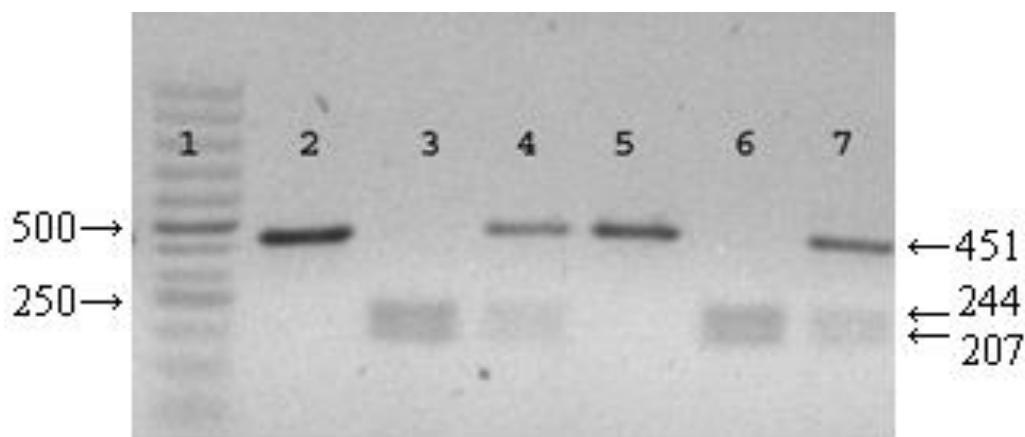
Дорожки 3 – 9, 11, 12 – фрагмент рестрикции 197 п.н., соответствующий генотипу *bPit-1-StuI^{CC}*; дорожка 10 – фрагменты рестрикции 234 и 197 п.н., соответствующие генотипу *bPit-1-StuI^{AC}*;

Дорожка 13 – фрагмент рестрикции 234 п.н., соответствующие генотипу *bPit-1-StuI^{AA}*. Фрагмент рестрикции 37 п.н. не визуализируется. Положение на геле специфических полос показано стрелками.

Рисунок 15 — Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bPit-1-StuI*.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bPit-1* в шестом экзоне проводился с помощью рестриктазы *HinFI*. Полиморфизм обусловлен А→G нуклеотидной заменой, не приводящей к изменению аминокислотной последовательности. Сайтом узнавания для рестриктазы *HinFI* является последовательность G↓ANTC. Разрезаемый в ходе ферментации фрагмент содержит нуклеотид А соответствующий аллелю *bPit-1-HinFI^B*. В случае присутствия G нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bPit-1-HinFI^A*.

Длина амплифицируемого фрагмента гена *bPit-1* составляет 451 п.н. Длина фрагментов после рестрикции составляет 244 и 207 п.н. На электрофореграмме визуализируются варианты полос определенной длины, характерные для генотипов: одна полоса 451 п.н. (генотип *bPit-1-HinFI^{AA}*); две полосы 244 и 207 п.н. (генотип *bPit-1-HinFI^{BB}*); три полосы – 451, 244 и 207 п.н. (генотип *bPit-1-HinFI^{AB}*) (рисунок 16).



Дорожка 1 – маркер молекулярных масс O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва;

Дорожка 2 – ПЦР-продукт 451 п.н. фрагмента гена *bPit-1-HinFI*;

Дорожка 3, 6 – фрагмент рестрикции 244, 207 п.н., соответствующий генотипу *bPit-1-HinFI^{BB}*;

Дорожки 4,7 – фрагменты рестрикции 451, 244, 207 п.н., соответствующие генотипу *bPit-1-HinFI^{AB}*;

Дорожка 5 – фрагмент рестрикции 451 п.н., соответствующий генотипу *bPit-1-HinFI^{AA}*. Положение на геле специфических полос показано стрелками.

Рисунок 16 - Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bPit-1-HinFI*

Контрольные вопросы

1. Перечислите компоненты реакционной смеси, необходимые для проведения полимеразной цепной реакции: а) Taq-полимераза; б) калия хлорид; в) ДНК; г) праймеры; д) магния хлорид; е) дезоксирибонуклеозидтрифосфаты; ж) хлороформ.

2. Составьте реакционную смесь по гену гипофизарного фактора транскрипции-1 (*bPit-1*, полиморфизм *bPit-1-StuI*), которая готовится в объеме 20 мкл и содержит 2 мкл 10х буфера, – 2 мкл MgCL₂, – 0,3 мкл дНТФ (dNTP's), 1,5 мкл каждого праймера, 0,4 мкл Taq-полимеразы, 1,5 мкл геномной ДНК.

3. Проведите постановку ПЦР, используя программу: горячий старт – 5 мин при 95°C; 34 цикла: денатурация – 45 секунд при 95°C; отжиг – 45 секунд при 55°C; синтез – 45 секунд при 72°C; достройка – 10 мин при 72°C.

4. Проведите визуализацию амплификата по гену гипофизарного фактора транскрипции-1 методом горизонтального электрофореза. Детекция результатов амплификации по гену гипофизарного фактора транскрипции-1: 8 мкл продукта амплификации + 0,5 мкл бромфенол голубого, раскапать в 1,5% агарозный гель (V=110, 30-35 мин.).

5. Проведите рестрикцию амплифицированного участка гена гипофизарного фактора транскрипции-1 (*bPit-1*, полиморфизм *bPit-1-StuI*). Для рестрикции амплифицированного участка гена *bPit-1* используют эндонуклеазу *StuI*. Реакцию проводят при температуре 37°C. Продукты рестрикции генов разделяют электрофоретически в 2% агарозном геле (при напряжении 150 В) 30 мин в TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе гель-документирования.

3.4.2 Постановка ПЦР-ПДРФ гена гормона роста (*bGH*)

Проведение амплификации гена гормона роста (*bGH*)

Необходимые реактивы: пробы ДНК, 10х ПЦР-буфер, деионизированная вода, хлорид магния, Taq-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), праймеры для исследуемых участков гена *bGH*.

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, холодильник с морозильной камерой на –20°C, амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Для установления генотипов крупного рогатого скота по локусу гормона роста используют следующие праймеры

AluI –F: 5'-ccgtgtctatgagaagc-3';

AluI-R: 5'-gttcttgagcagcgcg-3' [204].

2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР. Смесь без ДНК матрицы приготовить в одной пробирке и затем аликвотировать по индивидуальным.

На 1 реакцию понадобится 10 мкл реакционной смеси. Необходимо взять:

- 2 мкл смеси dNTP;
- 1 мкл 10х ПЦР-буфера;
- 0,5 мкл прямого и 0,5 мкл обратного праймеров;
- 0,6 мкл хлорида магния;
- 0,3 мкл Taq-полимеразы;
- 4,1 мкл деионизованной воды.

Перемешать все компоненты. Taq-полимеразу добавить в последнюю очередь, вынув ее из морозильной камеры холодильника и поместив на лед.

3. Полученную реакционную смесь раскапать в подготовленные пробирки.

4. Добавить в каждую пробирку, кроме пробирки с отрицательным контролем, по 1,5 мкл матричной ДНК.

5. Поместить пробирки в амплификатор и запустить соответствующий режим, который должен соответствовать праймерам, используемым в реакции.

Режим амплификации:

1. 95°C – 5 мин;
2. 95°C – 15 с;
3. 55°C – 10 с;
4. 72°C – 10 с;
5. Стадии 2–4 повторяются 34 раза;
6. 72°C – 5 мин.

6. Если образцы не анализируются сразу после окончания амплификации, их следует поместить в холодильник на –20°C.

Рестрикционный анализ гена гормона роста (*bGH*)

Необходимые реактивы: амплификат, рестриктаза AluI, 10х рестрикционный буфер, бидистиллированная вода, 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™, раствор с красителями для нанесения образцов на гель), раствор бромистого 10 мг/мл этидия, маркера молекулярных масс TrackIt™ 50 bp DNA Ladder, агароза, 10×ТБЕ буфер

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, камера для электрофореза, заливочный столик с гребенками, микроволновая печь или

плитка, источник тока, трансиллюминатор для агарозно-этидиевых гелей, холодильник с морозильной камерой на -20°C , амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), мерный стакан (100 мл – 1 шт., 1000 мл – 1 шт.), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, лента лабораторная «Parafilm M», спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. В реакционную смесь общим объемом 15 мкл вносят 1 мкл рестриктазного буфера (10x), 0,5 мкл рестриктазы AluI, 5 мкл ПЦР-продукта. Объем смеси доводят бидистиллированной водой до 15 мкл.

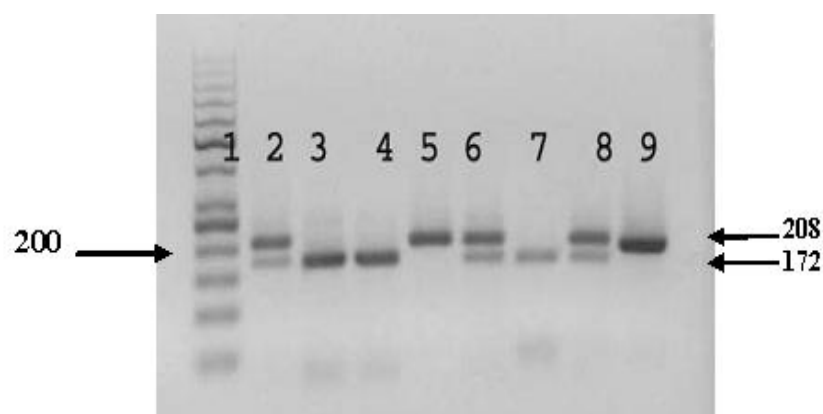
2. Полученную смесь перемешать на вортексе и инкубировать в термостате в течение 16 часов при 37°C . Все операции проводить на лабораторном столе, ферменты либо поместить в лед, либо кратковременно извлекать из морозильной камеры.

3. Приготовить 2%-ный агарозный гель для проведения электрофореза.

4. Нанести на гель рестриктированные образцы, маркер молекулярных масс. Продукты рестрикции разделить в готовом агарозном геле в течение 30 минут при напряжении 150 В.

5. Рассмотреть гель с помощью трансиллюминатора в УФ-свете.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена ***bGH*** в **пятом экзоне** проводится с помощью рестриктазы AluI. Полиморфизм обусловлен транзицией $\text{C} \rightarrow \text{G}$, приводящей к замене аминокислоты лейцин на валин в последовательности белка. Сайтом узнавания для рестриктазы AluI является последовательность $\text{AG} \downarrow \text{CT}$. Распознаваемый ферментом аллель содержит нуклеотид С и обозначен как *bGH-AluI^L* [131]. В случае присутствия G нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bGH-AluI^V* (рисунок 17).



Дорожка 1 – маркер молекулярных масс O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва;

Дорожки 2, 6 – фрагменты рестрикции 208, 172, 35 п.н., соответствующие генотипу *bGH-AluI^{LV}*;

Дорожки 3, 4, 7 – фрагмент рестрикции 172 п.н., соответствующий генотипу *bGH-AluI^{LL}*;

Дорожка 5 – фрагмент рестрикции 208 п.н., соответствующий генотипу *bGH-AluI^{VV}*;

Дорожка 9 – ПЦР-продукт 208 п.н. фрагмента гена *bGH-AluI*. Фрагмент рестрикции 35 п.н. не визуализируется. Положение на геле специфических полос показано стрелками.

Рисунок 17 — Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bGH-AluI*

Длина амплифицируемого фрагмента гена *bGH* составляет 208 п.н. Длина фрагментов после рестрикции составляет 172 и 35 п.н. На электрофореграмме могут быть видны варианты полос определенной длины, характерные для генотипов: одна полоса 208 п.н. (генотип *bGH-AluI^{VV}*); две полосы 172 и 35 п.н. (генотип *bGH-AluI^{LL}*); три полосы 208, 172 и 35 п.н. (генотип *bGH-AluI^{LV}*). Фрагмент рестрикции 35 п.н. на агарозном геле не визуализируется.

Контрольные вопросы

1. Этапы амплификации: а) денатурация; б) элонгация; в) ренатурация; г) отжиг.

2. Составьте реакционную смесь по гену гормона роста (*bGH*), которая готовится в объеме 10 мкл и содержит 1 мкл 10х буфера, – 0,6 мкл MgCL₂, 2 мкл дНТФ (dNTP's), 0,5 мкл каждого праймера, 0,3 мкл Taq-полимеразы, 1,5 мкл геномной ДНК.

3. Проведите постановку ПЦР, используя программу: горячий старт – 5 мин при 95°C; 34 цикла: денатурация – 15 секунд при 95°C; отжиг – 10 секунд при 55°C; синтез – 10 секунд при 72°C; достройка – 5 минут при 72°C.

4. Проведите визуализацию амплификата по гену гормона роста методом горизонтального электрофореза. Детекция результатов амплификации по гену гормона роста: 5 мкл продукта амплификации + 0,5 мкл бромфенол голубого, раскапать в 1,5% агарозный гель (V=110, 30-35 мин.).

5. Проведите рестрикцию амплифицированного участка гена гормона роста. Для рестрикции амплифицированного участка гена *bGH* используют эндонуклеазу *AluI*. Реакцию проводят при температуре 37°C. Продукты рестрикции генов разделяют электрофоретически в 2% агарозном геле (при напряжении 150 В) 30 мин в TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе гель-документирования.

3.4.3 Постановка ПЦР-ПДРФ гена рецептора гормона роста (*bGHR*)

Проведение амплификации гена рецептора гормона роста (*bGHR*)

Необходимые реактивы: пробы ДНК, 10х ПЦР-буфер, деионизированная вода, хлорид магния, Taq-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), праймеры для исследуемых участков гена *bGHR*.

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, холодильник с морозильной камерой на –20°C, амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Для установления генотипов крупного рогатого скота по локусу гормона роста используют следующие праймеры

SspI-F: 5'-aatatgtagcagtgacaatat-3';

SspI-R: 5'-acgtttcactggggtgatga-3' [252].

2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР. Смесь без ДНК матрицы приготовить в одной пробирке и затем аликвотировать по индивидуальным.

На 1 реакцию понадобится 20 мкл реакционной смеси. Необходимо взять:

– 0,25 мкл смеси dNTP;

– 2 мкл 10х ПЦР-буфера;

– 1,7 мкл прямого и 1,7 мкл обратного праймеров;

- 2 мкл хлорида магния;
- 0,3 мкл Taq-полимеразы;
- 10,1 мкл деионизованной воды.

Перемешать все компоненты. Taq-полимеразу добавить в последнюю очередь, вынув ее из морозильной камеры холодильника и поместив на лед.

3. Полученную реакционную смесь раскапать в подготовленные пробирки.

4. Добавить в каждую пробирку, кроме пробирки с отрицательным контролем, по 1,5 мкл матричной ДНК.

5. Поместить пробирки в амплификатор и запустить соответствующий режим, который должен соответствовать праймерам, используемым в реакции.

Режим амплификации:

1. 95°C – 3 мин;
2. 95°C – 30 с;
3. 62°C – 30 с;
4. 72°C – 30 с;
5. Стадии 2–4 повторяются 30 раз;
6. 72°C – 10 мин.

6. Если образцы не анализируются сразу после окончания амплификации, их следует поместить в холодильник на –20°C.

Рестрикционный анализ гена рецептора гормона роста (*bGHR*)

Необходимые реактивы: амплификат, рестриктаза SspI, 10х рестрикционный буфер, бидистиллированная вода, 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™, раствор с красителями для нанесения образцов на гель), раствор бромистого 10 мг/мл этидия, маркера молекулярных масс TrackIt™ 50 bp DNA Ladder, агароза, 10×ТБЕ буфер

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, камера для электрофореза, заливочный столик с гребенками, микроволновая печь или плитка, источник тока, трансиллюминатор для агарозно-этидиевых гелей, холодильник с морозильной камерой на –20°C, амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), мерный стакан (100 мл – 1 шт., 1000 мл – 1 шт.), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, лента лабораторная «Parafilm M», спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. В реакционную смесь общим объемом 13 мкл вносят 1,3 мкл рестриктазного буфера (10x), 0,3 мкл рестриктазы SspI, 5 мкл ПЦР-продукта. Объем смеси доводят бидистирированной водой до 13 мкл.

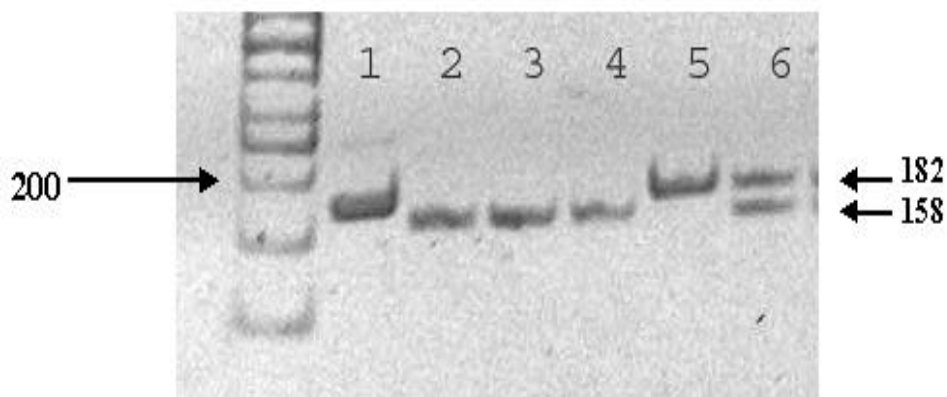
2. Полученную смесь перемешать на вортексе и инкубировать в термостате в течение 16 часов при 37°C. Все операции проводить на лабораторном столе, ферменты либо поместить в лед, либо кратковременно извлекать из морозильной камеры.

3. Приготовить 2%-ный агарозный гель для проведения электрофореза.

4. Нанести на гель рестрицированные образцы, маркер молекулярных масс. Продукты рестрикции разделить в готовом агарозном геле в течение 30 минут при напряжении 150 В.

5. Рассмотреть гель с помощью трансиллюминатора в УФ-свете.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bGHR* в восьмом экзоне проводился с помощью рестриктазы SspI. Рестриктаза SspI распознает Т→А транзицию в восьмом экзоне. Данная SNP вызывает подстановку полярного, хотя и незаряженного остатка тирозина вместо нейтрального фенилаланина в положении -279 белка. Сайтом узнавания для рестриктазы является последовательность ААТ↓АТТ. Разрезаемый ферментом амплификат содержит нуклеотид Т соответствующий аллелю *bGHR-SspI^F* [226]. В случае присутствия А-нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bGHR-SspI^Y*. Длина амплифицируемого фрагмента гена *bGHR* составляет 182 п.н. Длина фрагментов после рестрикции 158 и 24 п.н. На электрофореграмме могут быть видны варианты полос определенной длины, характерные для генотипов: одна полоса 182 п.н. (генотип *bGHR-SspI^{YY}*), две полосы 158 и 24 п.н. (генотип *bGHR-SspI^{FF}*); три полосы – 182, 158 и 24 п.н. (генотип *bGHR-SspI^{FY}*). Фрагмент 24 п.н. на агарозном геле не визуализируется (рисунок 18).



Дорожка 1 – ПЦР-продукт 182 п.н. фрагмента гена *bGHR-SspI*;

Дорожки 2, 3, 4 – фрагмент рестрикции 158 п.н., соответствующий генотипу *bGHR-SspI^{FF}*;

Дорожка 5 – фрагмент рестрикции 182 п.н., соответствующий генотипу *bGHR-SspI^{YY}*;

Дорожка 6 – фрагменты рестрикции 182 и 158 п.н., соответствующие генотипу *bGHR-SspI^{FY}*. Фрагмент 24 п.н. не визуализируется. Использован маркер молекулярных масс O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва. Положение на геле специфических полос показано стрелками.

Рисунок 18 – Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bGHR-SspI*

Контрольные вопросы

1. Денатурация – это: а) процесс образования двухцепочечных молекул из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей; б) расхождение цепей двухцепочечной молекулы ДНК или РНК; в) нарушение нативной конформации биологических макромолекул в результате разрушения нековалентных (водородных) связей; г) удлинение нуклеотидной цепи путем добавления новых нуклеотидов.

2. Составьте реакционную смесь по гену рецептора гормона роста (*bGHR*), которая готовится в объеме 20 мкл и содержит 2 мкл 10х буфера, 2 мкл $MgCl_2$, 0,25 мкл дНТФ (dNTP's), 1,7 мкл каждого праймера, 0,3 мкл Taq-полимеразы, 1,5 мкл геномной ДНК.

3. Проведите постановку ПЦР, используя программу: горячий старт – 3 минуты при 95°C; 30 циклов: денатурация – 30 секунд при 95°C; отжиг – 30 секунд при 62°C; синтез – 30 секунд при 72°C; достройка – 10 минут при 72°C.

4. Проведите визуализацию амплификата по гену рецептора гормона роста методом горизонтального электрофореза. Детекция результатов амплификации по гену гормона роста: 5 мкл продукта амплификации + 0,5 мкл бромфенол голубого, раскатать в 1,5% агарозный гель ($V=110$, 30-35 мин.).

5. Проведите рестрикцию амплифицированного участка гена рецептора гормона роста. Для рестрикции амплифицированного участка гена *bGH* используют эндонуклеазу *SspI*. Реакцию проводят при температуре 37°C. Продукты рестрикции генов разделяют электрофоретически в 2% агарозном геле (при напряжении 150 В) 30 мин в TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе гель-документирования.

3.4.4 Постановка ПЦР-ПДРФ гена инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*)

Проведение амплификации гена инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*)

Необходимые реактивы: пробы ДНК, 10х ПЦР-буфер, деионизированная вода, хлорид магния, Taq-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), праймеры для исследуемых участков гена *bIGF-1*.

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, холодильник с морозильной камерой на –20°C, амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. Для установления генотипов крупного рогатого скота по локусу гормона роста используют следующие праймеры

SnaBI-F: 5'-attcaagctgcctgcccc-3';

SnaBI-R: 5'-acacgtatgaaaggaact-3' [312].

2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР. Смесь без ДНК матрицы приготовить в одной пробирке и затем аликвотировать по индивидуальным.

На 1 реакцию понадобится 20 мкл реакционной смеси. Необходимо взять:

- 0,25 мкл смеси dNTP;
- 2 мкл 10х ПЦР-буфера;
- 1,7 мкл прямого и 1,7 мкл обратного праймеров;
- 2 мкл хлорида магния;
- 0,3 мкл Taq-полимеразы;
- 10,55 мкл деионизированной воды.

Перемешать все компоненты. Taq-полимеразу добавить в последнюю очередь, вынув ее из морозильной камеры холодильника и поместив на лед.

3. Полученную реакционную смесь раскапать в подготовленные пробирки.
4. Добавить в каждую пробирку, кроме пробирки с отрицательным контролем, по 1,5 мкл матричной ДНК.

5. Поместить пробирки в амплификатор и запустить соответствующий режим, который должен соответствовать праймерам, используемым в реакции.

Режим амплификации:

1. 95°C – 5 мин;

2. 95°C – 30 с;

3. 64°C – 30 с;

4. 72°C – 30 с;

5. Стадии 2–4 повторяются 35 раз;

6. 72°C – 10 мин;

6. Если образцы не анализируются сразу после окончания амплификации, их следует поместить в холодильник на –20°C.

Рестрикционный анализ гена инсулиноподобного фактора роста-1 (bIGF-1)

Необходимые реактивы: амплификат, рестриктаза SnaBI, 10х рестрикционный буфер, бидистиллированная вода, 6×DNA Loading Dye (краситель – 6×MassRuler™, раствор с красителями для нанесения образцов на гель), раствор бромистого 10 мг/мл этидия, маркера молекулярных масс TrackIt™ 50 bp DNA Ladder, агароза, 10×ТБЕ буфер

Необходимое оборудование и материалы: ПЦР-бокс, вортекс, камера для электрофореза, заливочный столик с гребенками, микроволновая печь или плитка, источник тока, трансиллюминатор для агарозно-этидиевых гелей, холодильник с морозильной камерой на –20°C, амплификатор, дозаторы с переменным объемом (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), наконечники для дозаторов (0,1–10 мкл, 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1 000 мкл), мерный стакан (100 мл – 1 шт., 1000 мл – 1 шт.), пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, микропробирки пластиковые с плоской крышкой типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл соответственно амплификатору, штативы для микропробирок, лента лабораторная «Parafilm M», спирт для обработки столешницы и инструментов, емкости для отходов.

Ход работы:

1. В реакционную смесь общим объемом 13,2 мкл вносят 1,3 мкл рестриктазного буфера (10х), 0,3 мкл рестриктазы SspI, 5 мкл ПЦР-продукта. Объем смеси доводят бидистиллированной водой до 13,2 мкл.

2. Полученную смесь перемешать на вортексе и инкубировать в термостате в течение 16 часов при 37°C. Все операции проводить на лабораторном столе,

ферменты либо поместить в лед, либо кратковременно извлекать из морозильной камеры.

3. Приготовить 2%-ный агарозный гель для проведения электрофореза.

4. Нанести на гель рестрицированные образцы, маркер молекулярных масс. Продукты рестрикции разделить в готовом агарозном геле в течение 30 минут при напряжении 150 В.

5. Рассмотреть гель с помощью трансиллюминатора в УФ-свете.

Полиморфизм нуклеотидной последовательности гена инсулиноподобного фактора роста-1 *bIGF-1* в области P1 промоторного региона идентифицирован как Т→С трансверсия. Эта замена распознается рестриктазой *SnaBI*. Амплифицируется фрагмент гена *bIGF-1* длиной 249 п.н. [304]. Длина фрагментов после рестрикции составляет 223 и 26 п.н. На электрофореграмме могут быть видны варианты полос определенной длины, характерные для генотипов: одна полоса 249 п.н. (генотип *bIGF-1-SnaBI^{BB}*); две полосы 223 и 26 п.н. (генотип *bIGF-1-SnaBI^{AA}*); три полосы 249, 223 и 26 п.н. (генотип *bIGF-1-SnaBI^{AB}*). Фрагмент 26 п.н. на агарозном геле не визуализируется (рисунок 19).



Дорожка 1 – маркер молекулярных масс O’Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва;

Дорожка 2 – ПЦР-продукт 249 п.н. фрагмента гена *bIGF-1-SnaBI*;

Дорожки 3, 4 – фрагменты рестрикции 249 и 223 п.н., соответствующие генотипу *-SnaBI^{AB}*;

Дорожки 5, 6 – фрагмент рестрикции 223 п.н., соответствующий генотипу *bIGF-1-SnaBI^{AA}*;

Дорожка 7 – фрагмент рестрикции 249 п.н., соответствующий генотипу *bIGF-1-SnaBI^{BB}*. Фрагмент 26 п.н. не визуализируется. Положение на геле специфических полос показано стрелками.

Рисунок 19 – Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bIGF-1-SnaBI*

Контрольные вопросы:

1. Из каких компонентов состоит реакционная смесь для амплификации ДНК?
2. Составьте реакционную смесь по гену инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*), которая готовится в объеме 20 мкл и содержит 2 мкл 10x буфера, 2 мкл $MgCl_2$, 0,25 мкл дНТФ (dNTP's), 1,7 мкл каждого праймера, 0,3 мкл Taq-полимеразы, 1,5 мкл геномной ДНК.
3. Проведите постановку ПЦР, используя программу: горячий старт – 5 минут при 95°C; 35 циклов: денатурация – 30 секунд при 95°C; отжиг – 30 секунд при 64°C; синтез – 30 секунд при 72°C; достройка – 10 минут при 72°C.
4. Проведите визуализацию амплификата по гену инсулиноподобного фактора роста-1 методом горизонтального электрофореза. Детекция результатов амплификации по гену гормона роста: 5 мкл продукта амплификации + 0,5 мкл бромфенол голубого, раскапать в 1,5% агарозный гель ($V=110$, 30-35 мин.).
5. Проведите рестрикцию амплифицированного участка гена инсулиноподобного фактора роста-1. Для рестрикции амплифицированного участка гена *bIGF-1* используют эндонуклеазу *SnaBI*. Реакцию проводят при температуре 37°C. Продукты рестрикции генов разделяют электрофоретически в 2% агарозном геле (при напряжении 150 В) 30 мин в ТВЕ буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе гель-документирования.

3.5 Ошибки ПЦР-ПДРФ и их предотвращение

Достоверность заключений по любому эксперименту определяется качеством полученных результатов. Ошибки проведения ПЦР-ПДРФ могут быть обусловлены различными причинами. Минимизирование ошибок возможно при оценке особенностей используемых экспериментальных методов, их оптимизации, надлежащему использованию контролей, повторностей, а также разработки статистических подходов для выявления ошибок [313].

Ошибки разделены исследователями на категории [314].

1 - обусловленные особенностями собственно последовательности молекулы ДНК.

2 - низкое качество и/или недостаточное количество ДНК. Как низкое качество, так и малое количество ДНК обуславливают «выпадение» (dropout) аллелей в гетерозиготах (амплификация только одной предпочтительно более короткой аллели). При контаминации образцов ДНК возможна амплификация контаминантных аллелей. Одним из решений проблемы в случае малого количества ДНК предложен метод деления образца на несколько пробирок и проведение реакции амплификации в каждой из них [315].

3 - артефакты, обусловленные реагентами. Ошибки, связанные с особенностью Tag-полимеразы добавлять к 3'-концу не принадлежащий к последовательности амплифицируемого фрагмента нуклеотид (как правило, аденин). Эта реакция чувствительна к последовательности 5'-конца праймера и длительному времени элонгации в ПЦР. «Slippage» («запирание») Tag-полимеразы на первых стадиях ПЦР приводит к появлению ложных аллелей. Реагенты низкого качества могут отрицательно влиять на условия ПЦР, неадекватные условия электрофореза могут приводить к искаженной картине распределения аллелей по размеру и т.д.

4 - человеческий фактор. Существенная доля ошибок ПЦР-ПДРФ обусловлена именно этим фактором [316]. Так, это может быть связано с субъективностью оценки электрофореграмм и радиоавтограмм, и соответствующим некорректным обозначением аллелей, что в свою очередь зависит и от качества данных; загрязнение экзогенной ДНК или случайное перекрестное «заражение» образцов, использование неоптимальных протоколов, неоптимальных праймеров, температуры плавления в ПЦР, ошибки при вводе и обработке данных и др. [317]. На практике для выявления ошибок ПЦР-ПДРФ проводится повторная реакция амплификации и сравнение полученных продуктов первоначального и повторного анализа для определенного ряда образцов, другими словами – анализ дублированных образцов [318]

В свою очередь ошибки ПЦР-ПДРФ, возникающие при действии человеческого фактора, также условно можно разделить на три категории, соответствующие этапам анализа:

- *Ошибки преаналитического этапа.* Данный этап включает взятие биоматериала, его хранение и транспортировку, пробоподготовку. В первую очередь, необходимо правильно определить место взятия биологического материала для исследования. Второй распространенной ошибкой преаналитического этапа является неправильное взятие материала на исследование. При работе с кровью важно учитывать тот факт, что для предотвращения ее свертывания в процессе доставки необходимо использовать антикоагулянты. Однако, наиболее распространенный антикоагулянт – гепарин является мощным ингибитором ПЦР, поэтому его использование в данном случае недопустимо. Принципиальным для получения адекватных результатов ПЦР является хранение биологического материала. Необходимо помнить о температуре хранения биологического материала, а также сроках и способах его доставки в ПЦР-лабораторию в случае, если транспортировка требует значительного времени. При нарушении сроков хранения или транспортировки биоматериала ДНК или РНК могут разрушаться, что приведет к ложноотрицательным результатам. Образцы рекомендуется хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 24-48 часов, для более длительного хранения необходимо замораживание.

- *Ошибки аналитического этапа.* Проведение собственно лабораторного исследования также может сопровождаться рядом ошибок, среди которых одной из основных является неправильный выбор системы пробоподготовки. Выбор метода выделения должен определяться характером биоматериала, степенью его загрязнения потенциальными ингибиторами ПЦР. Использование экспресс-методов существенно сокращает время пробоподготовки, делает минимальными потери ДНК в процессе выделения и существенно сокращает риск кросс-контаминации, что представляется весьма привлекательным для рутинного использования в лаборатории. Однако, существенным недостатком данной группы методов является низкая степень очистки пробы от ингибиторов, следствием чего 3-5% образцов дают недостоверные результаты в ПЦР. Сорбентные методы можно определить, как «универсальные», однако для них характерно длительное время выделения, что может привести к перекрестной контаминации; потери ДНК с сорбентом – выход ДНК напрямую зависит от качества сорбента.

- *Ошибки постаналитического этапа.* Основной проблемой постаналитического этапа является неверная интерпретация исследователем результатов ПЦР-ПДРФ анализа [319].

ПЦР-ПДРФ анализ связан с проблемой, обусловленной высокой чувствительностью метода, – возможностью контаминации.

Контаминация – попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул нуклеиновых кислот, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Сотрудник, занимающийся ПЦР-ПДРФ диагностикой, в своей работе сталкивается с тремя видами контаминации:

1. Перекрестная контаминация от пробы к пробе (в процессе обработки биоматериала или при раскапывании реакционной смеси), приводящая к появлению ложноположительных результатов.

2. Контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, поскольку в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации.

3. Контаминация следовыми количествами ампликонов посуды, автоматических пипеток и лабораторного оборудования, поверхностей лабораторных столов или даже поверхности кожи сотрудников лаборатории приводит к появлению систематических ложноположительных результатов.

Как правило, определить источник контаминации бывает очень трудно и требует значительных затрат времени и средств [320].

Основными правилами предотвращения контаминации в лаборатории являются:

- Разделение функциональных рабочих зон;

- Соблюдение поточности и направления движения анализируемых образцов;

- Отдельные лабораторные халаты в каждой рабочей зоне;
- Одноразовые перчатки без талька;
- Наконечники для дозаторов с фильтрами, защищающими от аэрозоля;
- Одноразовые пластиковые пробирки, посуда, наконечники;
- Химическая и УФ дезинфекция всех поверхностей рабочих зон.

Все три зоны должны быть изолированными комнатами, снабженными предбоксниками. Полезно иметь устройство фильтрации воздуха.

Кроме того, желательно предусмотреть отдельные помещения для переодевания и хранения верхней одежды, приема пищи, складское помещение для лабораторных материалов. Все производственные комнаты должны быть снабжены коротковолновыми ультрафиолетовыми лампами. Перемещение пробирок, штативов и пр. должно производиться только в направлении из «чистой» зоны в зоны пробоподготовки и детекции. Клинический материал, поступивший в лабораторию, должен быть как можно быстрее обработан в комнате пробоподготовки. В эту же комнату должны поступать пробирки с реакционной смесью из «чистой» зоны для внесения в них препаратов ДНК. После этого пробирки помещают в амплификатор и, по окончании термоциклирования, не открывая крышек, переносят в зону детекции. Все операции (пробоподготовка, подготовка реакционной смеси, электрофорез) должны выполнять разные люди [321].

Контрольные вопросы

1. На какие категории можно разделить ошибки проведения ПЦР-ПДРФ?
2. Появление ложноположительных результатов при попадании в пробирку следовых количеств положительной ДНК – это: а) кроссинговер; б) конъюгация; в) контаминация; г) корреляция
3. Основные принципы предотвращения контаминации при работе с биологическим материалом.
4. Условия хранения биологического материала.
5. Какие меры необходимо предпринять, если были выявлены ошибки ПЦР-ПДРФ анализа?

3.6 Статистическая обработка данных для оценки эффективности маркеров

Объем производства продукции животноводства непосредственно определяется двумя показателями - численностью животных и их продуктивностью. При учете численности животных их дифференцируют по видам, породам, возрасту, полу, производственному назначению,

продуктивности и т.д. Все виды животных в первую очередь подразделяют на основное стадо (матки и самцы - производители) и молодняк.

При анализе валовой продукции животноводства рассматривают продукцию нормальной жизнедеятельности животных, связанной с хозяйственным использованием животных как средство производства (молоко), а также продукцию выращивания скота (мясная продукция), использование которой для потребления человеком предполагает забой животных. Продуктивность представляют собой выход продукции на 1 голову животных. При оценке молочной продуктивности существенное значение имеет учет качества молока (калорийность, содержание сухих веществ, жира, белка, молочного сахара). Источниками статистических данных о численности и продуктивности скота являются годовые, месячные и квартальные отчеты; отчеты о состоянии животноводства.

Статистическую обработку результатов ПЦР-ПДРФ и данных зоотехнического и племенного учета проводят методами популяционно-генетического и биометрического анализа (П.Ф. Рокицкий, 1961; Н.А. Плохинский, 1970; Е.К. Меркурьева, 1977) [322].

Исследование генетической структуры крупного рогатого скота включает сравнение выборок по распределению частот аллельных вариантов генов соматотропинового каскада, а также оценку соответствия распределения частот генотипов теоретически ожидаемому в соответствии с законом Харди-Вайнберга.

Частоты генотипов определяются методом прямого подсчета

Относительную частоту аллелей рассчитывают по формуле (2):

$$p=(2n_{AA}+n_{AB})/2N \text{ и } q=(2n_{BB}+n_{AB})/2N \quad (2)$$

где p – частота аллеля A , q – частота аллеля B , n_{AA} , n_{AB} , n_{BB} – число особей с данным генотипом, N – общее число особей [323].

Статистическую ошибку относительных частот аллелей вычисляют по формуле (2):

$$S_Q=\sqrt{(Q(1-Q)/2n)} \quad (2)$$

где Q – относительная частота исследуемого аллеля;

n – объем выборки [324].

Сравнение выборок по распределению частот аллельных вариантов исследуемых генов проводят с помощью критерия χ^2 , формула (3). Число степеней свободы =1:

$$\chi^2=\sum(H_o-H_e)/H_e \quad (3)$$

где H_o – наблюдаемые частоты аллелей;

H_e – ожидаемые частоты аллелей [324].

В случае, если ожидаемые значения численности хотя бы в одном из классов оказывается меньше пяти, то расчет χ^2 осуществлялся с поправкой Йетса, формула (4):

$$\chi^2 = \sum ((H_o - H_e) - 0,5)^2 / H_e \quad (4)$$

Соответствие фактического распределения генотипов теоретически ожидаемому в соответствии с законом Харди-Вайнберга оценивается с помощью критерия χ^2 , формула (5). Число степеней свободы равняется одному (число генотипов минус число аллелей).

$$\chi^2 = \sum (H_o - H_e)^2 / H_e \quad (5)$$

где H_o – наблюдаемые частоты генотипов,

H_e – ожидаемые частоты генотипов: (6)

$$AA = p^2;$$

$$AB = 2pq;$$

$$BB = q^2 \text{ [324].}$$

В случае, если ожидаемые значения численности хотя бы в одном из классов оказывается меньше пяти, то расчет χ^2 осуществляется с поправкой Йетса:

$$\chi^2 = \sum ((H_o - H_e) - 0,5)^2 / H_e \quad (7)$$

Допустимое значение χ^2 для одной степени свободы и 5% уровня значимости составляет 3,84 [324].

Для оценки влияния генотипов на признаки продуктивности вначале необходимо выявить предпочтительный и альтернативный генотипы. Для полиморфизмов, у которых группы животных с разными генотипами достоверно различаются между собой по конкретному признаку, генотип, характеризующийся наиболее высоким уровнем продуктивности, является предпочтительным, а два других – нежелательными при отборе животных в ходе селекционного процесса.

Предпочтительный и нежелательные генотипы для каждого полиморфизма определяют путем сравнения средних значений показателей продуктивности в группах животных с разными генотипами между собой, с достоверностью разницы - * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Достоверность различий сравниваемых показателей оценивают по критерию Стьюдента.

Подбор методов статистической обработки и предоставления данных осуществляют с учетом характера распределения изучаемых признаков в имеющихся выборках животных.

При проведении статистического анализа для количественных данных первоначально необходимо определить характер распределения (Shapiro-Wilk` W test).

Если в одной из групп количественные признаки не имеют приближенно нормального распределения, или в одной из групп число выявленных животных с редкими генотипами меньше двадцати, то в дальнейшем вся обработка и интерпретация данных, а также предоставление результатов проводятся методами непараметрической статистики. Данные представляют в виде M_e (25%; 75%), где M_e - медиана (срединное значение) признака; 25% и 75% – интерквартильный размах признака характеризующий разброс распределения признака [324, 325].

Статистическая оценка однородности выборок, а также оценка различий между группами с тремя возможными генотипами проводится методом рангового анализа вариаций для трех и более независимых групп по Краскелу-Уоллису (Kruskal-Wallis ANOVA) либо с помощью медианного теста.

Если число животных в группе с редким генотипом менее шести, такая группа исключается из статистической обработки и сравнение проводится с помощью U-критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test) для двух независимых групп.

В случае выявления статистически достоверных различий между предпочтительными и альтернативными генотипами, проводят оценку продуктивности относительно общей выборки. Те генотипы, которые характеризуются достоверно повышенной или достоверно пониженной продуктивностью относительно общей выборки могут быть рекомендованы в качестве генетических маркеров по данному признаку.

Достоверность отличия уровня продуктивности в группах с разными генотипами от общей выборки определяют методом интервального оценивания, путем построения 95% доверительно интервала для медианы анализируемой группы и последующего сопоставления его с медианой общей выборки. Для этого находят и сравнивают границы 95% ДИ для медианы общей выборки и анализируемой группы. Если границы ДИ не перекрываются, анализируемая группа значимо отличается от популяции.

Оценку мясной продуктивности животных с разными генотипами и их парными сочетаниями проводят по признакам живой массы и индексам, характеризующим телосложение (сбитость, костистость, растянутость, шилозадость и массивность). Молочную продуктивность крупного рогатого скота оценивают по удою, содержанию жира и белка в молоке.

Статистическую обработку результатов проводят с использованием программных возможностей «Microsoft Excel 2010» и «Statistica 6.0» (StatSoft, Inc. 1994 – 2001).

Контрольные вопросы:

1. Как определяют относительные частоты аллелей?
2. Как определяют частоты генотипов?
3. Какие компьютерные программы используют при статистической обработке данных?
4. Определите частоты аллелей А и В, если в популяции крупного рогатого скота насчитывается 1000 животных, среди которых было 500 особей генотипа *bPit-1-HinFI^{AA}*, 350 особей генотипа *bPit-1-HinFI^{AB}* и 150 животных генотипа *bPit-1-HinFI^{BB}*.
5. Определите ошибку для обеих частот.

Список использованных источников

1. Султангалиева Л.С. Развитие конкурентоспособности отрасли мясного животноводства Республики Казахстан // Вестник КазНУ-2013 г. – 2013. - № 4. - С. 93-101
2. Есполов Т.И. АПК Казахстана: глобализация и инновация. - Алматы: КазНАУ, 2012. - 436 с.
3. Программа развития экспортного потенциала мяса КРС РК на 2011-2020 гг.
4. Послание Президента Республики Казахстан - Лидера нации Нурсултана Назарбаева народу Казахстана «Стратегия «Казахстан-2050» - новый политический курс состоявшегося государства» // «Казахстанская правда». - 2012. - № 437-438 (27256-27257).
5. Еремеева Н.В., Калачев С.Л. Конкурентоспособность товаров и услуг. - М.: КолосС, 2006. - 192 с.
6. Послание Президента Республики Казахстан Н. Назарбаева народу Казахстана «Социально-экономическая модернизация - главный вектор развития Казахстана» // «Казахстанская правда». - 2011. - № 401 (27220).
7. Шадманов С.И. Полиморфные системы крови крупного рогатого скота и аспекты их использования в селекции. Ташкент: Мехнат, 1986. - 127с.
8. Виникас А.А. Аллелофонд литовских пород крупного рогатого скота по В и С системам и связь групп крови с продуктивными и воспроизводительными качествами: дис. ... канд. биол. наук. Байсогала. - 1981. - 382с.
9. Терлецкий В.П., Дементьева Н.В., Усенбеков Е.С. Оценка племенных животных по полиморфизму генов и ДНК // Зоотехния. - 2001. - №1. - С.14–16.
10. Fisher R.A. On the dominance ratio // Proceedings - Royal Society of Edinburgh. - 1922. - V.42. - P.321–341.
11. Бердичевский Н.С. Генетический анализ популяций крупного рогатого скота зоны Западных областей УССР по полиморфным белковым системам в связи с селекцией: дис. ... канд. биол. наук. Львов. - 1979. - 175с.
12. Марзанов Н., Саморуков Ю. Как нам спасти вымирающие виды животных // Животноводство России. - 2003. - №3. - С. 8 – 9.
13. Зиновьева Н.А., Попов А.П., Эрнст А.П., Марзанов Н.С., Бочкарев В.В., Стрекозов Н.И. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве. - Дубровицы: ВИЖ, 1998. – 47 с.
14. Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Проблемы биотехнологии и селекции сельскохозяйственных животных. - Дубровицы: ВИЖ, 2004. - 316 с.
15. Гетманцева Л.В., Святогорова А.Е., Леонова М.А., Усатов А.В. Влияние полиморфизма гена MUC4 на репродуктивные качества свиней // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014". - 2014г. - С. 504–505.

16. Костюнина О.В., Зиновьева Н.А., Сизарева Е.И., Калугина А.И., Гладырь Е.А., Гетманцева Л.В., Форнара М.С., Харзинова В.Р. Полиморфизм гена рецептора меланокортина MC4R и его влияние на мясные и откормочные качества свиней // Достижения науки и техники АПК. - 2012. - № 8. - С.49-51.
17. Никитин В.Я., Миролюбов М.Г. Ветеринарное акушерство и биотехника размножения. - М.: Колос, 2000. – 210 с.
18. Хейн Ван Дер Стинг. Генетика кому она нужна? // Свиноводство. - 1998. - №3. - С.28-29.
19. Серебровский А. С. Генетический анализ: Монография. - М.: Наука, 1970. - 344 с.
20. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т.17, №4. – С.1044- 1054.
21. Селионова М.И., Айбазов М.М. Геномные технологии в селекции сельскохозяйственных животных // Сборник научных трудов всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. - 2014. - С.140-145
22. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи современной биологии. - 2004. - Т.124. - С.260–271.
23. Biochard D. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds // Genet Sel Evol. – 2003. – V.35. – № 1. – P.77–101.
24. Cheung V.G., Spielman R.S. The genetics of variation in gene expression // Nature Genet. – 2002. – V.32. – P. 522–525.
25. Coronini R. Decoding the literature on genetic variation // Nature Biotechnol. – 2003. – V.21. – № 1. – P.21–29.
26. Fries R., Durstewitz G. Digital DNA signatures: SNPs for animal tagging // Nature Biotechnology. – 2001. – V.19. – P. 508-516.
27. Gilmour A.R. An efficient computing strategy for prediction in mixed linear models // Computational Statistics and Data Analysis. – 2004. – V.44. – №4. – P.571–586.
28. Heaton M. P. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U. S. beef cattle // Mamm. Genome. – 2002. – V.13. – P.272–281.
29. Fiat A.M., Jolles P. Casein of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: Structural and physiological aspects // Molecular and Cellular Biochemistry. – 1989. – V. 87. – P. 5-30.
30. Holt C., Sawyer L. Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions // Protein Engineering. – 1988. – V.2. – P. 251-259.
31. Mercier J.C., Uro J., Ribadeau-Dumas B., Grosclaude F. Preparation and amino acid sequence of cow κ -casein // European Journal of Biochemistry. – 1972. – V. 27. – P. 535-547.

32. Ciampolini R., Moazami-Goudarzi K., Vaiman D., Dillmann C., Mazzanti E., Foulley J.L., Levezier H., Clanci D. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds // *Journal of Animal Science*. – 1995. – V. 73. – № 11. – P. 3259-3268.
33. Bringe N.A., Kissela J.E. Forces involved in the enzymatic and acidic coagulation of casein micelles // *Development in Food Proteins*. London: Appl. Sc. Publish. - 1987. – P. 159-173.
34. Neelin J.M. Variants of k-casein revealed by improved starch gel electrophoresis // *Journal of Dairy Science*. – 1964. – V. 47. – P. 506-510.
35. Schmidt D.G. Starch gel electrophoresis of k-casein // *Biochemica et Biophysica Acta*. – 1964. – V. 90. – P. 411-414.
36. Woychik J.H. Phenotyping k-casein // *Journal of Dairy Science*. – 1965. – V. 48. – P. 496-497.
37. Гончаренко И.В., Гузев Ю.В. Исследование генных модификаций каппа-казеина молока крупного рогатого скота // *Аграрный вестник Причерноморья: сборник научных трудов Одесского государственного аграрного университета*. – Одесса: ОГАУ. - 2011. – № 58. – С.15-19.
38. Ельчанинов В.В., Кригер А.В. Номенклатура и биохимические свойства казеинов коровьего молока. Каппа-казеин // *Сыроделие и маслоделие*. – 2008. – № 5. – С. 53-56.
39. Grosclaude F., Mahé M.F., Mercier J.C., Ribadeau-Dumas B. Localization des substitutions d'acides amines differenciant les variants A et B de la caseine bovine // *Genetic Selection Animal*. – 1972. – V.4. – P. 515-521.
40. Lara M.A.C., Gama L.T., Bufarah G., Sereno J.R.B., Celegato E.M.L., de Abreu U.P. Genetic polymorphisms at the k-casein locus in Pantaneiro cattle // *Archives of Zootec*. – 2002. – V. 51. – P. 99-105.
41. Vasicek D., Uhrin P., Chrenek P., Bauerová M., Oberfranc M., Bulla J. Genotyping of κ -casein in different cattle breeds in Slovakia // *Ziv. Vyr.* – 1995. – V. 40. – P. 241-244.
42. Hansen H. The advantages of using Brown Swiss Bloodlines // *The Cow International*. – 1990. – V. 9. – P. 31-37.
43. Сулимова Г.Е., Бадагуева Ю.Н., Удина И.Г. Полиморфизм гена каппа-казеина в популяциях подсемейства Bovinae // *Генетика*. – 1996. – Т. 32. – № 11. – С. 1576-1582.
44. Bonfatti V., Cecchinato A., Di Martino G., De Marchi M., Gallo L., Carnier P. Effect of κ -casein B relative content in bulk milk κ -casein on Montasio, Asiago, and Caciotta cheese yield using milk of similar protein composition // *Journal of Dairy Science*. – 2011. – V. 94. - № 2. – P.602-613.
45. Choi J.W., Ng-Kwai-Hang K.F. Effects of genetic variants of κ -casein and β -lactoglobulin and heat treatment of milk on cheese and whey compositions // *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. – 2002. – V. 15. - №. 5. – P. 732-739.

46. Comin A., Cassandro M., Chessa S., Ojala M., Dal Zotto R., De Marchi M., Carnier P., Gallo L., Pagnacco G., Bittante G. Effects of composite beta- and kappa-casein genotypes on milk coagulation, quality, and yield traits in Italian Holstein cows // *Journal of Dairy Science*. – 2008. – V. 91. - № 10. – 4022-4027.
47. Ахметов Т.М., Тюлькин С.В., Зарипов О.Г., Валиуллина Э.Ф., Вафин Р.Р. Качество и технологические свойства сыра, изготовленного из молока коров с разными генотипами каппа-казеина // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. – 2009. – Т. 1. - № 1. – С. 20-23.
48. Бадин Г.А., Шалугин Б.В. Эффективность выработки твёрдых сычужных сыров из молока коров костромской породы // *Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе: сборник статей 62-й международной научно-практической конференции*. – Кострома: КГСХА. - 2011. – Т. 2. – С. 56-60.
49. Гончаренко Г.М., Горячева Т.С., Рудишина Н.М., Медведева Н.С., Акулич Е.Г. Сравнительная оценка сыропригодности молока симментальской и красной степной породы с учётом генотипов κ -казеина // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. – 2013. – Т. 110. - № 12. – С. 113-117.
50. Тинаев А., Калашникова Л., Ганченкова Т. Племенные ресурсы быков-производителей чёрно-пёстрой породы // *Молочное и мясное скотоводство*. – 2009. – № 1. – С. 5-7.
51. Heine W.E., Klein P.D., Reeds P.J. The importance of alpha-lactalbumin in infant nutrition // *J. Nutr.* – 1991. - V.121 (3). - P.277–283.
52. Voelker G.R., Bleck G.T., Wheeler M.B. Single-base polymorphisms within the 5' flanking region of the bovine α -lactalbumin gene // *J. Dairy Sci.* - 1997. – V. 80. - P.194-197.
53. Калашникова Л.А., Дунин И.М., Глазко В.И. Селекция XXI века: использование ДНК- технологий. – Московская обл., Лесные Поляны: ВНИИплем, 2000. – 31 с.
54. Колчев А., Симонович О. Влияние концентрации соматических клеток на качественные и технологические свойства молока // *Главный зоотехник*. – 2010. – №3. – С.27-30.
55. Bojarójć-nosowicz B., Kaczmarczyk E., Bongarc E., Małolepszy J. Natural BLV infection and polymorphism within the 5' flanking region of the α -lactalbumin gene in black-and-white breed cattle // *Bull Vet. Inst. Pulawy*. - 2005. - V.49. - P.439-442.
56. Lundén A., Lindersson M. α -Lactalbumin polymorphism in relation to milk lactose // "Proc. VIth World Congr. on Gen. Appl. to Livestock Prod., Armidale, NSW, Australia, 11-16 January". - 1998. - V.25. - P.47-50.
57. Jennes R. Developments in Dairy Chemistry // *Applied Sciences Publication*. – 1982. - V.1. –P.87- 114.
58. Хазипов Н.З., Аскарова А.Н. Биохимия животных. – Казань. - 2001.-307 с.

59. Hambling S.G., McAlpine A.S., Sawyer L. 3 Lactoglobulin // *Advanced Dairy Chemistry*. Elsevier Applied Science. – 1992. - P. 144-190.
60. Darewics M., Dziuba J. The structure of milk proteins versus their functional properties // *Applied Sciences Publication*. – 2005. - V.2 (43). - P.47-60.
61. Болтовская М.Н., Попов Г.Д., Калинина Е.А., Старостина Т.А. а2-Микроглобулин фертильности (гликоделин) как маркер функциональной активности эндометрия (обзор литературы) // *Проблемы репродукции*. – 2000. - № 6. – С.6-11.
62. Eschke U., Richter D.U., Reimer T. Glycodelin A and differentiation of first trimester trophoblast cells in vitro // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. -2005. - V.272. -№ 2. - P.151-159.
63. Srisarp S., Strakova Z., Fazelebas A.T. The role chorionic gonadotropin (CG) in blastocyst implantation // *Archives of Medical Research*. – 2001. - V.32. - №6. - P.627—634.
64. Kontopidis G., Holt C., Sawyer L. Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function // *Journal of Dairy Science*. - 2004. – V.87. – P.785-796.
65. Горбатова К.К. Химия и физика белков молока. - М.: Колос. - 1993.- 192 с.
66. Hill J.P., Boland M.J., Creamer L.K. Milk and dairy products in the 21st century // *Livestock Production Science*. -1993. - V.35. - P.193-199.
67. Braunschweig M., Stranzinger G., Puhon Z. A PvuII PCR-RFLP test for the bovine β -lactoglobulin D allele // *Animal Genetics*. – 1999. – V.30. – P.76-84.
68. Bole-Feysot C., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice // *Endocrine Reviews*. – 1998. – V.19. - № 3. – P.225-268.
69. Le Provost E., Leroux C., Martin P., Gafe P., Dijane J. Prolactin gene expression in ovine and caprine mammary gland // *Neuroendocrinology*. – 1994. – V.60. - № 3. – P.305-313.
70. Wallis M. The primary structure of bovine prolactin // *FEBS Lett*. – 1974. – V.44. - № 2. – P.205-208.
71. Horseman N.D., Zhao W., Montecino-Rodriguez E., Tanaka M., Nakashima K., Engle S.J., Smith F., Markoff E., Dorshkind K. Defective mammapoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene // *EMBO Journal*. – 1997. – V.16. - №23. – P.6926-6935.
72. Woychik R.P., Camper S.A., Lyons R.H., Horowitz S., Goodwin E.C., Rottman F.M. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene // *Nucleic Acids Research*. – 1982. – V.10. – P.7197-7210.
73. Dietz A.B., Georges M., Threadgill D.W., Womack J.E., Schuler L.A. Somatic cell mapping, polymorphism and linkage analysis of bovine prolactin-related proteins and placental lactogen // *Genomics*. – 1992. – V. 14. - № 1. – P. 137-143.

74. Lewin H.A., Schmitt K., Hubert R., Eijk M.J., Arnheim N. Close linkage between bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes: genetic mapping in cattle by single sperm typing // *Genomics*. – 1992. – V.13. – № 1. – P.44-48.
75. Chung E.R., Rahim T.J., Han S.K. Associations between PCR–RFLP markers of growth hormone and prolactin genes and production traits in dairy cattle // *Korean Journal of Animal Sciences*. – 1996. – V.38. – P.321–336.
76. Camper S.A., Luck D.N., Yao Y.W., Ychik R.P., Goodwin R.G., Lyons R.H., Rottman F.M. Characterization of the bovine prolactin gene // *DNA*. – 1994. – V.3. – № 3. – P.237-249.
77. Sodhi M., Mukesh M., Mishra B.P., Parvesh K., Joshi B.K. Analysis of Genetic Variation at the Prolactin-RsaI (PRL-RsaI) Locus in Indian Native Cattle Breeds (*Bos indicus*) // *Biochemical Genetics*. – 2010. – V.49. – № 1-2. – P.39-45.
78. Dybus A., Grzesiak W., Kamieniecki H., Szatkowska I., Sobek Z., Blaszczyk P., Czerniawska-Piatkowska E., Zych S., Muszynska M. Association of genetic variants of bovine prolactin with milk production traits of Black-and White and Jersey cattle // *Arch. Tierz., Dummerstorf*. – 2005. – V.48. – № 2. – P.149-156.
79. Михайлова М.Е., Белая Е.В. Полиморфные варианты генов соматотропинового каскада bPit-1 и bPRL для ДНК-типирования признаков молочной продуктивности крупного рогатого скота голштинской породы // *Известия национальной академии наук Белоруссии*. – 2011. – № 2. – С. 49-53.
80. Smas C. M., Sul H. S. Control of adipocyte differentiation // *Biochem. J.* – 1995. – №309. – P. 697- 710.
81. Barendse W. World Intellectual Property Organization; Geneva: 1999. Assessing Lipid Metabolism, International Patent Publication WO 99/23248.
82. Cases S., Stone S.J., Zhou P., Yen E., Tow B., Lardizabal K.D., Voelker T., Farese R.V. Cloning of *DGAT2*, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, an related family members // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V.276. – № 42. – P.38870–38876.
83. 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. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking *Dgat* // *Nature Genetics*. – 2000. – V.25. – №1. – P.87-90.
84. Grisart B., Coppieters W., Farnir F., Karim L., Ford C., Berzi P., Cambisano N., Mni M., Reid S., Simon P., Spelman R., Georges M., Snell R. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition // *Genome Research*. – 2002. – V.12. – № 2. – P.222-231.
85. Spelman R.J., Ford C.A., Mc Elhinney P., Gregory G.C., Snell R.G. Characterization of the *DGAT1* gene in the New Zealand Dairy population // *Journal of Dairy Science*. – 2002. – V.85. – № 12. – P.3514-3517.
86. Thaller G., Krämer W., Winter A., Kaupe B., Erhardt G., Fries R. Effects of *DGAT1* variants on milk production traits in German cattle breeds // *Journal of Animal Science*. – 2003. – V.81. – № 8. – P.1911-1918.

87. Näslund J., Fikse W.F., Pielberg G.R., Lundén A. Frequency and effect of the bovine acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism in Swedish dairy cattle // *Journal of the Science*. – 2008 – V.91. - № 5. – 2127-2134.
88. Sun D., Jia J., Ma Y., Zhang Y., Wang Y., Yu Y., Zhang Y. Effects of DGAT1 and GHR on milk yield and milk composition in the Chinese dairy population // *Animal Genetics*. – 2009. – V.40. - № 6 – 997-1000.
89. Molee A., Duanghaklang N., Na-Lampang P. Effects of acyl-CoA:diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1) gene on milk production traits in crossbred Holstein dairy cattle // *Tropical Animal Health and Production*. – 2012. – V. 44. - № 4. – P.751-755.
90. Winter A., Kramer 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 // *PNAS*. – 2002. – V.99. - №14. – P. 9300-9305.
91. Kaupé B., Winter A., Fries R., Erhardt G. DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds // *Journal of Dairy Research*. – 2004. - V. 71. - №2. - P.182-187.
92. Sorensen B.M., Furukawa-Stoffer T.L., Marshall K.S., Page E.K., Mir Z., Forster R.J., Weselake R. Storage lipid accumulation and acyltransferase action in developing flaxseed // *Lipids*. - 2005 V.40. - P.1043-1049.
93. Pannier L., Mullen A.M., Hamill R.M., Stapleton P.C., Sweeney T. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in DGAT1, TG and FABP4 genes and intramuscular fat in crossbred *Bos taurus* cattle // *Meat Science*. – 2010. – V.85. - № 3. – P.515-518.
94. Friedman M., Halaas J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals // *Nature*. – 1998. – V.395. – № 6704. – P.763-770.
95. Hossner K.L. Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: Potential application in animal production // *Can. J. Anim. Sci.* 1998. - V.78. - P. 463-472.
96. Glaum S. R. Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus // *Molecular Pharmacology*. - 1996. - №50. - P. 230-235.
97. Agarwal R., Rout P.K., Singh S.K. Leptin: a biomolecule for enhancing livestock productivity // *Indian Journal of Biotechnology*. – 2009. - V.8. - P.169-176.
98. Sharifzadeh A., Doosti A. Investigation of leptin gene polymorphism in Iranian native cattle // *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. - 2012. - V.2. - P. 86-92.
99. Komisarek J. Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle // *Animal science papers and reports*. - 2012. – V.28. - P.133-141.

100. Buchanan F.C., Fitzsimmons C.J., Van Kessel Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels // *Genetics Selection Evolution*. - 2002. - V.34 (1). - P.105-110.
101. Белая Е.В. Ассоциация полиморфных генов соматотропинового каскада с признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.02.07. - М.: Государственное научное учреждение "Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси", 2012. – 110 с
102. Белая Е.В., Михайлова М.Е., Батин Н.В. Комбинированные фенотипические эффекты полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада (bPit-1, bPRL, bGH, bGHR и bIGF-1) на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы // *Молекулярная и прикладная генетика: сб.науч.тр.* – 2012. – Т. 13. – С. 36–43.
103. Михайлова М.Е., Белая Е.В. Влияние полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада bGH, bGHR и bIGF-1 на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы // *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. – 2011. – Т. 55, № 2. – С.63–69.
104. Holt R.I.G., Simpson H.L., Sonksen P.H. The role of the growth hormone-insulin-like growth factor axis in glucose homeostasis // *Diabet Med*. - 2003. - V.20. – P.3–15.
105. Le Roith D., Bondy K., Yakar S., Liu J.-L., Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001 // *Endocr Rev*. - 2001. - V.22(1) . - P.53-74.
106. Rodriguez S., Gaunt T.R., Day I.N. Molecular genetics of human growth hormone, insulin-like growth factors and their pathways in common disease // *Hum. Genet*. – 2007. - V.122. - P.1–21.
107. Holt R.I., Sönksen P.H. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport // *Br. J. Pharmacology*. – 2008. - V.154. – P.542–556.
108. Phillips J.A. III Inherited defects in growth hormone synthesis and action. In: *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. Ed. by C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. 7-th Edition // McGraw-Hill Health Professions Division. - 1995. - V.2. - P.3023-3044.
109. Léger J., Mercat I., Alberti C., Chevenne D., Armoogum P., Tichet J., Czernichow P. The relationship between the GH/IGF-I axis and serum markers of bone turnover metabolism in healthy children // *Eur J Endocrinol*. - 2007 - V.157(5). – P.685-692.
110. Li G., Del Rincon J.P., Jahn L.A., Wu Y., Gaylinn B., Thorner M.O., Liu Z. Growth hormone exerts acute vascular effects independent of systemic or muscle insulin-like growth factor I. // *J. Clin. Endocrinol Metab*. - 2008. - V. 93. – P.1379–1385.
111. Velloso C.P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I // *Br. J. Pharmacol*. - V. 154. – P. 557–568.

112. Chen E.Y., Liao Y.C., Smith D.H., Barrera-Saldana H.A., Gelinas R.E., Seeburg P.H. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution // *Genomics*. – 1989. - V.4(4). - P.479-497.
113. Fisker S., Kristensen K., Rosenfalck A.M., Pedersen S.B., Ebdrup L., Richelsen B., Hilsted J., Christiansen J.S., Jorgensen J.O. Gene expression of a truncated and the full-length growth hormone (GH) receptor in subcutaneous fat and skeletal muscle in GH-deficient adults: impact of GH treatment // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2001. - V.86. – P.792–796.
114. Leung D.W., Spencer S.A., Cachianes G., Hammonds R.G., Collins C., Henzel W.J., Barnard R., Waters M.J., Wood W.I. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression // *Nature*. - 1987. - V. 330. – P.537–543.
115. Baumann G.P. Growth hormone isoforms // *Growth Hormone and IGF Research*. -2009. - V.19. –P.333-340.
116. Creighton C.J., Casa A., Lazard Z., Huang S., Tsimelzon A., Hilsenbeck S.G., Osborne C.K., Lee A.V. Insulin-like growth factor-I activates gene transcription programs strongly associated with poor breast cancer prognosis // *J Clin Oncol.* – 2008. - V.26(25). - P.4078-4085.
117. Anderson B., Rosenfeld M.G. Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland // *J. Biol. Chem.* - 1994. - V.269. - P.29335-29338.
118. De Mattos K.K., Del Lama S.N., Martinez M.L., Freitas A.F., 2004. Association of bGH and Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls // *Braz. J. Agric. Res.* – 2004. - V.39. - P.147–150.
119. Ingraham H.A., Chen R., Mangalam H.J., Elsholtz H.P., Flynn S.E., Lin C.R, Simmons D.M., Swanson L., Rosenfeld M.G. A tissue specific transcription factor containing a homeo domain specifies a pituitary phenotype // *Cell*. - 1988. - V.55. - P.519-529.
120. Renaville R., Gengler N., Vrech A., Prandi A., Massart S., Corradini C., Bertozzi C., Mortiaux F., Burny A., Portetelle D. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein–Friesian bulls // *J. Dairy Sci.* - 1997b. - V.80. – P. 3431–3438.
121. Mangalam H.J., Albert V.R., Ingraham H.A., Kapiloff M. L., Wilson C., Nelson H., Elsholtz M.G., Rosenfeld A pituitary POU-domain protein, Pit-1 activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally // *Genes Dev.* - 1989. - V.3. - P.946-958.
122. Sturm R.A., Das G., Herr W. The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain // *Genes & Dev.* - 1988. - V.2. - P. 1582-1599.
123. Klemm J.D., Pabo C.O. POU domain-DNA interactions: Cooperative binding of isolated subdomains and effects of covalent linkage // *Genes & Dev.* - 1996. - V.10. - P.27-36.

124. Nelson C., Albert V.R., Elsholtz H.P., Lu L.I.-W., Rosenfeld M.G. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor // *Science*. -1988. - V. 239. - P. 1400-1405.
125. Ohta K., Nobukuni Y., Mitsubuchi H., Ohta T., Tohma T., Jinno Y., Endo F., Matsuda I. Characterization of the gene encoding human pituitary-specific transcription factor, Pit-1 // *Gene*. - 1992. – V. 122. - P. 387-388.
126. Li S., Crenshaw III E.B., Rawson E.J., Simmons D.M., Swanson L.W., Rosenfeld M.G. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene Pit-1 // *Nature*. - 1990. - V.347. - P.528-534.
127. Moody D.E., Pomp D., Barendse W. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine Pit-1 gene and assignment of Pit-1 to bovine chromosome 1 // *Animal Genetics*. - 1995. - V. 26. - P. 45-47.
128. Bodner M., Castrillo J.-L., Theill L.E., Deerinck T., Karin M. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox – containing protein // *Cell*. - 1988. - V.55. - P.505-518.
129. Miyai S., Yoshimura S., Iwasaki Y., Takekoshi S., Lloyd R.V., Osamura R.Y. Introduction of GH, PRL, and TSH beta mRNA by transcription Pit-1 in a human pituitary adenoma-derived cell line // *Cell Tissue Res*. - 2005. - V.322. - P. 269-277.
130. Konzak K.E., Moore D. Functional isoforms of Pit-1 generated by alternative messenger RNA splicing // *Mol. Endocrinol*. - 1992. - V.6. - P.241-247.
131. Theill L.E., Hattori K.D., Lazzaro J.L., Castrillo, M. Karin Differential splicing of the GHF1 primary transcript gives rise to two functionally distinct homeodomain proteins // *Embo. J*. - 1992. - V. 11. - P. 2261-2269.
132. Haugen B.R., Wood W.M., Gordon D.F., Ridgway E.C. A thyrotrope-specific variant of Pit-1 transactivates the thyrotropin beta promoter // *J. Biol. J. Biol. Chem*. - 1993. - V.268. - P.20818-20824.
133. Haugen B.R., Gordon D.F., Nelson A.R., Wood W.M., Ridgway E.C. The combination of Pit-1 and Pit-1T have a synergistic stimulatory effect on the thyrotropin β -subunit promoter but not the growth hormone or prolactin promoters // *Mol. Endocrinol*. -1994. - V.8. - P.1574-1582.
134. Woollard, J., C. B. Schmitz, A. E. Freeman, and C. K. Tuggle.1994. Rapid communication: HinfI polymorphism at the bovine Pit1 locus. *J. Anim. Sci.* 72:3267
135. Morris S.L., Nair J., Rouse D.A. The catalase-peroxidase of *Mycobacterium intracellulare*: nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli* // *J Gen Microbiol*. - 1992. – V.138(11). – P.2363–2370.
136. Tanaka M., Yamamoto I., Ohkubo T., Wakita M., Hoshino S., Nakashima K. cDNA cloning and developmental alterations in gene expression of the two Pit-1/GHF-1 transcription factors in the chicken pituitary // *General and Comparative Endocrinology*. – 1999. - V.114. – P.441-448.
137. Voss J.W., Yao T-P., Rosenfeld M.G. Alternative translation initiation site usage results in two structurally distinct forms of Pit-1 // *Journal of Biological Chemistry*. – 1991. - V. 266. - P.12832–12835.

138. Delhase M., Vila V., Hooghe-Peters E.L., Castrillo J.L. A novel pituitary transcription factor is produced by alternative splicing of the human GHF-1/PIT-1 gene // *Gene*. – 1995. - V.155 (2). - P.273-275.
139. Crenshaw E.B., Kalla K., Simmons D.M., Swanson L.W., Rosenfeld M.G. Cell-specific expression of the prolactin gene in transgenic mice is controlled by synergistic interactions between promoter and enhancer elements // *Genes Dev.* – 1989. - V.3(7). - P.959-972.
140. Lira S.A., Crenshaw E.B., 3rd, Glass C.K., Swanson L.W., Rosenfeld M.G. Identification of rat growth hormone genomic sequences targeting pituitary expression in transgenic mice // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1988. - V.85. - P.4755–4759.
141. Bunt J.C., Boileau R.A., Bahr J.M., Nelson R.A. Sex and training differences in human growth hormone levels during prolonged exercise // *J Appl Physiol*. - 1986. - V.61. - P. 1796–1801.
142. Gordon D.F., Quick D.P., Ewin C.P., Donelson J.E., Maurer R.A. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene // *Molecular and Cellular Endocrinology*. - 1983. - V.33. – P.81-95.
143. Lingappa V.R., Devillers-Thiery A., Blobel G. Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin // *Proc Natl AcadSci USA*. - 1977. - V. 74. - P. 2432-2436.
144. Simmons D.M., Voss J.W., Ingraham H.A., Holloway J.M., Broide R.S., Rosenfeld M.G., Swanson L.W. . Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors // *Genes Dev.* – 1990. - V.4. –P.695-711.
145. Steinfelder H.J., Hauser P., Nakayama Y., Radovick S., McClaskey J.H., Taylor T., Weintraub B.D., Wondisford F.E. Thyrotropin-releasing hormone regulation of human TSH β expression: role of a pituitary specific transcription factor (Pit-1/GHF-1) and potential interaction with a thyroid hormone-inhibitory element // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1991. - V.88. - P.3130-3134.
146. Lin C., Lin S.C., Chang C.P., Rosenfeld M.G. Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone-releasing factor mediates pituitary cell growth // *Nature*. – 1992. - V.360. - P.765–768.
147. Dollé P., Castrillo J.L., Theill L.E., Deerinck T., Ellisman M., Karin M. Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of growth hormone gene activity // *Cell*. – 1990. - V.60(5). – P.809-820.
148. Bartke A. Histology of the anterior hypophysis, thyroid and gonads of two types of dwarf mice // *Anatomical Record*. – 1964. - V.149. – P.225-236.
149. Chen R., Ingraham H.A., Treacy M.N., Albert V.R., Wilson L., Rosenfeld M.G. Autoregulation of Pit-1 gene expression is mediated by two cis-active elements // *Nature*. – 1990. - V.346. –P.583–586.

150. Sinha Y.N., Salocks C.B., Vanderlaan W.P. Pituitary and serum concentrations of prolactin and GH in Snell dwarf mice // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1975. - V.150. - P.207–210.
151. Cohen L.E., Wondisford F.E., Salvatoni A., Maghnie M., Brucker-Davis F., Weintraub B.D., Radovick S. A "hot spot" in the Pit-1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency: clinical and molecular correlates // *J. Clin Endocrinol Metab.* – 1995. - V.80(2). – P.679-684.
152. Stancekova K., Vasicek D., Peskovicova D., Bulla J., Kubek A. Effect of genetic variability of the porcine pituitary-specific transcription factor (Pit-1) on carcass traits in pigs // *Anim. Genet.* – 1999. - V.30. – P.313-315.
153. Yu T.P., Tuggle C.K., Schmitz C.B., Rothschild M.F. Association of Pit-1 polymorphism with growth and carcass traits in pigs // *J. Anim. Sci.* – 1995. - V.73. - P.1282-1288.
154. Zhao Q., Davis M. E., Hines H. C. Associations of polymorphisms in the Pit-1 gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle // *J. Anim. Sci.* - 2004. - V.82. - P. 2229-2233.
155. Dierkes B., Kriegesmann B.B. Baumgartner B.G., Brenig B. Partial genomic structure of bovine Pit1 gene and characterization of a HinfI transition polymorphism in exon 6 // *Anim. Genet.* - 1998. - V.29. - P.398-413.
156. Dybus A., Szatkowska I., Czerniawska-Piątkowska E., Grzesiak W., Wojcik J., Rzewucka E., Zych S. PIT1-HinfI gene polymorphism and its associations with milk production traits in polish Black-and-White cattle // *Archives of Animal Breeding.* – 2004. – V.47. – P.557-564.
157. Klauzinska M. Polymorphism in 5' flanking region of prolactin gene in cattle // *European Journal of Biochemistry.* - 2001. – V.1. - P.189-193.
158. Moravčíková N., Trakovická A., Miluchová M., Bujko J., Navrátilová A. HinfI polymorphism of Pit-1 gene in Slovak spotted cattle // *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences.* – 2013. – V.1. – P.1883-1890.
159. Oprzadek J., Flisikowski K., Zwierzchowski L., Dymnicki E. Polymorphism at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black-and-White bulls // *Animal Science Papers and Reports.* – 2003. – V.21. – P.135-145.
160. Hori-Oshima S., Barreras-Serrano A. Relationships between DGAT1 and PIT-1 genes polymorphism and milk yield in Holstein cattle // *Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science.* - 2003. - V.54. - P.56–63.
161. Jakaria, Noor R.R. Identification of a Single Nucleotide Polymorphism at Hinf-1 Enzyme Restriction Site of Pit-1 Gene on Indonesian Bali Cattle Population // *Media Peternakan.* – 2015. – V.38 (2). – P.104-109.
162. Михайлова М.Е., Белая Е.В., Волчок Н.М., Камыш Н.А. Генотипирование полиморфных вариантов генов гормона роста (GH) и релизинг-фактора (PIT-1) ассоциированных с молочной продуктивностью крупного рогатого скота // *Материалы 7-й международной научной конференции школы «Современные достижения и проблемы биотехнологии*

сельскохозяйственных животных: роль нанотехнологий в реализации приоритетных задач биотехнологии». - Дубровицы, 2008. - С. 185-189.

163. Mohammad Ali Edriss, Vahid Edriss and Hamid Reza Rahmani. Association of PIT-1 gene polymorphism with birth weight, milk and reproduction traits in Isfahan Holstein cows // Archiv Tierzucht. - 2009. - V.52. –P.445-447.

164. Pan C., Lan X., Chen H., Guo Y., Wang X. A TaqI PCR-RFLP Detecting a novel SNP in exon 2 of the Bovine POU1F1 gene // Biochemical Genetics. – 2008. – V.46. - №7-8. –P.424-432.

165. Huang W., Maltecca C. and Khatib H. A proline-to-histidine mutation in POU1F1 is associated with production traits in dairy cattle // Animal Genetics. – 2008. - V.39. – P.554–557.

166. Zwierzchowski L., Oprzadek J., Dymnicki E., Dzierzbicki P. An association of growth hormone, α -casein, β -lactoglobulin, leptin and Pit-1 loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle // Animal Science Papers and Reports. - 2001. - V.19. - P. 65-77.

167. Di Stasio L., Sartore S., Alberta A. Lack of association of GH1 and POU1F1 gene variants with meat production traits in Piedmontese cattle // Anim. Genet. – 2002. - V.33. - P.61–64.

168. Rogério A.C., Darío A.P., Liliane S., Henrique N., de Oliveira Antonio C.S., Catalina R.L. Growth and carcass traits associated with GH1/AluI and POU1F1/Hinf I gene polymorphisms in Zebu and crossbred beef cattle // Genet. Mol. Biol. – 2006. - V.29 (1). - P.56–61.

169. Davis M.E., Simmen R.C.M Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor I concentration and performance traits in Angus beef cattle // J. Anim. Sci. -1997. - V.75. - P.317-324.

170. Zhao Q., Davis M.E., Hines H.C. Association of two Pit-1 polymorphisms with growth rate in beef cattle // J. Anim. Sci. - 2000. - V.78 (1). - P. 77-84.

171. Zhao Q., Davis M.E., Hines H.C. Relationships of polymorphisms in the Pit-1 gene with growth traits in beef cattle // Research and Reviews. – 2001. - V.181. - P.35-40.

172. Zhao Q., Davis M.E., Hines H.C. Two Pit-1 RFLPs and their association with growth traits in beef cattle // J. Anim. Sci. – 1992. - V.80(2) . - P.44-50.

173. Xue K., Chen H., Wang S., Cai AI X., Liu B., Zhang C-F., Lei C-Z., Wang X-Z, Wang Y-M., Niu H. Effect of Genetic Variations of the POU1F1 Gene on Growth Traits of Nanyang Cattle //Acta Genetica Sinica. - 2006. - V.33 (10). - P.901-907.

174. Dybus A. Associations of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish black and white cattle // Anim Sci Pap Rep. - 2002. - V.20. - P.203-212.

175. Parmentier I., Portetelle D., Gengler N., Pradi A., Bertozzi C., Vleurick L., Gilson R., Renaville R. Candidate gene markers associated with somatotrophic axis and milk selection // Domest. Anim. Endocrinol. -1999. – V.17. –P. 139–148.

176. Zwierzchowski L., Krzyzewski J., Strzalkowska N., Siadkowska E., Ryniewicz A. Effect of polymorphisms of growth hormone(GH), Pit-1, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black-and-White cows // *Anim. Sci. Pap. Rep.* – 2002. –V.20. – P.213–227.
177. Edriss V., Edriss A., Rahmani H. R. Pit1 Gene polymorphism of Holstein Cows in Isfahan Province // *Biotechnology.* – 2008. - V.7 (2). - P.209-212.
178. Hediger R., Johnson S.E., Barendse W., Drinkwater R.D., Moore S.S., Hetzel J. Assignment of the growth hormone gene locus to19q26-qter in cattle and to 11q25-qter in sheep by in situ hybridization // *Genomics.* - 1990. - V.8 (1). - P.171-174.
179. Parks J.S. Molecular biology of growth hormone // *Acta Paediatr Scand.* – 1989. – V.349. –P.127-135.
180. Struthers R. S., Gaddy-Kurten D., Vale W.W. Activin inhibits binding of transcription factor Pit-1 to the growth hormone promoter // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. - V.89. – P.11451-11460.
181. Frohman L.A., Down T.R., Chomezynski P. Regulation of growth hormone secretion // *Front Neuroendocrinology.* - 1992. – V.13 (4). – P. 344-405.
182. Nickel B. E., Nachtigal M.W., Bock M. E., Cattini P.A. Differential binding of rat pituitary-specific nuclear factors to the 5'-flanking region of pituitary and placental members of the human growth hormone gene family // *Mol Cell Biol.* – 1991. - V.106. - P.181-190.
183. Lipkin S. M., Naar A.M., Kalla K.A., Sack P.A., Rosenfeld M.G. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent hormone gene expression // *Genes Dev.* – 1993. - V.7. - P.1674-1680.
184. Schaufele F. CCAAT/enhancer-binding protein alpha activation of the rat growth hormone promoter in pituitary progenitor GHRT1-5 cells // *J. Biol. Chem.* – 1996. - V.271. – P.21484-21489.
185. Scanes C.G., Harvey S. Growth hormone action: carbohydrate metabolism, lipid metabolism, protein metabolism // Scanes CG, Daughaday WH, eds. *Growth hormone.* Boca Raton: CRC Press. – 1995. – P.371–391.
186. Bauman D.E. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application // *Domest Anim Endocrinol.* – 1999. - V.17. – P.101-116.
187. Cooke N.E., Liebhaber S.A. Molecular biology of the growth hormone-prolactin gene system // *Vitam. Horm.* - 1995. - V.50. - P.385-394.
188. Rotwein, P., Gronowski A.M., Thomas M. J. Rapid nuclear actions of growth hormone // *Horm. Res.* – 1994. - V.42. - P.170–175.
189. Carter-Su C., Schwarts J., Smit L. 1996. Molecular mechanism of growth hormone action // *Aimu. Rev. Physiol.* – 1996. - V.58. – P.187-194.
190. Gronowski A.M., Zhong Z., Wen Z., Thomas M.J., Darnell J.E., Rotwein P. In vivo growth hormone treatment rapidly stimulates the tyrosine phosphorylation and activation of Stats // *Mol. Endocrinol.* – 1995. - V.9. – P.171-181.

191. Nenthe L.A., Violan B.N., Ganguli A., Hintz R.L., Kung L., Krivi G.G., Lanza G.M. Comparison of the galactopoietic response to pituitary-derived variants of bovine growth hormone // *J. Endocrinol.* – 1992. - V.132. - P.47-53.
192. Przadek J., Dymnicki E., Zwierzchowski L., Lukaszewicz M. The effect of growth hormone (GH), κ -casein (CASK) and b-lactoglobulin (BLG) genotype on carcass traits in Friesian bulls // *Animal Science Papers and Reports.* – 1999. - V.17. – P. 85-92.
193. Renek P., Kmet I., Sakowski T., Vasicek T., Huba I., Chrenek I., Relationships of growth hormone genotype with meat production traits of Slovak Pied bulls // *Czech Journal of Animal Science.* – 1998. - V.43. – P. 541-544.
194. Sirotkin A.V., Chrenek K. P., Makarevich A.V., Huba J. Bula. Interrelationships between breed, growth hormone genotype, plasma IGF-1 level and meat performance in bulls of different ages. // *Archives of Animal Breeding.* - 2000. - V.43. - P.591-596.
195. Grochowska R., Lunden A., Zwierzchowski L., Snochowski M., Oprzajek J. Association between gene polymorphism of growth hormone and carcass traits in dairy bulls // *Animal Science.* - 2001. - V.72. – P.441-447.
196. Schlee P., Graml R., Rotmann O., Pirchner F. Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls // *Journal of Animal Breeding and Genetics.* – 1994. - V.111. – P.253-256.
197. Switonski M. Molecular genetics in beef cattle breeding // *Animal Science Papers and Reports.* – 2002. - V.207. – P.18-24.
198. Pawar R.S., Joshi C.G., Rank D.N. Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle. // *Indian journal of animal science.* – 2007. – V.9. – P.884-888
199. Van der Velf J.J., Verburg F., Garssen G.J. 1996. Evidence for a strong effect of the AluI polymorphism in the growth hormone gene on yield characteristics in dairy cattle // *Proceedings of the 47th Annual Meeting of the EAAP.* – 1996. – V.2. – P.310-316.
200. Ильясов А.Г. Полиморфизм гена гормона роста крупного рогатого скота в связи с продуктивностью в Республике Башкортостан: автореф. канд. с.-х. наук: 06.02.01 - М.: Уфа, 2008. – 120 с.
201. Хатами С.Р. ДНК-полиморфизм генов пролактина и гормона роста у ярославской и черно-пестрой породы крупного рогатого скота: автореф. канд. биол. наук: 03.00.15. - Москва, 2004. – 91 с.
202. Хабибрахманова Я.А. Полиморфизм генов молочных белков и гормонов крупного рогатого скота: диссертация канд. с.-х. наук: 06.02.01. - М.: ВНИИплем. Лесные Поляны Московской обл., 2009. - 123 с.
203. Dario C., Carnicella D., Ciotola F., Peretti V., Bufano G. Polymorphism of growth hormone GH1-AluI in Jersey cows and its effect on milk yield and composition. // *Asian Australasian Journal of Animal Sciences.* - 2008. - V.21. - P.1-5.

204. Lucy M.C., Hauser S.D., Eppard P.J., Krivi G.G., Clark J.H., Bauman D.E., Collier R.J. Variants of somatotropin in cattle: Gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production // *Domestic Animal Endocrinology*. - 1993. - V.10. - P. 325-333.
205. Zhang H.M., Brown D.R., DeNise S.K., Ax R.L. 1993. A novel allele of the bovine somatotropin gene detected by PCR-RFLP analysis // *J. Anim.Sci.* - 1996. - V.71. - P.2276-2285.
206. Hoj S., Fredholm M., Larsen N.J., Nielsen V.H. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle // *Anim. Genet.* - 1993. - V.24. - P.91-106.
207. Lee B.K., Lin G.F., Crooker B.A., Murtaugh M.P., Hansen L.B., Chester-Jones H. Association of somatotropin (bST) gene polymorphism with selection for milk yield in Holstein cows // *J Dairy Sci.* - 1993. - V.76 (1). - P.149-154.
208. Lee B.K, Crooker B.A., Hansen L.B., Chester-Jones H. Polymorphism in the third intron of somatotropin (bST) gene and its association with selection for milk yield in Holstein cows // *J Anim Sci.* - 1994. - V.72. - P.316-324.
209. Lagziel A., Soller M. DNA sequence of SSCP haplotypes at the bovine growth hormone (bGH) gene // *Animal Genetics*. - 1999. - V.30. - P.362-365.
210. Yao J., Aggrey E., Zadworny D., Hayes J., Kuhnlein U. Sequence Variations in the Bovine Growth Hormone Gene Characterized by Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis and Their Association with Milk Production Traits in Holsteins // *Genetics*. - 1996. - V.144. - P.1809-1816.
211. Furu L.M., Kazmer G.W., Zinn S.A., Rycroft H. Somatotropin MspI and AluI polymorphism relative to indicators of the genetic merit of Holstein sires // *J Anim Sci.* - 1998. - V.76. - P.75-73.
212. Dubus A., Grzesiak W., Statkowska I. Association between the growth hormone combined genotypes and dairy traits in Polish Black-and-White cows // *Animal Science and Reports*. 2004. - V.22/ - №2. - P.185-194.
213. Falaki M., Sneyers M., Prandi A., Massart S., Corradini C., Formigoni A., Biuny A., Portetelle D., Renaville R. TaqI growth hormone gene polymorphism and milk production traits in Holstein-Friesian cattle // *Arum. Sci.* -1996b. - V.63. - P.175-182.
214. Falaki M., Gengler N., Sneyers M., Prandi A., Massart S., Formigoni A., Bumy A., Portetelle D., Renaville R. Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls // *J. Dairy Sci.* -1996a. - V.79. - P.1446-1453.
215. Hallerman E.M., Nave A., Kashi Y., Holzer Z., Soller M., Beckmann J.S. Restriction fragment length polymorphisms in dairy and beef cattle at the growth hormone and prolactin loci // *Anim. Genet.* - 1983. - V.18. - P.213-221.
216. Hecht C., Geldermann H. Variants within the 5'-flanking region and the intron 1 of the bovine growth hormone gene // *Anim. Genet.* - 1996. - V.27. - P.329-337.

217. Rodrigues C. V., Guimaraes S. E. F., Neto E. D., Pinheiro L. F. L. Identification of a novel polymorphism in the promoter region of the bovine growth hormone gene // *Anim. Genet.* – 1998. - V.29. - P.65-74.
218. Parsons Y.M., Webb G.C., Bottema C.D. 198. Assignment of the growth hormone receptor gene to band q17 of the homeologous sheep 16 and cattle 20 chromosomes // *Mamm. Genome.* – 1998. - V.9. –P. 599-600.
219. Skinkytė R., Zwierzchowski L., Riaubaitė L., Baltrėnaitė L., Miceikienė I. Distribution of allele frequencies important to milk production traits in lithuanian black & white and lithuanian red cattle // *veterinarija ir zootechnika.* – 2005. - T. 31 (53). - P.93-97.
220. Kopchick J.J., Andry J.M., Growth hormone (GH). GH receptor and signal transduction // *Mol. Genet. Metab.* – 2000. - V.71. - P.293–314.
221. Godowski P.J., Leung D.W., Meacham L.R., Galgani J.P., Hellmiss R., Keret R., Rotwein P.S., Parks J.S., Laron Z., Wood W.I. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron type dwarfs // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1989. - V.86. – P.8083-8087.
222. Jiang H., Okamura C.S., Lucy M.C. Isolation and characterization of a novel promoter for the bovine growth hormone receptor gene // *J.Biol. Chem.* – 1999. - V.274. – P.7893-7900.
223. Moffat J.G., Edens A., Talamantes F. Structure and expression of the mouse growth hormone receptor/growth hormone binding protein gene // *J. Mol. Endocrinol.* – 1999. - V.23. - P. 33-44.
224. Jiang H.L., Lucy M.C. Involvement of hepatocyte nuclear factor-4 in the expression of the growth hormone receptor 1A messenger ribonucleic acid in bovine liver // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2001 a. - V.15. – P.1023–1034.
225. Cooper D. N. 1992. Regulatory mutations and human disease // *Ann Med.* – 1992. - V.24. - P.427-437.
226. Blott S., Kim J.J., Moisis S., Schmidt-Kuntzel A., Cornet A., Berzi P., Cambisano N., Ford C., Grisart B., Johnson D., Karim L., Simon P., Snell R., Spelman R., Wong J., Vilkkilä J., Georges M., Farnir F., Coppieters W. Molecular Dissection of a Quantitative Trait Locus. A phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition // *Genetics.* – 2003. - V.163. - P.253-266.
227. Edens A., Talamantes F. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts // *Endocr. Rev.* – 1998. - V.19. - P.559-582.
228. Goodyer C.G., Zogopoulos G., Schwartzbauer G., Zheng H., Hendy G.N., Menon R.K. Organization and evolution of the human growth hormone receptor gene 5'-flanking region // *Endocrinology.* - 2001. - V.15. – P.1923–1934.
229. Jiang H.L., Lucy M.C., Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency // *Gene.* – 2001b. - V.265. – P.45–53.

230. Menon R.K., Shaufl A., Yu J.H., Stephan D.A., Friday R.P., Identification and characterization of a novel transcript of the murine growth hormone receptor gene exhibiting development and tissue-specific expression // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2001. - V.172. - P.135–146.
231. Bazan J.F. Suiictural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 190. - V.87. – P.6934-6941.
232. Cosman D., Lyman S., Idzerda R.L., Beckman M.P., Goodwin R.G., March C.J. A new cytokine receptor superfamily // *Trends Biochem. Sci.* – 1990. - V.15. – P.265-273.
233. Kelly P.A., Alic S., Rozakis M., Goujon L., Nagano M., Pellegrini I., Gould D., Dijane J., Edery M., Finidori J., Postel-Vinay M.C. The growth hormone/prolactin receptor family // *Recent Prog. Horm. Res.* – 1993. - V.48. – P.123-130.
234. De Vos A.M., Ultsch M., Kossiakoff A.A. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of die complex // *Science.* – 1992. - V.255. - P.306-312.
235. Argetsinger L.S., Carter-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor // *Physiol. Rev.* - 1996. - V.76. - P.1089–1107.
236. Kelly P.A., Goujon L., Sotiropoulos A., Dinerstein H., Esposito N., Edery M., Finidori J., Postel-Vinay M.C. The GH receptor and signal transduction // *Horm. Res.* – 1994. - V.42. – P.133-140.
237. Hill. D.J., Riley S.C., Bassett N.S., Waters M.J. Localization of die growth hormone receptor identified by immunocytochemistry in second trimester human fetal tissues and in placenta diroughtout gestation // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1992. - V.75. - P.646-671.
238. Aggrey S.E., Yao, J., Sabour M.P., Lin C.Y., Zadworny D., Hayes J.F., Kuhnlein U. Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holstein // *J. Hered.* - 1999. - V.90. – P.148-151.
239. Maj A., Oprzadek J., Oprzadek A., Dymnicki E., Zwierzchowski L. Polymorphism in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene and its association with meat production traits in cattle // *Anim. Res.* – 2004a. - V.53. – P.503-514.
240. Maj A., Oprzadek J., Dymnicki E., Zwierzchowski L. Association of the polymorphism in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene with meat production traits in polish black-and-white cattle // *Meat Sci.* - 2006a. - V.72. – P.539-544.
241. Maj A., Zwierzchowski L. Molecular evolution of coding and non-coding sequences of the growth hormone receptor (GHR) gene in the family bovidae // *Folia Biol. (Krakow).* - 2006b. - V. 54. – P.31-36.
242. Maj A., Strzałkowska N., Słoniewski K., Krzyzewski J., Oprzadek J., Zwierzchowski L. Single nucleotide polymorphism SNP) in the 50-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene and its association with dairy production

traits in Polish Black-and-White cattle. // Czech Journal of Animal Science. - 2004b). V.49. – P.419–429.

243. Ge. W., Davis M.E., Hines H.C, Irvin K.M. Two-allelic DGGE polymorphism detected in the promoter region of the bovine GHR gene // Anim. Genet. - 1999. - V.30. – P.71-84.

244. Ge. W., Davis M.E., Hines H.C, Irvin K.M. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle // J. Anim. Sci. - 2003. - V.81. – P.641–648.

245. Ge W., Davis M.E., Hines H.C, Irvin K.M. Rapid Communication: Single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene // J. Anim. Sci. - 2000. - V.78. – P.2229–2230.

246. Zhou Y., Jiang H. Short Communication: A milk trait-associated polymorphism in the bovine growth hormone receptor gene does not affect receptor signaling // J. Dairy Sci. – 2006. – V.89. – P.1761-1764.

247. Fontanesy L., Scotti E., Tazzoli M., Davoli R. Investigation of allele frequencies of the growth hormone receptor (GHR) F279Y mutation in dairy and dual purpose cattle breeds // Ital. J. Anim. Sci. – 2007. - V.6. - P.415-420.

248. Khatkar M.S., Thomson P.C., Tammen I., Raadsma H. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis // Genet. Sel. Evol. – 2004. - V.36. –P.163–190.

249. Mosig, M. O., Lipkin E., Khutoreskaya G., Tchourzyna E., Soller M. A whole genome scan for quantitative trait loci affecting milk protein percentage in Israeli-Holstein cattle, by means of selective milk DNA pooling in a daughter design, using an adjusted false discovery rate criterion // Genetics. - 2001. – V.157. – P.1683–1698.

250. Viitala S., Szyda J., Blott S., Schulmann N., Lidauer M., Mäki-Tanila A., Georges M., Vilkki J.H. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire cattle // Genetics. – 2006. – V.173. – P.2151-2164.

251. Rahmatalla S.A., Müller U., Strucken E. M., Reissmann M., Brockmann G. A. The F279Y polymorphism of the GHR gene and its relation to milk production and somatic cell score in German Holstein dairy cattle // Animal genetics. – 2011. - V. 52. – P.459–465

252. Komisarek J., Michalak A., Walendowska A. The effects of polymorphisms in DGAT1, GH and GHR genes on reproduction and production traits in Jersey cows // Animal Science Papers and Reports. - 2011 - V.29. – P.29-36.

253. Viitala S.M., Schulmann N.F., de Koning D.J., Elo K., Kinos R., Virta A., Virta J., Mäki-Tanila A., Vilkki J.H. Quantitative trait loci affecting milk production traits in Finnish Ayrshire dairy cattle // J. Dairy Sci. – 2003. - V.86. – P.1828-1836.

254. Shimatsu A., Rotwein P. Sequence of two rat insulin-like growth factor I mRNAs differing within the 5' untranslated region // Nucleic Acids Res. – 1987. - V.15. – P.7196-7205.

255. Shemer J., Adamo M. L., Roberts C.T., D. LeRoith. Tissue-specific transcription start site usage in the leader exons of the rat IGF-I gene: evidence for differential regulation in the developing kidney // *Endocrinol.* – 1992. – V.13. – P.2793-2807.
256. Simmons J.G., Van Wyk J.J., Hoyt E.C., Lund P.K. Multiple transcription start sites in the rat insulin-like growth factor-I gene give rise to IGF-I mRNAs that encode different IGF-I precursors and are processed differently in vitro // *Growth Factors.* – 1993. – V.9. – P.205-211.
257. Adamo M.L., Ben-Hur H., Roberts C.T., LeRoith D. Regulation of start site usage in the two leader exons of the rat insulin-like growth factor 1 gene by development, fasting and diabetes // *Mol. Endocrinol.* – 1991. – V.5. – P.1677-1685.
258. Foyi H.L., Lanau F., Woloschak M., Roberts C.T. 1992. Effects of growth hormone on levels of differentially processed insulin-like growth factor 1 mRNAs in total and polysomal mRNA populations // *Mol. Endocrinol.* – 1992. – V.6. – P.1881-1887.
259. Bishop M.D., Simmen R.C.M., Simmen F.A., Davis M.E. The relationship of insulin-like growth factor 1 with postweaning performance in Angus beef cattle // *J. Anim. Sci.* – 1989. – V.67. – P.2872-2879.
260. Davis M.E., Bishop M.D., Park N.H., Simmen R.C.M. Divergent selection for blood serum insulin-like growth factor I concentration in beef cattle: I. Nongenetic effects // *J. Anim. Sci.* – 1995. – V.73. – P.1927-1934.
261. Park N.H. Evaluation of Serum Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) as a Physiological Predictor of Genetic Merit in Beef Cattle: Repeatability, Heritability and Relationship with Performance Traits. Ph.D. Dissertation // The Ohio State University, Columbus. – 1993. – 110 p.
262. Glimm D.R., Baracos V.E., Kennelly J.J. Northern and in situ hybridization analyses of the effects of somatotropin on bovine mammary gene expression // *J. Dairy Sci.* – 1992. – V.75. – P.2687-2705.
263. Ronge H., Blum J. W., Clement C., Jans F., Leuenberger H., Binder H. Somatomedin C in dairy cows related to energy and protein supply and to milk production // *Anim. Prod.* – 1988. – V.47. – P.165-183.
264. Sharma B. K., Vandehaar M. J., Ames N. K. Expression of insulin-like growth factor-I in cows at different stages of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin // *J. Dairy Sci.* – 1994. – V.77. – P.2232-2241.
265. Werner H., Adamo M., Roberts C.T., LeRoith D. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action // *Vitamins and hormones.* – 1994. – V.48. – P.1-58.
266. Tseng L.Y.H., Schwartz G.P., Seikh M., Chen Z.Z., Joshi S., Wang J.F., Nissley S.P. Hybrid molecules containing the A domain of insulin-like growth factor-1 and the B chain of insulin have increased mitogenic activity relative to insulin. *Biochem Biophys. Res. Commun.* – 1987. – V.149. – P.672-680.

267. Zumetsein P., Stiles D. Molecular cloning of gene sequences that are regulated by insulin-like growth factor I. // J. Biol. Chem. – 1987. – V.262. – P.11252-11260.
268. Canalis E. Effect of insulin-like growth factor 1 on DNA and protein syndiesis in cultured rat cavaria // J. Clin, hivest. – 1980. - V.66. – P.709-715.
269. Florini J.R., D'Ercole J., Clemmous D.R., Van Wyk J.J. Paracrine functions of somatomedins // J. Clin. Endocrinol. Metab. -1986. - V.15. – P.59-65.
270. Merriman H. L., La Tour D., Linkhart T. A., Mohan S. D., Baylink J., Stiong D. D. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II induce c-fos in mouse osteoblastic cells // Calci. Tissue Int. – 1990. - V. 46. - P.258-265.
271. Meul C, Froesch E. R. Insulin and no suppressible insulin-like activity (NSILA-S) stimulate die same glucose transport system via two separate receptors in rat heart // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1977. - V. 75. - P.689-695.
272. Florini J.R., Ewton D.Z., Magri K.A., Mangiacapra F.J. IGFs and muscle differentiation. In "Current Directions in Insulin-like Growth Factor Research". // D. LeRoidi and M.K. Raizada (ed) Plenum Press, New York. - 1994. - P.319-326.
273. Leof E.B., Wherton W., van Wyk J.J., Pledger W.J. Epidermal growth factor (EGF) and somatomedin C regulates Gl progression in competent BALBC/3T3 cells // Exp. Cell Res. – 1982. - V.141. – P.107-111.
274. Sadler S. E., Mailer J. L. In vivo regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in Xenopus oocytes: stimulation by insulin and insulin-like growth factor 1 // J. Biol. Chem. – 1987. - V.262. – P.10644-10655.
275. Kirkpatrick B.W. Identification of a conserved microsatellite site in the porcine and bovine insulin-like growth factor-I gene 5' flank // Animal Genetics. – 1992. – V.23. - P.543-548.
276. Hirschberg R. The physiology and padiology of IGF-I in die kidney. In "Current Directions in hisulin-Like Growth Factor Research" // D. LeRoidi and MK Raizada (ed). Plenum Press, New York. - 1994. – P.345-366.
277. Raizada M. K., LeRoidi D. The Role of Insulin-Like Growdi Factors in die Nervous System // Annals New York Acad. Sci. – 1993. - V. 692. – P.49–56.
278. Adams L.J., Madox J.F. A dinucleotide repeat polymorphism in die ovine insulin-like growth factor-I gene 5' flanking region // Anim. Genet. - 1994. - V.25. – P.61-70.
279. Moody D.E., Pomp D., Newman S., MacNeil M.D. Characterization of DNA polymorphisms and dieir associations widi growth and maternal u-aits in line 1 Hereford cattle // Proc. 5di World Congress Genet. Appl. Livest. Prod. – 1994. - V.21. - P.221-230.
280. Shen W.H., Wisniowski P., Ahmed L., Boyle D.W., Denne S.C., Liechty E.A. Protein anabolic effects of insulin and IGF-I in the ovine fetus. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2003. – V.284. –P.748-756.
281. Ge. W., Davis M.E., Hines H.C Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF I gene // Anim. Genet. -1997. - V.28. – P.155-162.

282. Zych S., Szewczyk M., Czerniawska-Piątkowska E., Szatkowska I. A new ACRS-SNP in the 5' flanking region of the bovine insulin-like growth factor 1 (IGF1) gene (Brief report) // Arch. Tierz., Dummerstorf. – 2007. – V.50. – P.531-532.
283. Ge W., Davis M.E., Hines H.C., Irvin K.M., Simmen R.C.M. Association of genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle // Journal of Animals Science. - 2001. - V.79. – P.1757-1762.
284. Hines H.C., Ge W., Zhao Q., Davis M.E. Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor I loci with lactation traits in Holsteins // Animal Genetics. – 1998. – V.29. – P.69-74.
285. Lien S., Karlsten A., Klemetsdal G., Vage D.I., Olsaker I., Klungland H., Aasland M., Heringstad B., Ruane J., Gomez-Raya L. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting twinning rate // Mammalian Genome. – 2000. - V.11. - P.877–882.
286. Rupprechter G., Carriquiry M., Ramos J.M., Pereira I., Meikle A. Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotrophic axis genes. // Acta Veterinaria Scandinavica. - 2011. –V.53. – P.35–44.
287. Siadkowska E., Zwierzchowski L., Oprządek J., Strzalkowska N., Bagnicka E., Krzyżewski E. Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle // Animal Science Papers and Reports. - 2006. - V.24. – P.225-237.
288. Ge W., Davis M.E., Hines H.C. A genetic marker associated with blood serum insulin like growth factor-I (IGF-I) concentration and growth traits in Angus cattle // J. Anim. Sci. - 1997. - V.75. – P.32-40.
289. Kim S.-W., Lajara R., Rotwein P. Structure and function of a human insulin-like growth factor I gene promoter // Mol. Endocrinol. - 1991. - V.5. –P.1964-1970.
290. Li C., Basarab J., Snelling W.M., Benkel B., Murdock B., Hansen C., Moore SS. Assessment of positional candidate genes myf5 and IGF1 for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of Bos taurus // Animal Science. – 2001. - V.82(1). – P.1-7.
291. Mehmannaavaz Y., Amirinia C., Bonyadi M., Vaez Torshizi R. Association of IGF-1 gene polymorphism with milk production traits and paternal genetic trends in Iranian Holstein bulls // African Journal of Microbiology Research. – 2010. - V.4. - P.110–114.
292. Mullen M.P., Lynch C.O., Waters S.M., Howard D.J., Boyle P.O., Kenny D.A., Buckley F., Horan B., Diskin M.G. Single nucleotide polymorphism in the growth hormone and insulin-like growth factor-I genes are associated with milk production, body condition score and fertility traits in dairy cows // Genetics and Molecular Research. - 2011. –V.10. – P.1819-1830.

293. Szewczuk M., Bajurna M., Zych S., Kruszyński W. Association of insulin-like growth factor I gene polymorphisms (IGF1/TasI and IGF1/SnaBI) with the growth and subsequent milk yield of Polish Holstein-Friesian heifers // Czech Journal of Animal Science. – 2013. - V.58. – P.401-411.
294. Reyna X.F.D., Montoya H.M., Castrellón V.V., Rincón A.M.S., Bracamonte M.P., Vera W.A. Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle // Genetics and Molecular Research. – 2010. - V.9(2). - P.875-883.
295. Curi R.A., Oliveira H.N.D., Silveira A.C., Lopes C.R. Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. // Livestock Science. – 2005. – V.94. - P.159-167.
296. Othman E., Mohamed F., Nadia A., Karima M. Genetic Characterization of Insulin Growth Factor-1 and Its Receptor Genes in Egyptian Buffalo (*Bubalus bubalis* L.) // British Biotechnology Journal. – 2013. - V.3 (4). –P.592-604.
297. Wang Y., Price S.E., Jiang H. Cloning and characterization of the bovine class 1 and class 2 insulin-like growth factor-I mRNAs // Domest. Anim. Endocrin. – 2003. –V.25. – P.315-328.
298. Kamiński S., Rusc A., Wojtasik K. Simultaneous identification of ryanodine receptor 1 (RYR1) and estrogen receptor (ESR) genotypes with the multiplex PCR-RFLP method in Polish Large White and Polish Landrace pigs // Journal of Applied Genetics. – 2002. – V. 43 (3). – P. 331–335.
299. Vos P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucleic Acids Res. – 1995. – V. 23. – № 21. – P. 4407–4414.
- 300.<http://humbio.ru/humbio/moldiag/000072bd.htm>
301. Покровский В.В., Федоров Н.А., Шипулин Г.А., Безруков В.М. «Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения» – Утверждены Государственным комитетом санэпиднадзора Российской Федерации 22 июня 1995г.
302. Тореханов А.А., Мусабаев Б.И., Ветринская А.А., Оразымбетова З. Исследование ДНК лошадей и крупного рогатого скота методом ПДАФ с целью идентификации и контроля происхождения – Методические указания: Алматы, 2009 – 56 с.
303. Ахметов Т.М., Тюлькин С.В., Нургалиев Ф.М. Оптимизация выделения ДНК из крови и спермы // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2011. – Т.205. – С.18-23.
304. Северин Е.С. Биохимия: Учеб. для вузов. - ГЭОТАР Медиа, 2003. - 779 с.
305. Demeke T., Adams R.P. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR // BioTechniques. – 1992. - V. 12. - Issue 3. – P.332-334.

306. Katcher H.L., Schwartz I. A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol // *Biotechniques*. – 1994. – V.16 – P. 84-92.
307. Hoorfar J., Cook N., Malorny B. Making Internal Amplification Control Mandatory for Diagnostic PCR // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2003. - V. 41. - P. 5835.
308. Suffys Ph., Vanderborght P.R., Barros dos Santos P. Inhibition of the Polymerase Chain Reaction by Sputum Samples from Tuberculosis Patients after Processing Using a Silica-guanidiniumthiocyanate DNA Isolation Procedure // *The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. - 2001. - V. 96. - N 8. - P. 1137–1139.
309. Mihailov N.V., Getmantseva L.V., Bakoev S.U., Usatov A.V. Associations between PRLR/AluI gene polymorphism with reproductive, growth and meat traits in pigs // *Cytology and Genetics*. - 2014. - V. 48. - № 5. - P. 323-326.
310. Кийко Е.И. Полимеразная цепная реакция как метод генной диагностики в молочном скотоводстве // *Вестник ТГУ*. – 2011. - Т.16. - С.658-659.
311. Сулимова Г.Е., Соколова С.С., Семикозова О.П. и др. Анализ полиморфизма ДНК кластерных генов у крупного рогатого скота: гены казеинов и гены главного комплекса гистосовместимости (BoLA) // *Цитология и генетика*. - 1992. - Т. 26. - С. 18–26.
312. Kim J.H. Associations between molecular markers and cattle production traits (Ph.D. Thesis) – South Dakota State. – 1998. – 219 P.
313. Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications // *TRENDS in Biotechnology*. – 2005. – V. 23. – P.48-55.
314. Morin P.A., Leduc R. G., Archer F. I., Martien K. K., Huebinger R., Bickham J.W., Taylor B.L. Significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors // *Molecular Ecology Resources*. – 2009. – V. 9. – P.498-504.
315. Ghosh, S. et al. Methods for precise sizing, automated binning of alleles, and reduction of error rates in large-scale genotyping using fluorescently labeled dinucleotide markers // *Genome Res*. – 1997. – V. 7. – P.165–178.
316. Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., Pierre Taberlet. Genotyping Errors: Causes, Consequences And Solutions // *Genetics*. – 2005. – V. 6. – P.847-859.
317. Hosking L., Lumsden S., Lewis K., Yeo A., McCarthy L., Bansal A., Riley J., Purvis I., a Xu Ch-F. Detection of genotyping errors by Hardy–Weinberg equilibrium testing // *European Journal of Human Genetics*. – 2004. – V. 12. – P.395–399.
318. Омашева М.Е., Аубакирова К.П., Рябушкина Н.А. Молекулярные маркеры. причины и последствия ошибок генотипирования // *Биотехнология. Теория и практика*. – 2013. - №4. - С. 20-28.
319. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. – М.: ДНК-Технология, 2012. – 80 с.

320. Каспирович А., Глинская Н.А., Волкова Е.М. Молекулярные механизмы генетических процессов: методы изучения геномов. Учебное пособие. – Пинск : ПолесГУ, 2015. – 52 с.
321. Карапетян О.Ш., Вечканов Е.М., Сорокина И.А. Учебно-методическое пособие к проведению лабораторных работ и контроля самостоятельной работы студентов по молекулярной биологии Академии биологии и биотехнологии ЮФУ. - Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2015. - 100с.
322. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – Москва: «МедиаСфера», 2002. – 312 с.
323. Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов. - Минск: БГУ, 1961. – 220 с.
324. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. - М.: Мир, 1988. - 335с.
325. Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных. – Минск: Институт подготовки научных кадров Нац. акад. наук Беларуси, 2008. – 160 с.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

bCSN3 – ген каппа-казеина;
α-LA – ген альфа-лактальбумина;
βLG - ген β-лактоглобулина;
bPRL - ген пролактина;
bTG - ген тиреоглобулина;
bDGAT - ген диацилглицерол О-ацилтрансферазы;
bLep - ген лептина;
Pit-1 – гипофизарный фактор транскрипции
bPit-1 – ген гипофизарного фактора транскрипции;
GH (ГР) – гормон роста;
bGH – ген гормон роста;
GH R (ГРР) - Рецептор гормона роста;
IGF-1 (ИФР-1) - инсулиноподобный фактор роста-1;
bIGF-1 – ген инсулиноподобного фактора роста-1;
ПЦР - полимеразная цепная реакция;
ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов;
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;
РНК - рибонуклеиновая кислота;
мРНК (mRNA)- матричная РНК;
КРС – крупный рогатый скот;
ЛПХ - личное подсобное хозяйство;
ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота;
СХТП - сельхозтоваропроизводители;
QTL (Quantitative Trait Loci), локусы количественных признаков;
MAS (Marker Assisted Selection) - "маркер-зависимая селекция";
ОПМ – отбор с помощью маркеров;
SNP - Single Nucleotide Polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм;
А – аденин;
Т – тимин;
С – цитозин;
G - гуанин;
сМ - сантиморган;
ед.– активная единица (фермента);
т.п.о. – тысяча пар оснований;
Д - дальтон;
кД - килодальтон;
п.о. – пар оснований;
п.н. – пар нуклеотидов;
т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов;
IMF (intramuscular fat) - сумма внутриклеточных, межклеточных и межволоконных жировых компонентов;

bp (base pair) - пар оснований;
a.o. – аминокислотный остаток;
TSH- β – β -субъединица тиротропного гормона;
et al. (et alii) - и другие (в библиографии "с соавторами");
in vitro — это технология выполнения экспериментов, когда опыты
проводятся «в пробирке» — вне живого организма;
in vivo - «внутри живого организма» или «внутри клетки»;
мкл - микролитр;
dNTP - дезокситрифосфаты;
MgCl₂ – хлорид магния
кб – килобит.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Аллели – соответствующие гены на парных хромосомах.

Амплификация – увеличение числа копий фрагмента ДНК в результате полимеразной цепной реакции или при репликации вектора в клетках хозяина либо увеличение числа нуклеотидных последовательностей генома в результате дупликаций.

Генетический полиморфизм – сосуществование в пределах популяции двух или нескольких различных наследственных форм, находящихся в динамическом равновесии в течение нескольких и даже многих поколений.

Генотип – генетическая конструкция организма, набор всех его аллелей. Совокупность генов, определяющих наследственную основу организмов.

Гетерозигота – организм, в геноме которого имеются одна или несколько пар различающихся аллелей. Зигота или диплоидная клетка, образующаяся при соединении двух гамет с разными генотипами. Содержит по два разных аллеля в диплоидном наборе хромосом.

Гомозигота – клетка или организм, содержащая два одинаковых аллеля (АА или аа) в данном локусе гомологичных хромосом.

Димер – соединение, состоящее из двух субъединиц.

Домен – участок полипептидной цепи белка, выполняющий какую-либо его функцию (например, цитоплазматический домен, трансмембранный домен и т.п.).

Инициация – стимуляция начала какой-либо реакции, например, репликации, транскрипции и т.д.

Ингибитор - вещество, замедляющее или предотвращающее течение различных химических реакций: окисления, полимеризации, коррозию металлов и др.

Интрон – транскрибируемый участок гена, не содержащий кодонов и вырезаемый из первичного транскрипта в ходе процессинга с образованием функциональной РНК.

Картирование генов – определение положения данного гена на хромосоме относительно других генов.

Кодон – это участок, состоящий из трех смежных нуклеотидов в молекуле мРНК, либо дискретная единица генетического кода, кодирующая одну из аминокислот или обозначающая конец синтеза белка (терминирующий конец).

Локус – место расположения гена в хромосоме; конкретный участок ДНК, отличающийся каким-либо свойством.

Микросателлит – участок ДНК с определенной геномной локализацией, содержащий короткие tandemные повторы.

Миссенс-мутация – мутация, в результате которой кодон, кодирующий какую-либо аминокислоту, изменяется с образованием кодона, кодирующего другую аминокислоту.

Олигонуклеотид – короткий (5–20 н.) фрагмент полимерной одноцепочечной ДНК или РНК, мономерным звеном в которых служит нуклеотид.

Отжиг – процесс образования двухцепочечных молекул (ДНК-ДНК или ДНК-РНК) из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей.

Промотор – регуляторный район гена, представленный нуклеотидной последовательностью, прилежащей к началу кодирующей области гена и ответственной за инициацию его транскрипции.

ПЦР – полимеразная цепная реакция используется для увеличения количества исследуемого фрагмента ДНК в пробе.

Праймер – одноцепочечный олигонуклеотид, комплементарный границе анализируемого участка генома, используемый в качестве затравки в ПЦР.

Рестриктаза – бактериальный фермент, производящий разрыв в двухцепочечных ДНК после распознавания специфической нуклеотидной последовательности.

Рестрикция – процесс разрыва ДНК под действием специфических ферментов – рестриктаз. Разные рестриктазы узнают и расщепляют разные нуклеотидные последовательности.

Секвенирование ДНК – определение первичной структуры (нуклеотидной последовательности) молекулы ДНК. 2) метод, позволяющий непосредственно идентифицировать нуклеотидную последовательность (секвенс) исследуемой ДНК.

Сплайсинг – вырезание из предшественника мРНК интронов и ковалентное соединение экзонов с образованием зрелых молекул мРНК.

Транскрипция – процесс синтеза РНК, катализируемый РНК-полимеразой, в котором в качестве матрицы используется одна из цепей ДНК.

Фенотип – совокупность всех признаков особи, формирующаяся в процессе взаимодействия ее генотипа и внешней среды.

Фланкирующие области, фланкирующие последовательности – области (нуклеотидные последовательности) ДНК, располагающиеся по обе стороны («по соседству», «на фланге») от специфического локуса, гена или какой-нибудь иной нуклеотидной последовательности.

Экзон – участок ДНК, который экспрессируется в участок матричной или информационной РНК.

Экспрессия гена (выражение гена) – проявление записанной в гене генетической информации в форме мРНК и белка с последующим действием образовавшегося продукта на клетку (фенотипическое проявление).

Эндонуклеаза – фермент, катализирующий разрыв в одно- или двухцепочечной ДНК, или РНК.