



Изучение транскрипционной активности последовательности CR523443 в зависимости от генотипа кур породы русская белая

Баркова О. Ю., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Вахрамеев А.Б., старший научный сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных (ВНИИГРЖ) - филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства - ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»

Аннотация: Ряд предшествующих исследований выявил мононуклеотидную замену 2_1 последовательности CR523443, достоверно влияющую на такие признаки, как масса яйца, толщина и упругая деформация скорлупы. Целью данной работы было проверить транскрипционную активность последовательности CR523443 в зависимости от генотипа кур по данной замене и оценить связь уровня ее экспрессии с изменчивостью признаков яйца у кур породы русская белая. Анализ экспрессии последовательности CR523443 в яйцеводах показал значительно пониженный ее уровень, в отличие от уровня экспрессии в матке тех же особей. Экспрессия последовательности CR523443 в воронке яйцевода у кур с генотипом ТТ составила 0,54, а с генотипом СТ - 0,15. Экспрессия последовательности CR523443 в матке кур с генотипом ТТ была выше в 49 раз, чем у курицы с генотипом СС (взятой как контроль), а с генотипом СТ - в 11 раз (отличия статистически недостоверны). Полученные данные согласуются с предыдущим ассоциативным анализом связи признаков яйца с генотипом, где наибольшую толщину скорлупы и наименьшую упругую деформацию скорлупы имели гомозиготные куры ТТ, а наименьшую толщину и наибольшую упругую деформацию скорлупы яйца - куры с генотипом СС.

Ключевые слова: куры, экспрессия генов, мононуклеотидный полиморфизм (SNP), качество яиц, скорлупа яиц, масса скорлупы.

Введение. Промышленно выращиваемые куры вместе с другими видами домашней птицы стали ключевым объектом для производства легкодоступного животного белка. Увеличение отечественного производства качественных продуктов питания имеет решающее значение для населения страны. За последние 50 лет селекция, начавшаяся сначала на уровне породы, а затем с использованием количественной генетики в сочетании со сложной системой разведения, привела к созданию высокопродуктивной гибридной птицы, отселекционированной по множеству признаков, связанных с произ-

водством яиц [1]. Качество яйца и яйценоскость кур относятся к количественным признакам, контролируемым множеством генов; но основное внимание селекционеров занимает поиск мажорных и казуальных мононуклеотидных полиморфизмов, оказывающих наибольшее влияние на проявление хозяйственно полезных признаков. Данные мононуклеотидные замены могут успешно быть использованы в маркерной селекции птицы.

В предшествующие годы проведен ряд исследований по поиску значимых мутаций, оказывающих влияние на признаки качества яйца. В 4-й хромосоме ку-

рицы рядом с микросателлитом MCW0114 был картирован локус количественного признака (QTL), влияющий на толщину скорлупы яиц [2]. С помощью метода экспрессирующих последовательностей ДНК (EST) в ближайшем окружении микросателлита MCW0114 был обнаружен транскрипт - клон ChEST985k21, экспрессия которого коррелировала с толщиной скорлупы кур польской породы зеленоногая куропатчатая [3]. В результате секвенирования ChEST985k21 в соответствующей нуклеотидной последовательности CR523443 были выявлены шесть мононуклеотидных замен (SNP). Наиболее достоверная ас-



социация мононуклеотидной замены с толщиной скорлупы была установлена для SNP 2_1 [4].

Олигонуклеотидный полиморфизм SNP 2_1 был обнаружен на расстоянии 900 п.н 5' - 3' направлении от конца транскрибируемой последовательности CR523443, состоящей из 2105 пар нуклеотидов, расположенной на GGA4 в положении 16,7 Мб. Рядом с изучаемой нуклеотидной последовательностью находятся следующие гены: COMMD5, FAM199x, RHOXF1 [5]. Построение карты неравновесия по сцеплению для выявления района 4-й хромосомы, в котором локализуется SNP 2_1, показал высокий уровень неравновесия по сцеплению между SNP 2_1 и FAM199X у линии 72 породы род-айленд (0,962) и у кросса CD (0,88). Из полученных данных следует, что наиболее вероятным кандидатом, влияющим на признаки яйца, является ген FAM199X. Он принадлежит к семейству 199 генов, связанных с X-хромосомой; у курицы данный ген не был изучен [6].

При проведении статистического анализа данных для трех генотипов мононуклеотидной замены SNP 2_1 (СТ, СС и ТТ) у 137 кур популяции аврора достоверная ассоциация получена для признаков упругая деформация ($P < 0.001$) и толщина скорлупы яйца ($P < 0.001$). Эффект замещения аллелей произведен с поправкой Бонферрони, где замена СС на ТТ для признака толщина яичной скорлупы ($P < 0,001$) составил 33,7 мкм, СТ на СС 26,1 мкм ($P < 0,003$), ТТ на СТ 7,6 мкм ($P < 0,001$). Эффект замещения аллелей СТ на СС для признака упругой деформации составил 2,7 мм ($P < 0,002$), СТ на ТТ 4,8 мм ($P < 0,0001$), СТ на СС 2,0 мм

($P = 0,006$) [7]. Данная замена в последовательности CR523443 также показала достоверное различие генотипов по признакам масса яйца, упругая деформация и толщина скорлупы ($P < 0,001$) у породы род-айленд красный (97 особей). Эффект замещения аллелей СТ-СС для признака толщина скорлупы составил 38,3 мкм, замены СС на ТТ 33,4 мкм ($P < 0,001$). Для признака упругая деформация скорлупы эффект замещения аллелей СТ на ТТ составил 5,3 мм ($P < 0,001$), СС на ТТ 4,0 мм ($P < 0,001$). Эффект замены аллелей для признака масса яйца наблюдался при замене СС-ТТ ($P < 0,001$) и составлял 1 г [7]. Достоверный эффект замены нуклеотидов SNP 2_1 у кур род-айленд и аврора составил более одного стандартного отклонения. Таким образом, QTL, маркированный SNP 2_1 последовательности CR523443, можно отнести к мажорным QTL, поскольку его эффект составляет одну сигму; он оказывает плейотропный эффект на признаки качества яйца [7].

Целью данного исследования было проверить транскрипционную активность последовательности CR523443 в зависимости от генотипа кур по SNP 2_1 и оценить связь этой активности с изменчивостью признаков яйца, таких как упругая деформация и толщина скорлупы, у кур породы русская белая.

Материал и методика исследований. Для идентификации генотипов СТ, ТТ, СТ по SNP 2_1 последовательности CR523443 было отобрано 97 кур породы русская белая. Кровь брали из подкрыльцовой вены, ДНК выделяли при помощи фенольного метода. Куры были генотипированы с использованием двух аллель-специ-

фических праймеров для SNP 2_1, которые находятся в положении -958 от CR523443 (2). Аллель-специфические прямой и обратный праймеры: С 5'CTGCTCAGTG TCTTAGTCTGATCAGC3'; Т5'CTGCTCAGTGTCTTAGTCTGATCAGT 3'; Dn 5'ACAGTCATGATGAGGAAACAGG 3'. Амплификацию ДНК проводили с использованием амплификатора IQ-5 (Bio-Rad, США). Реакцию проводили в следующем режиме: 95°C – 5 мин.; 95°C – 1 мин., 60°C – 1 мин., 72°C – 1 мин. (30 циклов); 72°C – 7 мин.; 7°C – ∞. Полученные фрагменты ДНК разделяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Для анализа уровня экспрессии всего было отобрано десять кур, включая 4 и 5 голов с генотипами ТТ и СТ соответственно. Генотип СС является редким, из 97 особей была выявлена только одна курица с этим генотипом. Выделение матричной РНК из ткани матки и яйцевода кур проводилось с помощью набора реактивов типа Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Kit (Bio-Rad, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Синтез однонитевой кДНК проводили при помощи набора iScript One-Step RT-PCR Kit (Bio-Rad, США), тщательно следуя указаниям производителя. Смесь для реакции включает 12,5 мкл 2xSYBR Green RT-PCR reaction mix (Bio-Rad, США), 1 мкл матричной РНК (20 нг), 1 мкл обратной транскриптазы pt reverse transcriptase for one-step RT-PCR (Bio-Rad, США), 8,5 мкл H₂O и по 1 мкл 10 мкМ раствора каждого праймера. Конечный объем реакционной смеси составляет 25 мкл. Реакции проводили при помощи амплификатора QuantStudio 5 Real Time

Таблица 1. Степень экспрессии последовательности CR523443 в тканях воронки яйцевода кур породы русская белая по методу сравнительной нормализации генотипа СС с генотипами СТ и ТТ

№ курицы	генотип	Ct среднее beta actin	Ct среднее GAPDH	Ct среднее CR523443	ΔCt среднее	$\Delta\Delta Ct(\Delta Ct 3 - \Delta Ct 2 - \Delta Ct 1)$	2- $\Delta\Delta Ct$ RQ
10	СС	12,68	9,9	10,249	0,465	0	1
1	ТТ	12,978	13,30	13,455	0,313	0,445	0,735
5	ТТ	11,713	11,407	11,429	0,132	1,078	0,474
7	ТТ	12,494	10,014	12,075	1,638	0,661	0,661
11	ТТ	11,89	10,23	13,338	2,623	1,77	0,293
X среднее		12,26	11,24	12,57	1,17	0,99	0,54
2	СТ	12,394	10,25	13,936	2,615	2,74	0,149
3	СТ	12,194	12,07	16,229	4,095	4,227	0,053
4	СТ	11,377	12,181	12,725	0,946	1,147	0,452
6	СТ	11,954	9,468	11,726	1,015	10,00	0,001
8	СТ	11,925	8,33	13,388	3,258	3,39	0,095
X среднее		11,96	10,45	13,6	2,38	4,3	0,15

PCR System (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific) в следующем режиме: 95°C - 5 мин. (40 циклов); 95°C - 10 сек; 55°C - 10 сек; 72°C - 15 сек. В качестве реферативного гена использовались гены GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы) домашней курицы (имеющий идентификационный номер NM_204305) и бета-актина (NM_205518). Для данных генов взяты следующие последовательности праймеров: GAPDHfw, 5'-GGGCTCATCTGAAGGGTGGTGCTA-3'; GAPDHrv, 5'-GTGGGGAGACAGAAGGGAACAGA-3'. Beta actin fw 5'-CGCCCCGGCTCTGACTGACC-3' Beta actin rv 5'-CCTCGGGGCACCTGAACCTCTC-3'.

Для вычисления относительных количеств амплифициру-

емых последовательностей использован метод $2\Delta\Delta Ct$ (Livak K.J. и др., 2001). Достоверность различий средних значений уровней экспрессии в 3 группах оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. Статистическая обработка полученных результатов осуществлена с помощью автоматической программы, предусмотренной амплификатором QuantStudio 5 Real Time PCR System.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ экспрессии в яйцеводах 10 кур (рис. 1, табл. 1) показал значительно пониженный уровень экспрессии последовательности CR523443, в отличие от уровня экспрессии в матке тех же осо-

бей. Экспрессия последовательности CR523443 в воронке яйцевода у кур с генотипом ТТ составила 0,54, а с генотипом СТ 0,15 (отличия статистически недостоверны).

Экспрессия последовательности CR523443 в матке кур с генотипом ТТ была выше в 49 раз, чем у курицы с генотипом СС (взятой как контроль), а с генотипом СТ - в 11 раз; отличия статистически недостоверны (рис. 2, табл. 2). Высокий уровень экспрессии последовательности CR523443 в тканях матки в сравнении с уровнем экспрессии в тканях яйцевода согласуется с физиологией курицы, поскольку образование скорлупы происходит в матке, и, следовательно, ведет к увеличению экспрессии генов, ответственных за формирование скорлупы яйца.

Статистическая недостоверность данных различий, вероятно, обусловлена тем, что экспрессия референтных генов изменялась в условиях эксперимента. Идеальный эталонный ген для нормализации мРНК или уровень экспрессии генов должен быть постоянно стабильным на высоком уровне в большинстве тканей и клеток во всех исследуемых об-

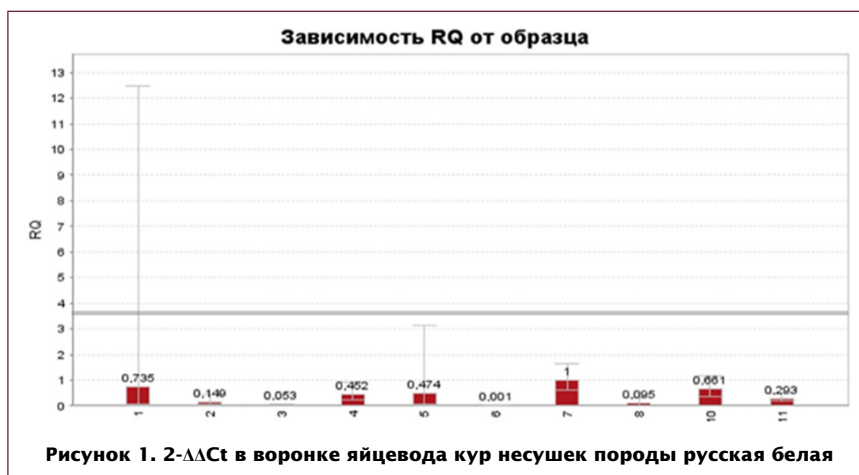


Рисунок 1. 2- $\Delta\Delta Ct$ в воронке яйцевода кур несушек породы русская белая

разцах. Ранее исследователи [8,9] указали на важность использования нескольких генов (минимум двух) для нормализации данных по экспрессии генов. Они продемонстрировали, что более точные результаты могут быть получены, если используется два или более генов, а уровни экспрессии нормализуются с использованием средних геометрических значений. В нашем случае мы использовали гены глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) и бета-актина (Actb), которые обычно используются как внутренний контроль в количественных исследованиях экспрессии мРНК или белка как наиболее последовательно экспрессируемые гены в разных клетках курицы по сравнению с другими референсными генами, также имеющие название «гены домашнего хозяйства» (housekeeping genes) [10-12].

Полученные данные отчасти согласуются с предыдущим ассоциативным анализом признаков яйца с генотипом, где наибольшую толщину скорлупы и наименьшую упругую деформацию имели гомозиготные куры с генотипом ТТ, а наименьшую толщину и наибольшую упругую деформацию скорлупы яйца - куры с генотипом СС.

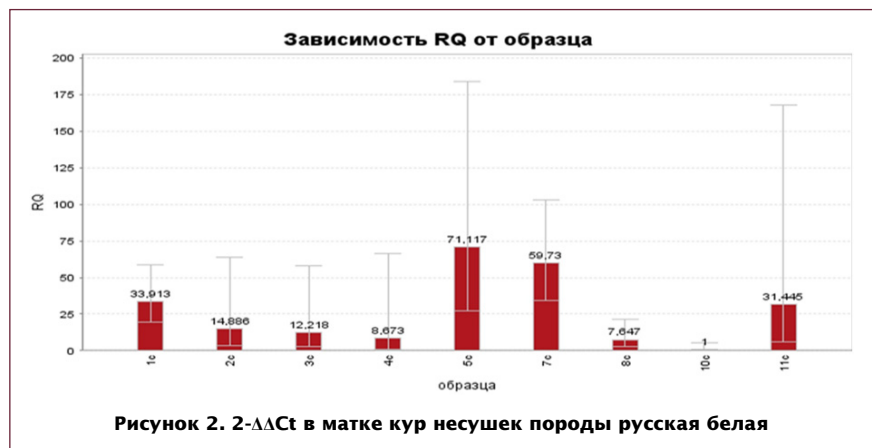


Рисунок 2. 2- $\Delta\Delta Ct$ в матке кур несушек породы русская белая

В популяции аврора (137 особей) особи с генотипом СТ имели толщину скорлупы 362,0 мкм и упругую деформацию 20,8 мм; с генотипом ТТ - 379,7 мкм и 18,1 мм; а наименьшую толщину и наибольшую упругую деформацию скорлупы яйца имели особи с генотипом СС (336,2 мкм и 22,9 мм соответственно) [7]. У породы род-айленд (96 особей) куры с генотипом СТ имели среднюю толщину скорлупы 351,7 мкм и упругую деформацию 21,4 мм; с генотипом ТТ - 364,8 мкм и 22,7 мм; а наименьшую толщину и наибольшую упругую деформацию скорлупы яйца имели куры с генотипом СС (313,4 мкм и 26,7 мм).

Закключение. В результате эксперимента по изучению транскрипционной активности после-

довательности CR523443 была выявлена связь уровней экспрессии данной последовательности с генотипами мононуклеотидной замены 2_1. Наибольший уровень экспрессии наблюдался у кур с генотипом СТ, обладающих более высокими показателями по признакам толщина скорлупы яйца и ее прочность, а наименьший - с генотипом СС; куры с генотипом ТТ имели средний уровень экспрессии. Связь уровней экспрессии прослеживалась также с исследуемой тканью кур: так, в матке экспрессия была значительно выше, чем в воронке яйцевода.

В дальнейшей работе планируется предварительная оценка подмножеств кандидатов референсных генов для получения статистической достоверности результатов.

Таблица 2. Степень экспрессии последовательности CR523443 в тканях матки кур породы русская белая по методу сравнительной нормализации генотипа СС с генотипами СТ и ТТ

№ курицы	генотип	Ct среднее beta actin	Ct среднее GAPDH	Ct среднее CR523443	ΔCt среднее	$\Delta\Delta Ct(\Delta Ct 2 - \Delta Ct 1)$	2- $\Delta\Delta Ct$ RQ
10	СС	11,356	10,705	11,11	0,869	0	1
1	ТТ	14,236	14,343	8,19	-6,094	-5,084	33,913
5	ТТ	13,807	14,369	6,925	-7,16	-6,152	71,117
7	ТТ	13,528	13,685	6,627	-6,91	-5,9	59,73
11	ТТ	13,542	12,265	6,69	-5,98	-4,975	31,445
X среднее		13,78	13,66	7,108	6,53	5,52	49,05
2	СТ	13,962	12,235	8,19	-4,906	-3,86	14,886
3	СТ	13,553	14,178	9,24	-4,621	-3,611	12,218
4	СТ	12,568	11,043	8,171	-4,127	-3,117	8,67
8	СТ	14,002	12,437	8,832	-3,94	-2,9	7,64
X среднее		13,52	12,47	8,60	4,39	-3,37	10,85





Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России (Госзадание №121052600352-3).

Литература

1. Wilson P.B. Recent advances in avian egg science: A review / Poultry Sci. - 2017. - V. 96, No 10. - P. 3747-3754.
2. Wardecka B. Preliminary mapping of QTLs affecting egg quality on chromosomes 1–5 in chickens / B. Wardecka, R. Olszewski, K. Jaszczak // Czech J. Anim. Sci. - 2003. - V. 48 - P. 97-105.
3. Sazanov A.A. Expression of positional candidates for shell thickness in the chicken / A.A. Sazanov, V.A. Stekolnikova, M. Korczak [et al.] // Poultry Sci. - 2007. - V. 86. - P. 202-205.
4. Barkova O.Yu. Design of a system for genotyping of Gallus gallus based on the rSNP (regulatory single nucleotide polymorphism) alleles affecting the eggshell thickness / O.Yu. Barkova, A.L. Sazanova, I.Yu. Blagoveshenskiy, [et al.] // Russ. J. Genet. - 2011. - V. 47, No 2. - P. 216-220.
5. Barkova O. Yu. Analysis of the association of a single nucleotide substitution in the intergenic region of chromosome 4 with signs that determine the quality of a domestic chicken egg / O. Yu Barkova, M.G. Smaragdov // Russ. J. Genet. - 2013. - V. 49, No 7. - P. 243-247.
6. Баркова О.Ю. Анализ структуры неравновесия по сцеплению однонуклеотидной замены SNP2_1 последовательности CR523443 с близлежащими генами на четвертой хромосоме домашней курицы // Птицеводство. - 2020. - №4. - С.4-9.
7. Баркова О.Ю. Ассоциация однонуклеотидной замены SNP2-1 с признаками качества яйца у кур-несушек // Птицеводство. - 2019. - №7-8. - С. 14-18.
8. Mehta R. Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples / R. Mehta, A. Bircerdinc, N. Hossain, A. Afendy // BMC Mol. Biol. - 2010. - V. 11. - P. 39.
9. Vandesompele J. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes / J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman // Genome Biol. - 2002. - V. 3, No 7. - Article RESEARCH0034.
10. Yüzbaşıoğlu A. Assessment of housekeeping genes for use in normalization of real time PCR in skeletal muscle with chronic degenerative changes / A. Yüzbaşıoğlu, I. Onbaşilar, C. Kocaefe, M.Ozgüç // Exp. Mol. Pathol. - 2010. - V. 88. - P. 326-329.
11. Thellin O. Housekeeping genes as internal standards: use and limits / Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Gristar T., Igout A., Heinen E. // J. Biotechnol. - 1999. - V. 75. - P. 291-295.
12. Lin J. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression / J. Lin, C. Redies // Dev. Genes. Evol. - 2012 - V. 222. - P. 369-376.

Для контакта с авторами:

Баркова Ольга Юрьевна

E-mail: barkoffws@list.ru

Вахрамеев Анатолий Борисович

E-mail: ab_poultry@mail.ru

The Genotype and Tissue Related Differences in the Transcriptional Activity of CR523443 Sequence in Russian White Chicken Breed

Barkova O.Yu., Vakhrameev A.B.

*Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding -
branch of the Federal Scientific Center for Animal Husbandry of Academician L.K. Ernst*

Summary: Previous studies have revealed a single nucleotide polymorphism (SNP) 2_1 in CR523443 sequence significantly affecting egg quality parameters (egg weight, eggshell thickness and elastic deformation). The aim of the study presented was to check the transcriptional activity of the CR523443 sequence depending on the SNP genotype of the individual chickens and to compare the expression level with the variability of the traits of the eggs in Russian White chicken breed. Analysis of expression in the oviduct showed a significantly reduced level of expression of the CR523443 sequence, in contrast to that in the uterus of the same individuals. Expression of the CR523443 sequence in the infundibulum in chickens with TT genotype was 0.54 while with CT genotype 0.15. Expression of the CR523443 sequence in the uterus of chickens with TT genotype was 49-fold higher in compare to a hen with CC genotype (taken as a control); with CT genotype 11-fold higher (the differences were insignificant). The data obtained are consistent with the data of earlier associative analysis with egg traits and genotype, where the highest eggshell thickness and the lowest elastic deformation have been found in the heterozygous CT genotype while the lowest eggshell thickness and the highest elastic deformation have been found in the CC genotype.

Keywords: chickens, gene expression, single nucleotide polymorphism (SNP), egg quality, eggshell, eggshell weight.