

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *LTF* И *GDF-9* У МЛЕКОПИТАЮЩИХ (*BOS TAURUS L*) МЕТОДОМ ПЦР-ПДРФ АНАЛИЗА ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ ФАРМАКОГЕНЕТИКИ

© С. Н. Прошин<sup>1</sup>, Е. С. Усенбеков<sup>2</sup>, Е. Ш. Шакибаев<sup>2</sup>, Ж. Ж. Бименова<sup>2</sup>, Р. М. Жумаханова<sup>2</sup>, Р. И. Глушаков<sup>1</sup>, Н. И. Дементьева<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;

<sup>2</sup>Казахский национальный аграрный университет, Алматы;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных» Минздрава России, Санкт-Петербург

**Резюме.** Установлена тесная взаимосвязь между полиморфизмом гена лактоферрина (LTF) с заболеваемостью маститом и содержанием соматических клеток в молоке у млекопитающих. Продукты гена лактоферрина связаны с устойчивостью к ряду заболеваний, и прежде всего, к маститам. Лактоферрин (LTF) — многофункциональный малый гликопротеин молока, основная функция которого — защита молочной железы. Считается, что можно использовать генетические варианты лактоферрина в качестве ДНК-маркера для прогнозирования содержания соматических клеток в молоке и заболеваемости маститом: аллель А гена *LTF* связан с заболеваемостью маститом у таких млекопитающих как коровы. Также установлено влияние полиморфизма генов *BMP 15* и *GDF9* у овец на количество овулируемых фолликулов и уровень овуляции. Так, аллели гена, Bone morphogenetic protein — *BMP 15* у овец, оказывают влияние на процесс фолликулогенеза и гетерозиготные овцы по данному локусу овулируют с двумя–тремя ооцитами. Авторы данного исследования рекомендуют использовать полиморфизм гена *BMP 15* у овец в качестве ДНК маркера для повышения плодовитости животных в овцеводстве. Известно, что продукты гена *GDF9* контролируют процесс роста и развития фолликулов у коров. Полиморфизм данного гена хорошо исследован в медицине, у женщин, имеющих мутацию в кодирующей части гена *GDF9* встречаются признаки преждевременного угасания функции яичников. Изучение полиморфизма гена лактоферрина имеет теоретическое и прикладное значение, так как существует положительная корреляция между содержанием в молоке соматических клеток и генетическими вариантами лактоферрина. Таким образом, авторы работы предлагают использовать полиморфизм гена *GDF9* у коров в качестве ДНК маркера для прогнозирования репродуктивной функции у млекопитающих. Цель работы: изучение полиморфизма ДНК генов *LTF*, *GDF9* и выявление животных с желательным генотипом по изучаемым локусам, как перспективной модели для поиска новых фармакологических средств.

**Ключевые слова:** ДНК маркеры, *GDF9*, лактоферрин.

## INVESTIGATION OF *LTF* AND *GDF-9* GENE POLYMORPHISM AND IN MAMMALS (*BOS TAURUS L*) BY PCR-RFLP ANALYSIS FOR PHARMACOGENETICS

© S. N. Proshin<sup>1</sup>, E. S. Usenbekov<sup>2</sup>, E. Sh. Shakibaev<sup>2</sup>, Zh. Zh. Bimenova<sup>2</sup>, R. M. Zhumakhanova<sup>2</sup>, R. I. Glushakov<sup>1</sup>, N. I. Dement'yeva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Russia;

<sup>2</sup>Kazakh National Agrarian University, Republic of Kazakhstan;

<sup>3</sup>Federal research institute for farm animal genetics and breeding, Russia

**Abstract.** It has been established the close relationship between gene polymorphism of lactoferrin (LTF) with an incidence of mastitis and somatic cell counts in milk of mammals. Lactoferrin gene products are associated with resistance to several diseases, and particularly for mastitis. Lactoferrin (*LTF*) is a multifunctional small glycoprotein of milk. Its main function is to protect the breast. It is considered that genetic variants of DNA lactoferrin could be used as a marker for the prediction of somatic cells in milk and mastitis incidence. Allele A of *LTF* gene is associated with the incidence of mastitis in mammals such as cows. It has also been established that the polymorphism of *BMP15* and *GDF9* genes of sheep influence the number and rate of ovulation. Thus the alleles of Bone morpho-genetic protein (*BM15*) gene influence the process of folliculogenesis in sheep. Sheep heterozygous on this locus ovulate two or three oocytes. The authors of this study recommend the use of polymorphism *BMP15* gene as DNA markers to increase fertility in sheep. It is well known that products of *GDF9* gene control the process of growth and development of follicles in cows. Polymorphisms

of the gene is well studied in medicine. Women who have a mutation in the coding region of the gene *GDF9* found signs of premature ovarian failure. The study of lactoferrin gene polymorphism has theoretical and practical importance since there is a positive correlation between the content in milk of somatic cells and genetic variants of lactoferrin. Thus, the authors suggest the use of *GDF9* gene polymorphism in cows as a DNA marker for the prediction of reproductive function in mammals. The aim: to study DNA polymorphism of genes *LTF*, *GDF9* and identified animals (*Bos Taurus L*) with the desired genotype for the studied loci to build model for searching new pharmacological agents.

**Key words:** DNA markers; lactoferrin and *GDF9* genes.

## АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Исследованиями установлена тесная взаимосвязь между полиморфизмом гена лактоферрина (*LTF*) с заболеваемостью маститом, содержанием соматических клеток в молоке. Продукты гена лактоферрина связаны с устойчивостью к заболеваниям, прежде всего, к маститам. Лактоферрин крупного рогатого скота (*LTF*) — многофункциональный малый гликопротеин молока, основная функция которого — защита молочной железы [2]. Ген *LTF* локализован на хромосоме 22q24, состоит из 17 экзонов и полная последовательность гена 34,5 тыс п.н. Исследованиями ученых установлена частота генетических вариантов AA, BB и AB лактоферрина у коров голштинской породы, 32,5, 10 и 57,5% соответственно. Авторы рекомендуют использовать генетические варианты лактоферрина в качестве ДНК маркера для прогнозирования содержания соматических клеток в молоке и заболеваемости маститом, аллель А гена *LTF* связана с заболеваемостью маститом у коров [3]. Также, установлено влияние полиморфизма генов *BMP 15* и *GDF9* у овец на количество овулируемых фолликулов и уровень овуляции. Так, аллели гена, Bone morphogenetic protein — *BMP 15* у овец, оказывают влияние на процесс фолликулогенеза и гетерозиготные овцы по данному локусу овулируют с двумя-тремя ооцитами. Авторы данного исследования рекомендуют использовать полиморфизм гена *BMP 15* у овец в качестве ДНК маркера для повышения плодовитости животных в овцеводстве [1].

В 2013 году появилось первое сообщение о полиморфизме гена *GDF9* (Growth differentiation factor 9) у *Bos Taurus L* и о связи аллелей данного гена с выходом пригодных для трансплантации эмбрионов у животных-доноров, с общим количеством эмбрионов. Ген *GDF9* у *Bos Taurus L* имеет длину 3824 пар нуклеотидов, экзонная часть гена оказалась консервативной и не имеет мутации, а в интронной части обнаружены две точечные мутации. Известно, что продукты гена *GDF9* контролируют процесс роста и развития фолликулов у коров. Полиморфизм данного гена хорошо исследован в медицине, у женщин, имеющих мутацию в кодирующей части гена *GDF9* встречаются признаки преждевре-

менного угасания функции яичников [4, 5]. Китайскими учеными установлено, что высокий выход качественных эмбрионов для трансплантации был у коров-доноров с генотипом A485TT, также была выявлена положительная корреляция с общим количеством эмбрионов и генотипом коров-доноров A625AA. Изучение полиморфизма гена лактоферрина имеет теоретическое и прикладное значение, так как существует положительная корреляция содержанием в молоке соматических клеток и с генетическими вариантами лактоферрина.

Таким образом, авторы работы предлагают использовать полиморфизм гена *GDF9* у коров в качестве ДНК маркера для прогнозирования репродуктивной функции у *Bos Taurus L*.

*Цель работы:* изучение полиморфизма ДНК генов *LTF*, *GDF9* и выявление животных с желательным генотипом по изучаемым локусам, как перспективной модели для поиска новых фармакологических средств.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 88 коровах голштинской породы племенного хозяйства ТОО «Байсерке-Агро» Талгарского района Алматинской области. Кровь для анализа брали из яремной вены в вакуумную пробирку с антикоагулянтом — ЭДТА. Работу проводили в учебно-научно-диагностической лаборатории Казахстанско-Японского инновационного центра КазНАУ. ДНК из крови выделяли с помощью набора «ДНК сорб В».

Для детекции полиморфизма гена *LTF* использовали следующую пару праймеров:

F — 5'-GCCTCATGACAACCTCCCACAC-3',

R 5'-CAGGTTGACACATCGGTTGAC-3'.

Условия проведения ПЦР: денатурация при 94 °C — 45 сек, отжиг праймеров — 62 °C 45 сек и элонгация при температуре 72 °C 45 сек и количество циклов 35–40. Объем реакционной смеси: 50 мкл, имеющий следующий состав: 5 мкл 10×ПЦР буфера, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мкл 25 мкМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл 0,2 mM концентрации каждого dNTP, 0,5 мкл фермента Taq Polymerase с активностью 5u/μl, 5 мкл ДНК и 26,5 мкл дистиллированной воды.

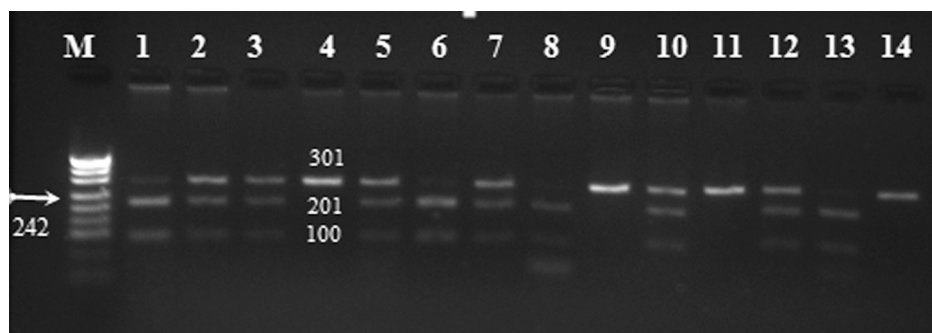


Рис. 1. Электрофореграмма амплификата гена *LTF* после рестрикции эндонуклеазой *EcoRI*

Для генотипирования по локусу лактоферрина используется эндонуклеаза *EcoRI*, которая имеет сайт рестрикции *GAATTC* и продукт амплификации длиной 301 п. н. после рестрикции амплификата рестриктазой *EcoRI* образуются два фрагмента длиной 201 п. н. и 100 п. н. Как видно электрофореграмме, лунка 1 — ДНК маркер, лунки 1, 6, 8, 13 животные с генотипом АА, лунки 2, 3, 5, 7, 10, 12 с генотипом АВ и лунки 4, 9, 14 с генотипом ВВ (рис. 1).

Для амплификации нужного фрагмента гена *GDF9* A485T были использованы праймеры, разработанные авторами Tang K. Q. и др. (2013), которые имеют следующие последовательности:

прямые F: 5'-AGGGAAGAAGAAAGATCTTTTGC-3'  
обратные R: 5'-TCTACCCAGGCTTTAGTCCC-3'.

Использование данной пары праймеров позволяет амплифицировать участок гена *GDF9* длиной 208 пар нуклеотидов. В данном случае для генотипирования животных применяется рестриктаза *NsiI*, которая имеет сайт рестрикции *ATGCA/T*.

Для детекции второй точечной мутации в интронной части изучаемого гена A625T нами были использованы праймеры:

прямые F: 5'-ATGCCCTCATGGGTGATGTAGGCTA-3'  
обратные R: 5'-CTCCCATCTCTCTCATACACACAAG-3'.

Комплементарность последовательностей вышеуказанных праймеров нами были проверены с помощью компьютерной программы, обе пары праймеров оказались комплементарными исследуемому участку гена *GDF9*. Рестрикцию продукта ПЦР во втором опыте проводили с помощью рестриктазы *DraI*, которая имеет сайт рестрикции *TTT/AAA*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего генотипировано 88 животных (голштинская порода) ТОО «Байсерке-Агро», частота генетических вариантов по локусу лактоферрина составила: с генотипом АА — 28 животных (31,8%), АВ — 54 животных (61,3%) и ВВ — 6 животных (6,8%). Диагностику на субклинический мастит проводили методом подсчета соматических кле-

ток в молоке коров с помощью прибора Fossomatic 5000 и димастиновой пробы, по результатам исследования у 12 животных был выявлен субклинический мастит. Они имели гетерозиготный генотип АВ по локусу лактоферрина и полученные результаты соответствуют литературным данным.

Так, по локусам A485T и A625T гена фактора роста и дифференцировки (*GDF9*) у исследуемой популяции животных выявлены все три генетических варианта генотипа, однако из-за небольшой не выявлена корреляция между генетическими вариантами гена *GDF9* и репродуктивной функцией у *Bos Taurus L*.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, результаты нашего исследования по изучению полиморфизма гена лактоферрина у млекопитающих (*Bos Taurus L*), показывают, что существует положительная корреляционная связь между генетическим вариантом АВ лактоферрина и заболеваемостью субклиническим маститом. Использование метода полимеразной цепной реакции совместно с ПДРФ позволяет в течение 5–6 часов провести генотипирование животных по локусам A485T и A625T гена фактора роста и дифференцировки (*GDF9*). Таким образом, представляется перспективным поиск фармакологических средств на основе новых данных о полиморфизме генов лактоферрина и фактора роста и дифференцировки (*GDF9*).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Barzegari A., Atashpaz S., Ghabili K., Nemati Z., et al. Polymorphisms in *GDF9* and *BMP15* associated with fertility and ovulation rate in Moghani and Ghazal sheep in Iran. *Reprod. Domest. Anim.* 2010; 45: 666–9.
2. Sharifzaden A., Doosti A. Study of Lactoferrin Gene Polymorphism in Iranian Holstein Cattle Using PCR-RFLP Technique. *Global Veterinaria.* 2011; 6 (6): 530–6.

3. Schwerin M., Toldo S.S., Eggen A., Brunner R.M., Seyfert H.M., Fries R. The bovine lactoferrin gene (LTF) maps to chromosome 22 and syntenic groupU12. *Mammalian Genome*. 1994; 5, 486–9.
4. Tang K.Q., Yang W.C., Li S.J. and Yang L.G. Polymorphisms of the bovine growth differentiation factor 9 gene associated with superovulation performance in Chinese Holstein cows. *Genetics and Molecular Research*. 2013; 12 (1): 390–9
5. Wang T.T., Wu Y.T., Dong M.Y., Sheng J.Z. et al. G546A polymorphism of growth differentiation factor-9 contributes to the poor outcome of ovarian stimulation in women with diminished ovarian reserve. *Fertil. Steril.* 2010; 94: 2490–2.

#### ◆ Информация об авторах

*Прошин Сергей Николаевич* — д-р мед. наук, профессор, заведующий, кафедра фармакологии. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: psnjsn@rambler.ru.

*Усенбеков Есенгали Серикович* — канд. биол. наук, доцент, заведующий, кафедра клинической ветеринарной медицины. Казахский национальный аграрный университет. 150013, Алмааты, пр. Абая, д. 8, Республика Казахстан. E-mail: usen03@mail.ru.

*Шакибаев Ерден Бахитбекович* — аспирант, кафедра клинической ветеринарной медицины. Казахский национальный аграрный университет. 150013, Алмааты, пр. Абая, д. 8, Республика Казахстан. E-mail: shakibaev.erden@mail.ru.

*Бименова Жанат Жолшыбайкызы* — аспирант, кафедра клинической ветеринарной медицины. Казахский национальный аграрный университет. 150013, Алмааты, пр. Абая, д. 8, Республика Казахстан. E-mail: 070702007@mail.ru.

*Жумаханова Раиса Мухамедияровна* — старший преподаватель, кафедра акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства. Казахский национальный аграрный университет. 150013, Алмааты, пр. Абая, д. 8, Республика Казахстан. E-mail: usen03@mail.ru.

*Глушаков Руслан Иванович* — канд. мед. наук, доцент, кафедра фармакологии. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: glushakovruslan@gmail.com.

*Дементьева Наталья Викторовна* — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, отдел биотехнологии, лаборатория молекулярной цитогенетики. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных» Минздрава России. 196601, Пушкин, Санкт-Петербург, Московское шоссе, д. 55а. E-mail: dementevan@mail.ru.

*Proshin Sergei Nikolaevich* — MD, PhD, Dr Med Sci Professor, Head. Department of pharmacology. St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: psnjsn@rambler.ru.

*Usenbekov Essengali Serikovich* — PhD, Associate Professor, Head. Department of Clinical Veterinary Medicine. Kazakh Agrarian National University. 8, Abaya prospect, Almaaty, 150013, Republic of Kazakhstan. E-mail: usen03@mail.ru.

*Shakibaev Erden Bakhitbekovich* — Postgraduate Student. Department of Clinical Veterinary Medicine. Kazakh Agrarian National University. 8, Abaya prospect, Almaaty, 150013, Republic of Kazakhstan. E-mail: shakibaev.erden@mail.ru.

*Bimenova Zhanat Zholshybaikyzy* — Postgraduate Student. Department of Clinical Veterinary Medicine. Kazakh Agrarian National University. 8, Abaya prospect, Almaaty, 150013, Republic of Kazakhstan. E-mail: 070702007@mail.ru.

*Zhumakhanova Raisa Mukhamediyarovna* — Senior teacher. Department of Obstetrics, Surgery and Reproduction Biotechnology. Kazakh Agrarian National University. 8, Abaya prospect, Almaaty, 150013, Republic of Kazakhstan. E-mail: usen03@mail.ru.

*Glushakov Ruslan Ivanovich* — MD, PhD, Associate Professor. Department of pharmacology. St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: glushakovruslan@gmail.com.

*Dement'eva Natal'ya Viktorovna* — PhD, Senior researcher. Department of pharmacology. Department of biotechnology of the Laboratory of molecular cytogenetics. Federal research institute for farm animal genetics and breeding. 55a, Moskovskoye shosse, Pushkin, St. Petersburg, 196601, Russia. E-mail: dementevan@mail.ru.