

ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ ЗАМЕН В ГЕНАХ *ССК* И *ССК2R* У НЕКОТОРЫХ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА РОССИЙСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

© 2019 г. Е. А. Климов^{1,2,*}, О. И. Рудько², Ю. А. Столповский³

¹Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий
Российской академии наук, Москва, 127422 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра генетики,
кафедра высшей нервной деятельности, Москва, 119234 Россия

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: klimov_eugene@mail.ru

Поступила в редакцию 07.08.2018 г.

После доработки 14.09.2018 г.

Принята к публикации 24.09.2018 г.

Выявлены частоты аллелей трех замен в генах *ССК* (rs42891945 и rs42891946) и *ССКВВ* (rs42670352) у трех пород российской селекции, различающихся по продуктивности: голштинской (молочная), бестужевской (мясо-молочная) и калмыцкой (мясная). Наиболее перспективной для дальнейших ассоциативных исследований является замена rs42670352 в гене *ССКВВ*.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, *ССК*, *ССК2R*, частоты аллелей.

DOI: 10.1134/S0016675819060067

Несмотря на большое количество уже охарактеризованных ДНК-маркеров продуктивности крупного рогатого скота (КРС) [1] и активное использование маркер-ориентированной и геномной селекций [2, 3], поиск новых ДНК-маркеров продуктивности остается актуальной задачей. В этом плане ДНК-маркеры, ассоциированные с регуляцией пищевого поведения (ПП) и функций желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), представляют несомненный интерес. Регуляция ПП и функций ЖКТ – сложный и многоступенчатый процесс, наиболее хорошо изученный у человека и модельных животных [4, 5], но мало изученный у КРС. Особая роль в регуляции ПП принадлежит нейроэндокринным пептидам [6]. Одним из наиболее важных и хорошо изученных нейроэндокринных пептидов является холецистокинин-8 (ХЦК-8, cholecystokinin-8, ССК-8) [7]. Между тем, всего в двух работах упоминаются полиморфные варианты генов, кодирующих препрохолецистокинин (*ССК*) [8] и его рецептор (*ССКВВ*) [9].

Целью данной работы был анализ частот аллелей двух замен в гене *ССК* и одной замены в гене *ССКВВ* у трех разводимых в России пород КРС.

В работе использован 381 образец тотальной ДНК, выделенной из цельной крови животных следующих пород: голштинская (молочная, $n = 201$), бестужевская (мясо-молочная, $n = 88$) и калмыцкая (мясная, $n = 92$).

Исследованные замены были отобраны исходя из их функционального значения с использованием сервиса Genomatix (<http://www.genomatix.de/>).

Для проведения генотипирования животных методом ПЦР-ПДРФ использовались наборы реагентов Diatom™ Prep200 для выделения ДНК из цельной крови и GenePak™ PCR Core для проведения ПЦР (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия). Рестрикционный анализ продуктов ПЦР проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции FauI (ген *ССКВВ*) и FokI (ген *ССК*, обе замены) (Fermentas, Литва). Анализ продуктов ПЦР-ПДРФ проводили в 2%-ном агарозном геле. Функции замен дополнительно анализировали с использованием VEP tool [10] и PROVEAN tool [11]. Частоты замен сравнивали с использованием критерия Пирсона (χ^2 -тест) (табл. 1).

Полученные нами частоты аллелей генов *ССКВВ* и *ССК* представлены в табл. 2.

Синонимичная замена A/C (rs42670352) в пятом экзоне гена *ССКВВ* по всей видимости не влияет на функцию белка. Однако данная замена отсутствует у животных бестужевской породы. Частоты аллелей у калмыцкой и голштинской пород одинаковы и достоверно отличаются от представленных в базе данных ($p < 0.001$). В литературе частоты данной замены у пород мясного направления значимо отличаются от полученных нами и представленных в базе данных ($C = 0.04$) [9].

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных в работе

Ген, замена	Последовательность праймеров	$T_{отжига}, ^\circ\text{C}$	Размер продуктов рестрикции, пн
<i>ССКBR</i> A/C (rs42670352)	F: AGGGGCGGGACATAAAGTG R: CGCAGACATCTCCAATGCAG	57	A = 173 + 29 C = 98 + 75 + 29
<i>ССК</i> C/T (rs42891945)	F: GTCAGGCCTGGAGACAGAAG R: GCGCAGCCGATGCCTC	58	C = 128 + 76 T = 106 + 76 + 22
<i>ССК</i> A/G (rs42891946)	F: ATAGATTGAGGTGGCTGCTGGGAG R: CTGAAGACGGGGAGCTTCGC	64	A = 101 + 68 G = 169

Таблица 2. Частоты встречаемости аллелей генов *ССКBR* и *ССК*

Ген, замена	Аллели	Частота аллелей			База данных*
		бестужевская (n = 88)	калмыцкая (n = 92)	голштинская (n = 201)	
		$P \pm S(p)$	$P \pm S(p)$	$P \pm S(p)$	P
<i>ССКBR</i> rs42670352	A	1.000	0.650 ± 0.076	0.647 ± 0.045	0.562
	C	0.000	0.350 ± 0.076	0.353 ± 0.045	0.438
<i>ССК</i> rs42891945	C	0.980 ± 0.021	1.000	0.990 ± 0.009	0.938
	T	0.020 ± 0.021	0.000	0.010 ± 0.009	0.062
<i>ССК</i> rs42891946	A	0.950 ± 0.033	0.898 ± 0.046	0.871 ± 0.032	0.750
	G	0.050 ± 0.033	0.102 ± 0.046	0.129 ± 0.032	0.250

Примечание. n – объем выборки, P – частота аллеля, S(p) – стандартная ошибка, * – по данным NextGen Project (иранская популяция).

Полиморфный вариант C/T (rs42891945) во втором экзоне гена *ССК* приводит к замене валина на метионин в позиции 50 а.к. (p.Met50Val). Замена является нейтральной (PROVEAN score = -0.638). Данная замена отсутствует у животных калмыцкой породы, а содержание минорного аллеля T у бестужевской и голштинской пород незначительное (достоверно отличается от представленных в базе данных ($p < 0.001$)).

Замена A/G (rs42891946) в 5'-регуляторной области гена *ССК* приводит к потере сайтов связывания транскрипционных факторов ZNF143 и YY1, что может приводить к ослаблению функции промотора гена (по данным сервиса Genomatix). Данная замена присутствует у животных всех трех пород (табл. 2). Частоты аллелей у животных пород калмыцкая и голштинская не различаются, но достоверно отличаются от частот аллелей у животных бестужевской породы ($p < 0.001$). Частота аллеля G гена *ССК* у отечественных пород достоверно ниже представленных в базе данных частот ($p < 0.001$).

Наиболее интересной с точки зрения дальнейших ассоциативных исследований является замена rs42670352 в гене *ССКBR*. Этот J ген упоминается в литературе как ассоциированный с параметрами мясной продуктивности. Минорный

аллель G замены rs42670352 ассоциирован со снижением ежедневного потребления сухого вещества ($p = 0.011$) и снижением остаточного потребления корма ($p = 0.024$) [9]. Возможно, данная замена влияет на такие процессы, как эффективность трансляции (уровень сродства кодона транспортной РНК, скорость прохождения мРНК через рибосому и т.д.) или время жизни мРНК. Выяснение этого вопроса требует дальнейших исследований.

Таким образом, нами впервые определены частоты аллелей генов *ССК* (rs42891945 и rs42891946) и *ССКBR* (rs42670352) у трех пород российской селекции, различающихся между собой по продуктивности: голштинской (молочная), бестужевской (мясо-молочная) и калмыцкой (мясная). У всех исследованных пород нет статистически значимых различий между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью ($\chi^2 < 0.07$).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юдин Н.С., Воевода М.И. Молекулярно-генетические маркеры экономически важных признаков у

- молочного скота // Генетика. 2015. Т. 51. № 5. С. 600–612.
2. *Abd El-Hack M.E., Abdelnour S.A., Swelum A.A., Arif M.* The application of gene marker-assisted selection and proteomics for the best meat quality criteria and body measurements in Qinchuan cattle breed // *Mol. Biol. Rep.* 2018. V. 45. № 5. P. 1445–1456.
 3. *Weller J.I., Ezra E., Ron M.* Invited review: A perspective on the future of genomic selection in dairy cattle // *J. Dairy Sci.* 2017. V. 100. № 11. P. 8633–8644.
 4. *Furness J.B., Rivera L.R., Cho H.J. et al. B.* The gut as a sensory organ // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013. V. 10. № 12. P. 729–740.
 5. *Prinz P., Stengel A.* Control of food intake by gastrointestinal peptides: mechanisms of action and possible modulation in the treatment of obesity // *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2017. V. 23. № 2. P. 180–196.
 6. *Sobrinho Crespo C., Perianes Cachero A., Puebla Jimenez L. et al.* Peptides and food intake // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2014. V. 5. Article 58. P. 1–13.
 7. *Owyang C., Heldsinger A.* Vagal control of satiety and hormonal regulation of appetite // *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2011. V. 17. № 4. P. 338–348.
 8. *Dias M.M., Canovas A., Mantilla-Rojas C. et al.* SNP detection using RNA-sequences of candidate genes associated with puberty in cattle // *Genet. Mol. Res.* 2017. V. 16. № 1. P. 1–17.
 9. *Abo-Ismael M.K., Kelly M.J., Squires E.J. et al.* Identification of single nucleotide polymorphisms in genes involved in digestive and metabolic processes associated with feed efficiency and performance traits in beef cattle // *J. Anim. Sci.* 2013. V. 91. № 6. P. 2512–2529.
 10. *McLaren W., Pritchard B., Rios D. et al.* Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor // *Bioinformatics.* 2010. V. 26. № 16. P. 2069–2070.
 11. *Choi Y., Sims G.E., Murphy S. et al.* Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 10. P. e46688.

The Frequencies of Alleles of Single Nucleotide Substitutions in *CCK* and *CCK2R* Genes in Some Russian Cattle Breeds

E. A. Klimov^{a, b, *}, O. I. Rudko^b, and Yu. A. Stolpovsky^c

^aCenter of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies, Moscow, 127422 Russia

^bDepartments of Genetics and Higher Nervous Activity, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^cVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: klimov_eugeny@mail.ru

Frequency of alleles of three substitutions in genes *CCK* (rs42891945 and rs42891946) and *CCKBR* (rs42670352) was revealed in three breeds of Russian cattle: Holstein (dairy), Bestuzhev (meat-dairy) and Kalmyk (meat). The most promising for further associative studies is the replacement of rs42670352 in the *CCKBR* gene.

Keywords: cattle, *CCK*, *CCK2R*, allele frequencies.