

ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ *DGAT 1* ТА *PIT 1* У ТВАРИН ЗНИКАЮЧОЇ БУРОЇ КАРПАТСЬКОЇ ПОРОДИ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Наталія МОХНАЧОВА

У статті представлені результати дослідження структурних генів у тварин бруї карпатської породи корів, які асоціюються з продуктивністю: *DGAT1* (Діацилгліцерол *O*-ацилтрансфераза 1) і *PIT1* (гіпофізарний фактор транскрипції). Для дослідження використали 30 зразків ДНК, виділеної із венозної крові корів бруї карпатської породи за допомогою набору «ДНК Сорб-Б» (AmpliSens). Генотипування проводили, використовуючи аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР-ПДРФ). За результатами проведеного дослідження виявлено, що поліморфізм генів *DGAT1* та *PIT1* представлений алелями *DGAT1^A*, *DGAT1^K* та *PIT1^A*, *PIT1^B* і відповідно генотипами *DGAT1^{KA}*, *DGAT1^{KK}* та *PIT1^{AA}*, *PIT1^{AB}*, *PIT1^{BB}*. Для гена *DGAT1* ампліфікований фрагмент розміром 411 п. н. обробляли рестриктазою *CfrI*. Встановлено висока частота алеля *DGAT1^K* – 0,585 і децю нижча частота алеля *DGAT1^A* – 0,415. Під час дослідження гена *PIT1* продукт ампліфікації (451 п. н.) обробляли ферментом рестрикції *HinfI*. Виявлено, що частіше зустрічався алель *PIT1^B* (0,81) і гомозиготний генотип *PIT1^{BB}* (0,67). Результати дослідження є цінними у зв'язку з різким скороченням чисельності малочисельних та аборигенних популяцій і виникнення загрози зникнення власних генетичних ресурсів сільськогосподарських видів.

Ключові слова: корови, поліморфізм, гени, діацилгліцерол-*O*-ацилтрансфераза 1, гіпофізарний фактор транскрипції, алель.

Відділ генетики та біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця Національної академії аграрних наук України, вул. Бориспільська, 3, с. Чубинське, Київська обл., 08321, Україна; e-mail: nataliia.mokhnachova82@gmail.com

The study of *DGAT1* and *PIT1* polymorphism in animals of the endangered Brown Carpathian Cattle Breed. Mokhnachova N.

The article presents the results of the study of structural genes in Brown Carpathian cows that are associated with productivity: *DGAT1* (Diacylglycerol *O*-acyltransferase 1) and *PIT1* (pituitary transcription factor). The study used 30 samples of DNA isolated from the venous blood of Brown Carpathian cows using the «DNA Sorb-B kit» (AmpliSens). Genotyping was performed using polymerase chain reaction (PCR-PCR) polymorphism analysis of restriction fragment lengths. As a result of the research, it was found that the polymorphism of the *DGAT1* and *PIT1* genes is represented by alleles *DGAT1^A*, *DGAT1^K* and *PIT1^A*, *PIT1^B* and, accordingly, by the genotypes *DGAT1^{KA}*, *DGAT1^{KK}* and *PIT1^{AA}*, *PIT1^{AB}*, *PIT1^{BB}*. For the *DGAT1* gene, an amplified fragment of 411 bp. treated with *CfrI* restriction enzyme. A high frequency of the *DGAT1^K* allele was established at 0.585 and a slightly lower frequency of the *DGAT1^A* allele at 0.415. When studying the *PIT1* gene, the amplification product (451 bp) was treated with the restriction enzyme *HinfI*. It was found that allele B (0.81) and homozygous genotype *PIT1^{BB}* (0.67) were more common. The results of the study are valuable in connection with the sharp reduction in the number of small and aboriginal populations and the threat of extinction of the own genetic resources of agricultural species.

Key words: cows, polymorphism, genes, diacylglycerol-*O*-acyltransferase 1, pituitary transcription factor, allele.

Department of Genetics and Biotechnology of the Institute of Animals Breeding and Genetics nd. a. M.V. Zubets National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, 3, Boryspilska str., Chubinske, Kyiv region, 08321, Ukraine; e-mail: nataliia.mokhnachova82@gmail.com

Вступ

Переважна більшість господарсько-корисних ознак контролюються великою кількістю генів – локусами кількісних ознак (QTL). Молекулярно-генетичні технології дають змогу ідентифікувати генетичні мутації в QTL, які пов'язані з бажаними ознаками великої рогатої худоби та визна-

чають її генетичний потенціал. Молочна продуктивність належить до таких якісних ознак, які контролюються комплексом генетичних локусів (Charoensawan et al. 2010). Серед таких локусів – гени білків молока та гени гормонів пролактину

і соматотропіну, які визначають розвиток тварин, підготовку до лактації та стимулюють саму лактацію. Одними з таких важливих ДНК-маркерів є гени діацилгліцерин О-ацилтрансферази (*DGATI*) та гіпофізарний фактор транскрипції *PIT1*.

Діацилгліцерол О-ацилтрансфераза 1 (*DGATI*) є одним із ключових ферментів біосинтезу тригліцеридів. Ген *DGATI* великої рогатої худоби картовано в центромірній ділянці 14-ї хромосоми. Серед відомих алельних варіантів гена *DGATI* великої рогатої худоби мутація GC→AA в позиції 10433/10434 (відповідно до нумерації послідовності GenBank no. AJ318490) призводить до негомологічної заміни 232-го амінокислотного залишку (A→K) – K232A поліморфізм. Ряд досліджень показав зв'язок алеля *DGATI^K* з підвищеним вмістом насичених жирів у молоці та м'ясі великої рогатої худоби (Armitage et al. 2019).

Гіпофізарний фактор транскрипції *PIT1* (офіційна назва *POU1F1*) активує транскрипцію генів: пролактину (*PRL*), соматотропіну (*GH*), рецептора соматотропін-релізінг гормона (*GHRH*), бета-субодиниці рецептора тиреоїдного гормона (*THRB*) та бета-субодиниці рецептора тиреотропного гормона (*TSH*) (Parmentier I. et al., 1999). Ген *PIT1* великої рогатої худоби розташований в центромірній зоні хромосоми 1 між локусами *TGLA57* та *RM95*. На сьогодні виявлено кілька варіантів гена *PIT1*, що визначаються точковими мутаціями. Три мутації – *PITLI3H* (C- та D-алелі), *PITLI3N* (M- та N-алелі) та *PITLI3NL* (G- та H-алелі) локалізовані

в третьому інтроні. Ці мутації виявляються за допомогою рестриктаз *Hinfl*, *Neil* і *Nlalll* відповідно. Також по одній мутації *PITLI4N* (E- та F-алелі), *PITLI5*, *PITLI6H* (A- та B-алелі) виявлено в четвертому, п'ятому інтронах і шостому екзоні гена *PIT1*. Нуклеотидні заміни в четвертому інтроні та шостому екзоні ідентифікуються ендонуклеазами *BstNI* та *Hinfl* відповідно. Алель *PIT1^B* визначає точкова мутація, що призводить до заміни аденіну на гуанін (A → G) (Dierkes et al. 1998; Zhao et al. 2004). Нами досліджений поліморфізм *PIT1-Hinfl* в області шостого ексона, вперше описаний J. Woollard (1994). Ген *PIT1* може бути інформативним маркером молочної продуктивності.

Метою роботи було провести комплексний аналіз генетичної структури групи корів зникаючої бурої карпатської породи за генами: діацилгліцерин О-ацилтрансферази (*DGATI*) та гіпофізарного фактора транскрипції *PIT 1*.

Матеріали та методика

Було досліджено зразки крові від дійних корів бурої карпатської породи з приватних домогосподарств с. Нижні Ворота Мукачівського району Закарпатської області, Україна (рис. 1). Молекулярно-генетичні дослідження проводилися на базі відділу генетики та біотехнології Інституту розведення і генетики тварин ім. М. В. Зубця НААН.

Зразки крові відбирали з яремної вени об'ємом 5 мл у вакуумні пробірки із сухим ЕДТА. Геномну ДНК виділяли згідно зі стандартною методикою, використовуючи комерційний набір «ДНК



Рис. 1. Бура карпатська порода, Закарпатська обл., Україна

Fig. 1. Brown Carpathian breed, Zakarpattia region, Ukraine

Таблиця 1. Нуклеотидні послідовності праймерів і рестриктази

Table 1. Nucleotide sequences of primers and restriction enzymes

Послідовність праймера	Ампліфікат, (п. н.)	Рестриктаза	Посилання
DGAT1			
F: 5'-GCACCATCCTCTTCCCTCAAG -3' R: 5'-GGAAGCGCTTTCGGATG-3'	411	CfrI	Winter et al. 2002
PIT1			
F: 5'-AAACCATCATCTCCCTTCTT-3' R: 5'-AATGTACAATGTGCCTTCTGAG-3'	451	HinfI	Wollard et al. 1994

Сорб-Б» (AmpliSens). Концентрацію ДНК довели до 50 нг/мкл. Поліморфізм генів *DGAT1* та *PIT1* досліджували методом ПЛР-ПДРФ (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів на основі полімеразної ланцюгової реакції). Нуклеотидні послідовності праймерів для ампліфікації та назви рестриктаз для рестрикції продуктів ампліфікації показано в табл. 1.

Умови ПЛР та схеми рестрикційного аналізу продуктів ампліфікації поліморфних ділянок досліджуваних генів наведено в табл. 2.

Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 2 мкл буфера для ДНК полімерази, 1,0 мкл суміші дНТФ («Амплісенс»), 1,0 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази (*Fermentas*, Литва). Геномна ДНК додавалась у кількості 2,0 мкл, решта ddH₂O. Загальний об'єм ДНК-суміші становив 10 мкл (Мохначова Н. 2023). Ампліфікацію ДНК проводили на програмованому чотириканальному термоциклері ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ДНК-технологія). Прилад виконаний у вигляді єдиного модуля, що об'єднує 4 незалежно керовані термоблоки. У кожному термоблоці встановлена матриця на 10 пробірок об'ємом 0,5 мл.

Продукти ПЛР обробляли специфічними рестрикційними ферментами: до 10 мкл ПЛР-продукту додавали 5 од./мкл рестриктази та 1,5 мкл рестрикційного буфера, інкубували за температури 37°C 12 год. Візуалізацію результатів проводили у 2–3%-му агарозному гелі з бромис-

тим етидієм, у 1хТВЕ-буфері за постійної напруги 100 В протягом 90 хв, з подальшою детекцією за допомогою транслюмінатора ТУВ-1 в ультрафіолетовому світлі 312 нм. Як маркери молекулярних мас використовували *GeneRuler TM 50 bp DNA Ladder* та *Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*. Аналіз результатів проводили, фотографуючи гелі цифровою камерою.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного пакета Statistica 6.0 та Exel (Microsoft Office 2007).

Результати

Ген *DGAT1* (діацилгліцерол О-ацилтрансфераза 1)

Під час проведення ПЛР за вказаних вище умов ампліфікувався фрагмент ДНК довжиною 411 п. н. Після його розчеплення рестриктазою *CfrI* на електрофореграмах з'явилися специфічні набори фрагментів (411, 208, 203 п. н.) (рис. 2). Однак аналіз 30 досліджених тварин виявив лише два генотипи *KK* та *KA*.

На рис. 2 видно, що в проаналізованих зразках частота *DGAT1^K*-алеля вища. Це відповідає результатам генетичного аналізу вивчених тварин бурої карпатської породи (табл. 3). Аallel *DGAT1^K*, асоційований із жирномолочністю, і його частота на 0,17 вища за частоту алеля *A*, які становили 0,585 і 0,415 відповідно.

На основі розподілу алельних частот *DGAT1* обчислено основні показники генетичної мінливості досліджених корів. Порівняння значень фактичної

Таблиця 2. Характеристика умов ПЛР та схеми ПДРФ-аналізу продуктів ампліфікації

Table 2. Characteristics of the PCR conditions and the PDRF analysis scheme of the amplification products

Поліморфізм	Умови ампліфікації	Генотипи та відповідні довжини рестрикційних фрагментів
DGAT1-CfrI	94 °C –4 хв; (95 °C –15 с; 58 °C –15 с; 72 °C –60 с) x 35; 72° –5 хв	<i>DGAT1-CfrI^{KK}</i> :411; <i>DGAT1-CfrI^{AA}</i> :208+203; <i>DGAT1-CfrI^{KA}</i> :411+208+203
PIT1-HinfI	95 °C –4 хв; (95 °C –45 с; 58 °C –30 с; 72 °C –60 с) x 35; 72° –10 хв	<i>Pit-1-HinfI^{AA}</i> : 451; <i>Pit-1-HinfI^{BB}</i> : 244+207; <i>Pit-1-HinfI^{AB}</i> : 451+244+207

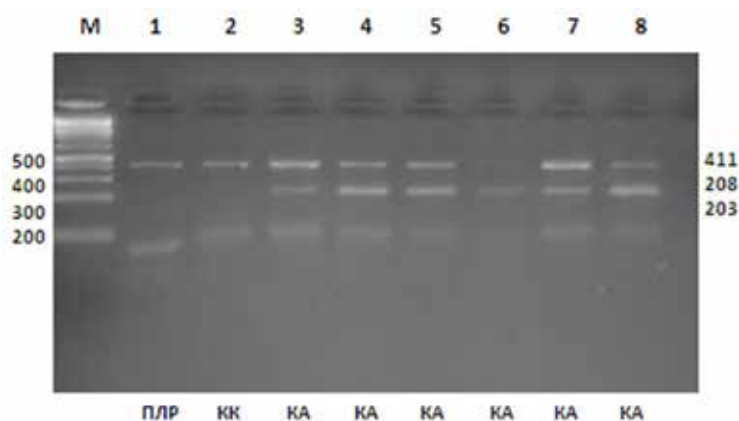


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції для визначення генотипів за геном DGAT1:

М – маркер молекулярних мас;
2–8 генотипи тварин вказані під фото

Fig. 2. Electrophoretic analysis of restriction products in the determination of genotypes by the DGAT1 gene:

M – marker of molecular weights;
2–8 genotypes of animals are indicated under the photo

і теоретичної гетерозиготності за геном діацилгліцерол О-ацилтрансферази 1 у вивчених тварин бурої карпатської худоби визначило, що фактична гетерозиготність майже вдвічі перевищувала очікувану, тобто встановлено значне переважання гетерозигот, що підтверджується від’ємними значеннями показника індивідуального індексу фіксації Райта ($F_{IS} = -0,709$).

Ген PIT1 гіпофізарного фактора транскрипції

Отриманий нами ампліфікат – 451 п. н. вивчали за допомогою рестрикційного аналізу. Після розчеплення отриманого ампліфікату ендонуклеазою рестрикції *HinfI* за наявності або відсутності сайтів рестрикції було виявлено наявність трьох генотипів: *PIT1^{AA}*, *PIT1^{AB}* і *PIT1^{BB}* (рис. 3).

Як показують дані табл. 3, серед тварин бурої карпатської худоби максимальна кількість тварин була носіями *PIT1^{BB}*-генотипа, його частота становила 67%. При цьому А-алель гена *PIT1*, який

пов’язаний із підвищеною продуктивністю, може розглядатися як рідкісний ($A = 0,19$), тому генотип *PIT1^{AA}* виявився з частотою в 5%.

Аналіз фактичного й теоретичного розподілу генотипів за геном *PIT1* методом Харді – Вайнберга не виявив порушень генної рівноваги (показник варіабельності χ^2 становив 0,24).

Висновки

1. Гени *Pit-1|HinfI* (g.1256 G > A) та *DGAT1|CfrI* (K232A A > K) у тварин бурої карпатської худоби виявилися поліморфними й інформативними як генетичні маркери. Отже, їх можна використовувати в подальшому аналізі асоціацій між маркером і певними фенотиповими ознаками, включно з ростом, розвитком і продуктивністю.

2. Отже, алельна структура генів *DGAT1* і *PIT1* може робити істотний внесок у полігенну ознаку молочної продуктивності.

Таблиця 3. Розподіл частот алелів і генотипів бурої карпатської породи ВРХ за геном діацилгліцерол О-ацилтрансферази 1

Table 3. Distribution of frequencies of alleles and genotypes of the Brown Carpathian Breed of cattle according to the diacylglycerol O-acyltransferase 1 gene

Порода	Розмір вибірки	Частота генотипів		Частота алеля		Гетерозиготність		χ^2	F_{IS}
				К	А	H_0	H_E		
Бура карпатська	30	КК	0,17	0,585±0,027	0,415±0,027	0,830	0,486	15,1	-0,709
		КА	0,83						
		АА	–						

Примітка. H_0 – фактична гетерозиготність; H_E – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності; F_{IS} – індекс фіксації Райта.

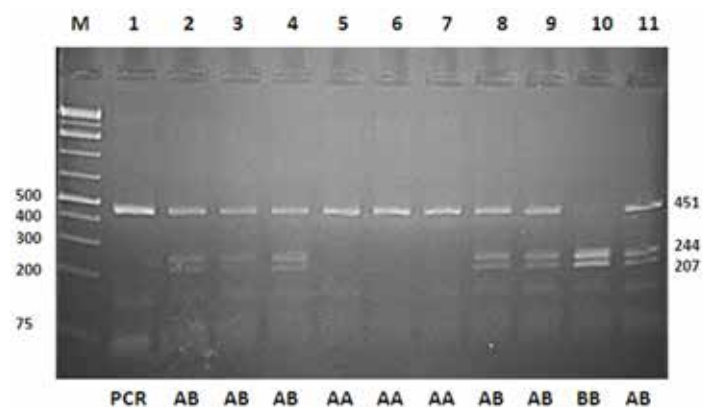


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції для визначення генотипів за геном *PIT1*:

М – маркер молекулярних мас; генотипи тварин вказані під фото

Fig. 3. Electrophoretic analysis of restriction products in the determination of genotypes by the *PIT1* gene:

M – marker of molecular weights; genotypes of animals are indicated under the photo

Таблиця 3. Розподіл частот алелів і генотипів бурої карпатської породи ВРХ за геном гіпофізарного фактора транскрипції

Table 3. Distribution of frequencies of alleles and genotypes of the brown Carpathian breed of cattle according to the pituitary transcription factor gene

Порода	Розмір вибірки	Частота генотипів		Частота алеля		Гетерозиготність		χ^2	F_{IS}
		AA	AB	A	B	H_0	H_E		
Бура карпатська	30	AA	0,05	0,19±0,022	0,81±0,022	0,280	0,308	0,24	0,090
		AB	0,28						
		BB	0,67						

Примітка. H_0 – фактична гетерозиготність; H_E – очікувана гетерозиготність; χ^2 – критерій відповідності; F_{IS} – індекс фіксації Райта.

3. Можна рекомендувати під час проведення плеємінної роботи враховувати генотипи тварин за цими генами для підвищення генетичного

потенціалу молочної продуктивності бурої карпатської худоби і збереження біорізноманіття ВРХ.

ARMITAGE, M.E., SWAN, E., O'MEARA, D. (2019) Genetic Variation of the DGAT1 gene in Dual-Purpose Dairy Cows and its Influence on Economically Important Breeding Traits. *SURE_J: Science Undergraduate Research Journal*, 1(1), Article 2.

CHAROENSAWAN, V., WILSON, D., TEICHMANN, S. (2010) Genomic repertoires of DNA-binding transcription factor across the tree of life. *Nucleic Acids Research*, 38, 7364–7377.

DIERKES, B., KRIEGESMANN, B., BAUMGARTNER, B.G., BRENING, B. (1998) Partial genomic structure of the bovine Pit1 gene and characterization of a *HinfI* transition polymorphism in exon 6. *Animal Genetics*, 29, 405.

МОКHNACHOVA, N.B. (2023) Study of the genetic structure of the population of the Ukrainian aboriginal

Lebedin breed of cows. *Acta Carpathica*, 1, 50–58. (in Ukrainian). DOI:10.32782/2450-8640.2023.1.6

PARMENTIER, I., PORTETELLE, D., GENGLER, N., PRANDI, A., BERTOZZI, C., VLEURICK, L., GILSON, R., RENAVILLE DOMEST, R. (1999) Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. *Domestic Animal Endocrinology*, 17(2–3), 139–148.

WOOLLARD, J., SCHMITZ, C.B., FREEMAN, A.E., TUGGLE, C.K. (1994) Communication *HinfI* polymorphism at the bovine PIT1 locus. *Journal of Animal Science*, 72, 32–67.

ZHAO, O., DAVIS, M.E., HINES, H.C. (2004) Associations of polymorphisms in the Pit-1 gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle. *Journal of Animal Science*, 82, 2229–2233.