

УДК 575.174.015.3:636.034

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ 337C/G ГЕНА FSHR КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Ковальчук С.Н., Бабий А.В., Бурсаков С.А.

*ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»,
Москва, e-mail: s.n.kovalchuk@mail.ru*

Одним из ключевых этапов технологии ускоренного воспроизводства крупного рогатого скота является отбор коров-доноров, наиболее чувствительных к процедуре гормональной стимуляции овуляции. К настоящему времени одним из перспективных генетических маркеров репродуктивного статуса крупного рогатого скота является ген рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR). Особое внимание привлекает однонуклеотидная замена 337C>G(rs43745234), ассоциированная с количеством оплодотворенных ооцитов и жизнеспособных эмбрионов. Целью настоящей работы являлась разработка метода дифференциации аллелей 337C/G гена FSHR крупного рогатого скота на основе ПЦР в реальном времени. В разработанном методе используются два праймера, общие для обоих аллельных вариантов гена FSHR, и два аллель-специфичных флуоресцентно-меченых зонда типа TaqMan. Идентификация аллелей 337C/G гена FSHR проводится по нарастанию флуоресценции по каналам FAM и VIC соответственно. Разработанными нами метод был валидирован ПЦР-ПДРФ анализом на 40 образцах ДНК коров черно-пестрого голштинизированного скота. Разработанный нами метод позволяет значительно сократить время проведения анализа (до 1,5 ч) по сравнению с ПЦР-ПДРФ анализом и может быть использован для быстрого генотипирования большого количества образцов ДНК крупного рогатого скота (до 480 в зависимости от модели амплификатора) по аллельным вариантам 337C/G гена FSHR с целью отбора животных, наиболее чувствительных к процедуре индукции суперовуляции.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, рецептор фолликулостимулирующего гормона, однонуклеотидный полиморфизм, генотипирование, ПЦР в реальном времени

DIFFERENTIATION OF 337C/G ALLELES OF THE BOVINE FSHR GENE BY REAL-TIME PCR

Kovalchuk S.N., Babiy A.V., Bursakov S.A.

Federal state budget scientific institution Center of experimental embryology and reproductive biotechnologies, Moscow, e-mail: s.n.kovalchuk@mail.ru

One of the crucial steps of the technology of accelerated reproduction of cattle is selection of donor cows, which are the most sensitive to the procedure of hormonal stimulation of ovulation. To date, one of the promising genetic markers of the reproductive status of cattle is the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene. Special attention is drawn to SNP 337C>G (rs43745234), associated with the number of fertilized oocytes and viable embryos. The aim of this work was to develop a method of differentiation of 337C/G alleles of bovine FSHR gene on the basis of real-time PCR. In the developed method two primers common for both alleles of FSHR gene and two allele-specific TaqMan probes were used. Identification of 337C/G alleles was performed on basis of increasing FAM and VIC fluorescence, respectively. The developed method was validated by PCR-RFLP analysis of 40 DNA samples from holsteinized Black-and-White cows. The developed real-time PCR method allows to significantly reduce the time of analysis (up to 1.5 hours) compared to PCR-RFLP analysis and can be used for rapid genotyping of allelic 337C/G variants of the FSHR gene for large number of bovine DNA samples (up to 480 DNA samples depending on the model of thermal cycler) in order to select animals that are the most sensitive to induction of superovulation.

Keywords: cattle, follicle stimulating hormone receptor, single nucleotide polymorphism, genotyping, real-time PCR

Одной из актуальных задач в области биотехнологии воспроизводства крупного рогатого скота является отбор коров-доноров, наиболее чувствительных к процедуре гормональной стимуляции овуляции и способных произвести в результате максимальное количество зрелых ооцитов [1]. С помощью методики стимуляции суперовуляции в мире ежегодно получают более 500000 эмбрионов крупного рогатого скота [2]. Несмотря на то, что в последние десятилетия в технологию трансплантации эмбрионов был внедрен ряд новых высокотехнологичных методов, эффективность процедуры стимуляции суперовуляции у коров-доноров существенно не увеличилась. Одним

из основных лимитирующих факторов развития технологии является высокая вариабельность ответа со стороны организма коров-доноров на гормональную обработку. Физиологический эффект обработки коров-доноров гонадотропинами по-прежнему остается индивидуальным и непредсказуемым [3]. Вместе с тем исследования показали, что эффективность стимуляции овуляции тесно связана с аллельными вариантами гена FSHR, кодирующего рецептор фолликулостимулирующего гормона [4, 5]. Таким образом, ген FSHR является перспективным для исследования связи точечных мутаций и способностью коров-доноров к суперовуляции.

FSHR принадлежит к классу мембранных рецепторов, связанных с G-белками, чья активация запускает сигнальный путь циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [6]. В геноме *Bos taurus* ген FSHR локализован на хромосоме 11 и состоит из 10 экзонов. Первые 9 экзонов кодируют внеклеточный домен рецептора, экзон 10 кодирует трансмембранный домен [7]. В литературе накоплены данные о связи точечных мутаций в гене FSHR (SNP, single nucleotide polymorphism) с суперовуляторным ответом на стимуляцию гонадотропинами. В гене FSHR *B. taurus* SNP были выявлены в 5'-UTR и кодирующей частях методом SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) и исследованы на предмет возможных ассоциаций с репродуктивным потенциалом у крупного рогатого скота голштинской породы [4, 8–10]. Особый интерес представляет несинонимичные замены в экзонах, поскольку такого рода изменения в первичной структуре гена влияют на последовательность и конформацию соответствующего белка. В данном контексте особое внимание привлекает однонуклеотидный полиморфизм 337C/G (rs43745234) в экзоне 4 гена FSHR, соответствующая аминокислотной замене P113A [4]. Было выявлено, что особи, гомозиготные по аллелю G (генотип G337G), характеризуются более высоким процентом жизнеспособных эмбрионов; животные с генотипами G337G и гетерозиготы (генотип G337C) имеют меньше неоплодотворенных ооцитов по сравнению с коровами, гомозиготными по аллелю C (генотип C337C) [4].

Цель исследования: разработка метода дифференциации аллелей 337C/G гена FSHR крупного рогатого скота на основе ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы исследования

ДНК выделяли из образцов цельной крови 40 коров черно-пестрого голштинизированного скота с помощью набора реагентов «М-сорб» (Синтол, Россия) согласно рекомендациям производителя. Специфичные праймеры разрабатывались на основе последовательности гена FSHR *B. taurus* (Gene ID 281172) с учетом локализации однонуклеотидной замены 337C>G (rs43745234). Для конструирования праймеров и зондов использовались программы GeneRunner, Multiple primer analyzer (<https://www.thermofisher.com/>). Олигонуклеотиды и зонды были синтезированы ООО «ДНК-синтез» (Москва, Россия).

Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл 10x буфера для HS TaqDNA полимеразы (Евроген, Россия), 2,5 мкл смеси прямого праймера FSHR-F: 5'-GAATTGAAAAGGCCAACAACC-3' и обратного праймера FSHR-R: 5'-CACCAGAATACAG AAGTTCTTACAGA-3' с концентрацией 10 мкМ, 1 мкл зонда FSHR337C: 5'-FAM-CATCGACCCTGATGCC-BHQ1-3' (10 мкМ), 1 мкл зонда FSHR337G: 5'-VIC-CATCGACGCTGATGC-BHQ1-3', 1 мкл смесь дНТФ

(5 мМ), 0,3 мкл HS TaqDNA полимеразы (Евроген, Россия), 10–30 нг ДНК. Программа для проведения ПЦР: 1-й цикл: 95°C – 3 мин; далее 40 циклов при следующих условиях: 95°C – 20 сек, 55°C – 30 сек, 72°C – 20 сек. Детекция флуоресценции проводилась на стадии отжига праймеров и зондов по каналам FAM и VIC. ПЦР и анализ результатов генотипирования проводили с использованием амплификатора LightCycler® с программным обеспечением версии SW1.1.

Валидацию разработанного метода проводили с помощью ПЦР-ПДРФ анализа. Реакционная смесь для ПЦР (общий объем 20 мкл) готовилась с использованием набора HS Taq DNA Polymerase dNTPmix (Евроген, Россия), праймеров 5'-GCTAAACTAAAACCCACCAG-3' и 5'-TGCTTTGTTTGTCTCTGATGA-3' (конечная концентрация 0,2 мкМ каждого) и 10 нг ДНК. Реакцию амплификации проводили при следующих условиях: 3 мин при 95°C (1 цикл); 15 с при 95°C, 15 с при 58°C, 15 с при 72°C (40 циклов). Рестрикционный анализ проводили в 20 мкл смеси, содержащей полученные ампликоны, 2 мкл буфера G (10x) и 0,5 мкл эндонуклеазы HgaI (СибЭнзим, Россия) в течение 16 часов при 37°C. Результаты ПЦР-ПДРФ оценивали методом электрофореза в 1,2% агарозном геле.

Результаты исследования и их обсуждение

На сегодняшний день для дифференциации аллельных вариантов генов наиболее широко используется метод ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Основными недостатками данного метода являются многостадийность анализа (амплификация полиморфного участка гена, рестрикция полученного ампликона специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов), его длительность (более 6–8 ч), вероятность недостоверных результатов в случае неоптимального соотношения количества ДНК, рестриктазы и времени рестрикции. Лимитирующим фактором для применения данного метода является отсутствие рестриктаз к необходимому полиморфному участку гена. Эффективной альтернативой ПЦР-ПДРФ анализу является метод ПЦР в реальном времени [11].

В данной работе был разработан метод дифференциации аллельных вариантов 337C/G гена FSHR методом ПЦР в реальном времени. В ПЦР используются два праймера, фланкирующие участок гена FSHR с полиморфным сайтом 337C/G, и два аллель-специфичных флуоресцентно-меченых зонда TaqMan. В ходе ПЦР происходит амплификация фрагмента гена FSHR крупного рогатого скота длиной 96 п.н. Дифференциация аллелей G337C гена FSHR основана на эффективности гибридизации аллель-специфичных флуоресцентно-меченых зондов FSHR337C: 5'-FAM-CATCGACCCTGATGCC-BHQ1-3' и FSHR337G: 5'-VIC-CATCGACGCTGAT-G-BHQ1-3' на участок ампликона, содержащего поли-

морфную позицию 337C/G. Идентификация аллелей 337C и 337G проводится по наличию флуоресценции красителей FAM и VIC соответственно. Анализ результатов генотипирования проводили с использованием программного обеспечения для амплификатора LightCycler® 96 SW1.1, которое представляет результаты генотипирования в виде графика распределения аллелей (рис. 1, Г). Для гомозиготных образцов по аллелю С337 (С337С) происходит нарастание флуоресценции по каналу FAM (рис. 1, А). Для гомозиготных образцов по аллелю G337 (генотип G337G) детектируется сигнал по каналу VIC (рис. 1, Б). Для гетерозиготного образца (генотип G337С) наблюдается нарастание флуоресценции обоих красителей (рис. 1, В). Таким образом, результаты ПЦР в реальном времени

с использованием аллель-специфичных зондов TaqMan позволяют определить присутствие каждого из исследуемых аллелей 337C/G гена FSHR в анализируемом образце ДНК и генотип животного.

Разработанный нами метод был апробирован на 40 образцах ДНК. Валидацию метода проводили с помощью ПЦР-ПДРФ анализа. Гомозиготный генотип по аллелю G (генотип G337G) характеризуется наличием на электрофореграмме одного фрагмента ДНК длиной 475 пар нуклеотида (п.н.). В электрофоретическом спектре образцов, гомозиготных по аллелю С (генотип С337С), определяются два рестриционных фрагмента (195 и 280 п.н.). Для гетерозиготных образцов (генотип С337G) характерно наличие всех трех фрагментов ДНК (195, 280 и 475 п.н.) (рис. 2).

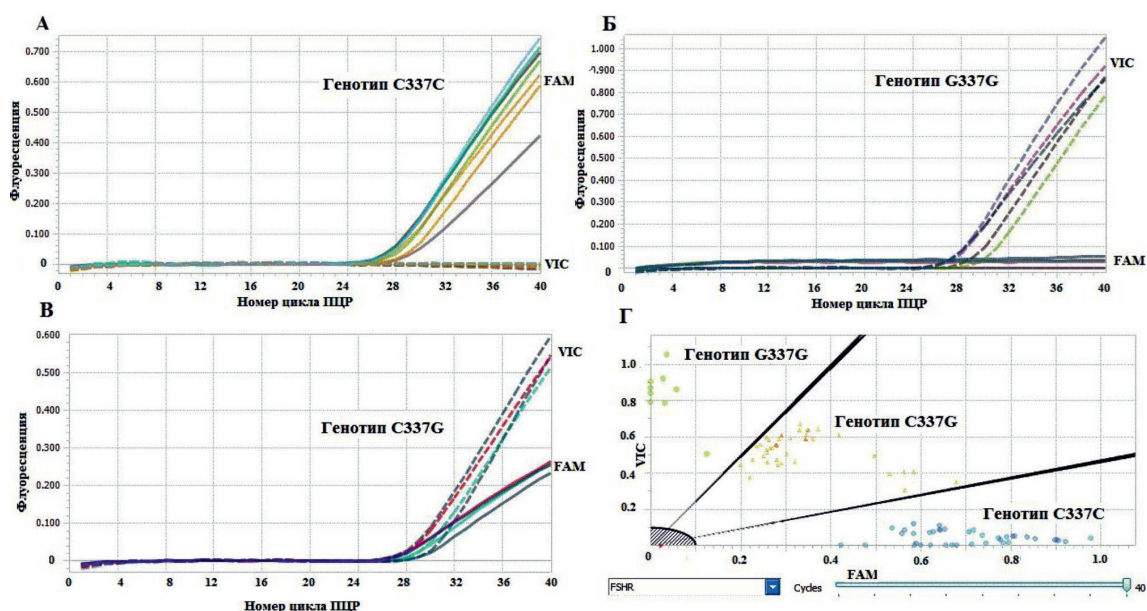


Рис. 1. А – кривые флуоресценции для гомозиготных образцов по аллелю С (генотип С337С). Б – кривые флуоресценции для гомозиготных образцов по аллелю G (генотип G337G). В – кривые флуоресценции для гетерозигот G337С. Г – график распределения аллелей 337C/G гена FSHR

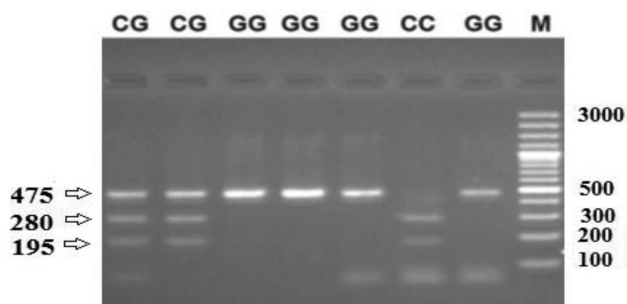


Рис. 2. Пример результатов генотипирования КРС по аллелям 337C/G гена FSHR методом ПЦР-ПДРФ

Результаты обоих методов совпали, однако разработанный нами метод на основе ПЦР в реальном времени с флуоресцентно-мечеными зондами TaqMan позволяет значительно сократить время получения результатов (до 1,5 ч) по сравнению с ПЦР-ПДРФ анализом и может быть использован для одновременного генотипирования большой выборки животных – до 480 в зависимости от модели амплификатора.

Выводы

Нами разработан эффективный метод дифференциации аллельных вариантов 337C/G гена FSHR крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени с использованием аллель-специфичных зондов, который позволяет проводить крупномасштабное генотипирование популяций крупного рогатого скота с целью отбора коров, наиболее чувствительных к процедуре индукции суперовуляции.

Список литературы

1. Bo G.A., Mapletoft R.J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*. 2014. vol. 81. no. 1. P. 38–48. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.020.
2. Rodriguez-Martinez H. Assisted reproductive techniques for cattle breeding in developing countries: a critical appraisal of their value and limitations. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012. vol. 47. P. 21–26. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01961.x.
3. Palubinskas G. et al. Superovulatory response in relation to the size and side of ovary location in high yielding dairy cows on the first day of treatment protocol. *Veterinarski arhiv*. 2016. vol. 86. no. 1. P. 65–76.
4. Cory A.T., Price C.A., Lefebvre R., Palin M.F. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine follicle-stimulating hormone receptor and effects of genotypes on superovulatory response traits. *Animal Genetics*. 2013. vol. 44. no. 2. P. 197–201. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2012.02380.x.
5. Fauser B., Diedrich K., Devroey P. Predictors of ovarian response: Progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Human Reproduction Update*. 2008. vol. 14. no. 1. P. 1–14. DOI: 10.1093/humupd/dmm034.
6. Katritch V., Cherezov V., Stevens R. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2013. vol. 53. no. 1. P. 531–556. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923.
7. Minj A. et al. Molecular characterization of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene in the Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). *General and Comparative Endocrinology*. 2008. vol. 158. no. 2. P. 147–153. DOI: 10.1016/J.YGCEN.2008.07.003.
8. Sharifiyazdi H., Mirzaei A., Ghanaatian Z. Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on some reproductive indices in dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 2018. vol. 188. P. 45–50. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.11.006.
9. Yang W.C., Li S.J., Chen L., Yang L.G. FSHR genotype affects estrogen levels but not pregnancy rates in Luxi cattle subjected to embryo transfer. *Genetics and Molecular Research*. 2014. vol. 13. No. 1. P. 1563–1569. DOI: 10.4238/2014.March.12.8.
10. Milazzotto M.P. et al. New molecular variants of hypothalamus-pituitary-gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (Nellore). *Livestock Science*. 2008. vol. 114. no. 2–3. P. 274–279. DOI: 10.1016/j.livsci.2007.05.006.
11. Ковальчук С.Н., Архипова А.Л., Андрейченко И.Н., Косовский Г.Ю. Усовершенствованный способ генотипирования крупного рогатого скота по аллелям А и К DGAT1 на основе ПЦР в реальном времени. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2017. № 4. С. 96–103.