

Министерство образования и науки Республики Казахстан

Костанайский государственный университет имени А.Байтурсынова

Кафедра биологии и химии

И.С. Бейшова

Е.В. Белая

Т.В. Поддудинская

**ДНК-МАРКИРОВАНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО
СКОТА ПО ПОЛИМОРФНЫМ ГЕНАМ СОМАТОТРОПИНОВОГО
КАСКАДА (*bPIT-1*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*)**

Учебно-методическое пособие

Костанай, 2016

УДК 636.2
Б 41

Рецензенты:

Кикебаев Набидолла Аханович - д.с.-х.н., автор муголжарской породы, директор конного завода «Қазақ тұлпары».

Рахманов Сейлхан Султанбекович - д.с.-х.н., старший научный сотрудник отдела генетики, Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства, г. Алматы.

Терлецкий Валерий Павлович – д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, г. Санкт-Петербург.

Авторы:

Бейшова Индира Салтановна - к.с.-х.н., и.о. доцента.

Белая Елена Валентиновна - к.б.н., научный сотрудник лаборатории генетики животных Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Поддудинская Татьяна Владимировна – магистрант специальности 6М080200 – Технология производства продуктов животноводства

Б 41 Бейшова И.С.

ДНК-маркирование продуктивности крупного рогатого скота по полиморфным генам соматотропинового каскада (*bPit-1*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*). Учебно-методическое пособие / И.С. Бейшова, Е.В. Белая, Т.В. Поддудинская – Костанай, 2016. – 88 с.

ISBN 978-601-7387-42-6

В учебно-методическом пособии рассматриваются методы оценки генетического потенциала продуктивности племенного поголовья крупного рогатого скота и их использование в селекции. Предназначено для специальностей 5В060700, 6М060700-Биология, 5В070100-Биотехнология, 6М080200-ТППЖ. –Костанай, 2016. – 88 с.

УДК 636.2

Утверждено и рекомендовано к изданию Учебно-методическим советом Костанайского государственного университета им. А. Байтурсынова, 20.01. 2017 г , протокол № 1.

ISBN 978-601-7387-42-6

© Бейшова И.С., 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
1 Маркер-ассоциированная селекция и ее роль в современной селекции сельскохозяйственных животных.....	7
1.1 Молекулярные маркеры: сущность, свойства и классификация.....	8
1.2 Генетическое маркирование признаков молочной продуктивности.....	13
1.2.1 Полиморфизм гена каппа-казеин (bCSN3).	14
1.2.2 Полиморфизм гена альфа-лактальбумина (α -LA).	15
1.2.3 Полиморфизм гена β -Лактоглобулина (β LG).	16
1.2.4 Полиморфизм гена пролактина (bPRL).	17
1.3 Генетическое маркирование признаков мясной продуктивности....	18
1.3.1 Полиморфизм гена тиреоглобулина (bTG).	18
1.3.2 Полиморфизм гена диацилглицерол О-ацилтрансферазы (bDGAT).	19
1.3.3 Полиморфизм гена лептина (bLep).	20
2 Маркирование молочной и мясной продуктивности по генам соматотропинового каскада.	21
2.1 Гипофизарный фактор транскрипции.....	22
2.1.1 Структура гена bPit-1.	24
2.1.2 Механизм регуляции экспрессии гена bPit-1.	24
2.1.3 Биологическая роль белка Pit-1.....	25
2.1.4 Полиморфизм гена bPit-1.	26
2.1.5 Ассоциация полиморфных вариантов гена bPit-1 с признаками мясной и молочной продуктивности.....	28
2.2 Гормон роста (GH).	31
2.2.1 Структура гена bGH. Регуляция экспрессии гена гормона роста bGH.	31
2.2.2 Характеристика белка гормона роста и его биологический эффект.	32
2.2.3 Ассоциация полиморфных вариантов гена гормона роста с признаками мясной и молочной продуктивности.	34
2.3 Рецептор гормона роста (GH R).	39
2.3.1 Структура гена рецептора гормона роста bGH R. Особенности экспрессии.	39
2.3.2 Характеристика белка рецептора гормона роста GH R и его биологическая функция.....	40
2.3.3 Ассоциация полиморфных вариантов гена рецептора гормона роста с признаками мясной и молочной продуктивности.	41
2.4 Инсулиноподобный фактор-1. Структура и экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста-1 (<i>bIGF-1</i>).....	46
2.4.1 Характеристика белка IGF-1 и биологическая роль.....	47
2.4.2 Полиморфизм гена bIGF-1 и его ассоциация с признаками мясной и молочной продуктивности.	48
3 Исследование полиморфных генов соматотропного каскада крупного	52

рогатого скота (<i>bPit-1</i> , <i>bGH</i> , <i>bGHR</i> , <i>bIGF-1</i>) методом ПЦР-ПДРФ.....	
3.1 Пробоподготовка и выделение ДНК из образца.....	52
3.2 Амплификация полиморфных фрагментов генов соматотропинового каскада (<i>bPit-1</i> , <i>bGH</i> , <i>bGHR</i> , <i>bIGF-1</i>).....	55
3.3 Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.....	57
3.4 Статистическая обработка данных для оценки эффективности маркеров.	63
Список использованных источников.....	66
Обозначения и сокращения.	87

ВВЕДЕНИЕ

С древних времен Казахстан представлял собой страну кочевников-животноводов. Именно скот для казахов во все времена был мерилом всех благ.

Но, хотя сельскохозяйственная отрасль Казахстана по ее роли в структуре и в целом в воспроизводственном процессе экономики является базовой, но приходится констатировать, что в настоящее время наша республика превратилась из экспортера в импортера мясной продукции. В стране, несмотря на увеличение выпуска всех видов мяса, импорт сохраняется. Говядина занимает самое первое место по импорту - ее в Казахстан завозят в объеме 9411,17 тонн. А между тем, одним из преимуществ отечественной сельскохозяйственной продукции является натуральность (низкая доля генетически модифицированных организмов и земель, удобряемых химическими элементами) [1]. По прогнозу экспертов Организации экономического сотрудничества и развития, с 2015 по 2025 годы в развивающихся странах опережающими темпами возрастет спрос на мясо - на 23 %. При этом, 70 % роста мирового спроса на мясо будет приходиться на азиатские государства. Учитывая такую тенденцию, наша республика должна занять определенную значимость среди мировых экспортеров мяса [2, 3].

Важно помнить, что состояние животноводства определяет уровень продовольственной безопасности государства и социально-экономическую обстановку в обществе. В своем послании Н. Назарбаев одной из десяти глобальных вызовов XXI века назвал угрозу глобальной продовольственной безопасности [4].

В связи с этим в стране началась реализация крупномасштабной программы по развитию мясного скотоводства [5]. В соответствии со Стратегией развития до 2020 года, перед агропромышленным комплексом в числе семи приоритетных секторов поставлена задача в полной мере реализовать свои отраслевые преимущества и масштабный потенциал [6]. Казахстану необходимо более эффективно использовать свои конкурентные преимущества, особенно в производстве экологически чистой продукции.

В связи с выше перечисленным, в целях реализации государственной политики, направленной на развитие агропромышленного комплекса, в рамках государственной Программы по развитию агропромышленного комплекса в Республике Казахстан на 2013-2020 гг. «Агробизнес-2020», разработаны отраслевые мастер-планы по каждому направлению развития агропромышленного комплекса. Для создания условий для развития отрасли мясного скотоводства и реализации экспортного потенциала мяса КРС в Республике Казахстан в период до 2020 года был составлен «Мастер план развития отрасли мясного скотоводства в Республике Казахстан до 2020 года». Основными задачами этого мощного государственного проекта (среди прочих) выделены:

- увеличение маточного поголовья племенного КРС мясных пород и ведение племенной работы;
- Повышение квалификации фермеров, развитие системы передачи знаний и коммерциализации технологий [3].

К основным проблемам, препятствующим развитию отрасли (среди прочих) относятся:

- низкий удельный вес племенных животных в общей численности поголовья КРС мясного направления продуктивности (8,2 %);
- недостаточное количество маточного поголовья товарного стада (по состоянию на 20 августа 2013 года – 311 тыс. голов);
- низкий уровень продуктивности и соответственно невысокий убойный выход мяса с туши (154 кг в среднем).

Поэтому среди других мер для выхода из сложившейся ситуации является создание благоприятных условий для фермерского бизнеса, с переводом маточного поголовья из ЛПХ в СХТП (фермерские и крестьянские хозяйства), а также завоз поголовья из других стран для скорейшего увеличения маточного поголовья в стране.

Однако, завозные породы, высокопродуктивные в условиях, в которых были выведены, не всегда адаптированы к условиям климата, содержания, кормления и инфекционному фону Казахстана. Это ведет к недостаточной реализации генетического потенциала на территории Республики Казахстан. Поэтому, значительную роль играют селекционные мероприятия, направленные на создание помесных пород, обладающих продуктивностью мировых лидеров и устойчивостью местных пород, веками разводимых на данной территории. А современные темпы развития мировой экономики требуют от этих мероприятий скорости и точности оценки и высокой эффективности отбора племенного поголовья в ходе их реализации.

Целью данных методических рекомендаций является обзор современных и высокоэффективных методов оценки генетического потенциала продуктивности племенного поголовья крупного рогатого скота, доступные для реализации в условиях центров племенного разведения.

1 Маркер-ассоциированная селекция и ее роль в современной селекции сельскохозяйственных животных

Развитие животноводства на современном этапе невозможно без внедрения новых биотехнологических методов оценки признаков продуктивности сельскохозяйственных животных, базирующихся непосредственно на анализе наследственной информации. Успехи в области молекулярной биологии, молекулярной генетики и геной инженерии привели к широкому использованию молекулярно-генетических методов в различных областях науки и практики, в том числе и в животноводстве [6]. В этой связи, разработка и внедрение в практическое животноводство геной диагностики (ДНК-диагностики) является актуальной задачей фундаментальной и прикладной биотехнологии, одной из областей применения которой является разведение и селекция сельскохозяйственных животных [8].

Большая часть хозяйственно ценных селекционных признаков имеет полигенный характер, т.е. контролируется множеством генов. При этом изменчивость признаков под воздействием факторов внешней среды может достигать 50 %. В то же время имеются гены или группа генов, а точнее аллели этих генов, вклад которых в проявление того или иного признака продуктивности при любых условиях среды более значителен и имеет четко выраженный эффект. Такие гены называются основными генами количественных признаков (Quantitative Trait Loci, QTL). Поэтому при оценке хозяйственно-полезных признаков продуктивности, наиболее информативным является подход позиционного картирования, позволяющий одновременно оценивать состояние многих элементов генома, представленных на всех хромосомах [9, 10]. В настоящее время это направление называется "маркер-зависимая селекция" (Marker Assisted Selection - MAS) и разрабатывается в странах с развитым животноводством [11, 12].

Становление принципов маркер-зависимой селекции связано с именем А.С. Серебровского. Еще в 20 годы прошлого века он предложил использовать фенотипические признаки с моногенным характером наследования в качестве «сигналиев» - генетических маркеров - для облегчения контроля передачи определенного генетического материала в поколениях и, соответственно, облегчения решения главной проблемы практической селекции - подбора и отбора организмов при формировании хозяйственно ценных групп [13].

Значение маркерной селекции в животноводстве сложно переоценить. Маркер-зависимая селекция обладает рядом преимуществ перед традиционными методами селекции. Она не зависит от изменчивости, обусловленной внешней средой, делает возможным оценку и отбор животных в раннем возрасте независимо от пола, не требует больших затрат, повышает интенсивность селекции. Она способствует идентификации и быстрому введению предпочтительных аллелей из ресурсных популяций в популяции-

реципиенты для повышения продуктивности и устойчивости к заболеваниям улучшаемых пород животных.

Методы селекции, в которых применяются ДНК-маркеры, разделяют на две основные группы: геномная селекция и маркер-ассоциированная селекция.

Геномная селекция (genomic selection). Метод современной селекции растений и животных, позволяющий при использовании равномерно распределенных по геному ДНК-маркеров проводить отбор по генотипу в отсутствие данных о генах, влияющих на признак.

Маркер-ассоциированная селекция предполагает использование ДНК-маркеров, тесно сцепленных с целевым геном, вместо или вместе с фенотипическим анализом. Такой подход в современной селекции растений и животных, позволяет проводить отбор по генотипу при использовании ДНК-маркеров, тесно сцепленных с селективируемым геном.

Маркеры, тесно сцепленные с целевым геном, являются надежным инструментом для предсказания фенотипа. Отбор нужного аллеля целевого гена осуществляется на основе тесно сцепленного с ним аллеля соседнего маркерного локуса. Большая точность отбора достигается при использовании пары маркеров, расположенных вблизи гена по разные стороны от него (т. е. маркеров, фланкирующих целевой ген). Если ген отсеквенирован и выявлены различия нуклеотидной последовательности разных аллелей данного гена, то можно разработать так называемый «внутригенный маркер». Использование такого маркера позволит отбирать нужные генотипы с наиболее высокой точностью. При отсутствии внутригенного или тесно сцепленного с геном ДНК-маркера можно использовать более отдаленные маркеры, однако в таких случаях целесообразно сочетать ОПМ с последующим фенотипированием. Такой комбинированный подход называется «тандемным» отбором или маркер-направленным фенотипированием [14].

Контрольные вопросы:

1. Понятия генотип и фенотип
2. Что такое QTL?
3. Кто является основоположником маркер-ассоциированной селекции?
4. Преимущества маркер-зависимой селекции

1.1 Молекулярные маркеры: сущность, свойства и классификация

В качестве маркеров предлагается рассматривать полиморфные генетические системы. Наличие полиморфизма является необходимым условием использования генетического локуса в качестве маркерного. Например, гены, кодирующие биохимические признаки, могут использоваться в качестве маркеров, если они детерминируют варианты, различающиеся по электрофоретической подвижности (продукты

полиморфных локусов представлены на электрофореграммах спектрами полос, предполагающими кодоминантную экспрессию, то есть, гетерозиготы характеризуются по крайней мере двумя полосами активности, а гомозиготы - одной полосой с различными скоростями миграции) QTL [11].

Из всех генетических маркеров наиболее информативным и удобным для использования в практической прикладной селекции является SNP (Single Nucleotide Polymorphism), так называемый снп или однонуклеотидный полиморфизм, т.е. отличие в последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, С или G), которое может быть причиной изменения последовательности чередования аминокислот в белке. В зависимости от такого изменения действие белка в цепочке биохимических реакций усиливается или ослабляется, что в свою очередь изменяет в ту или иную сторону проявление признака продуктивности. Многолетними исследованиями было установлено, что у сельскохозяйственных животных насчитывается несколько сотен тысяч таких маркеров, в среднем один на пятьдесят тысяч нуклеотидов, которые равномерно распределены по всему геному [15].

Маркерные гены используются для выявления важных для животноводства генов. Маркерные гены особенно важны, для признаков, которые фенотипически проявляются относительно поздно или только у одного пола, а также для признаков, на проявление которых оказывают влияние негенетические факторы (факторы окружающей среды). Примерами такого рода признаков являются резистентность к болезням, предрасположенность к болезням, плодовитость, молочная продуктивность. Целью маркирования является установление сцепления между основным геном и маркерным геном у животного. Так, к примеру, длина хромосомы крупного рогатого скота в среднем составляет 100 сМ, достаточно иметь три удачно расположенных маркера на хромосому: два маркера, удаленных на расстояние около 20 сМ от центромеры или теломеры, и один - в центре. Следовательно, девяносто расположенных данным образом маркерных локусов достаточно для полного картирования генома крупного рогатого скота.

В генетике животноводства большое значение для дальнейших разработок имеет тщательный выбор генотипов и структуры семьи, а также наличие банков ДНК и банков данных.

Внедрение генетических маркеров в качестве дополнительных критериев при отборе сельскохозяйственных животных ускоряет селекционный процесс и повышает его эффективность.

Молекулярные маркеры (ДНК-маркеры) – это генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК.

ДНК-маркеры являются третьим поколением генетических маркеров. Им предшествовали белковые маркеры, а еще ранее – классические генетические маркеры. Впервые теоретическое обоснование использованию генетических маркеров («сигналей») дал около века назад А.С. Серебровский: «... сигналами мы называем удобные для менделистических наблюдений альтернативные гены

с более или менее известной локализацией, которые, не оказывая воздействия на изучаемый трансгрессирующий признак и влияя достаточно определенным образом, облегчают генетический анализ этого признака, позволяя следить за наследованием того участка хромосомы, в котором эти сигналы расположены» [13]. В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. Наиболее широко используемые ДНК-маркеры перечислены на рис. 1. Их разделяют на три группы, согласно основному методу анализа: маркеры, исследуемые с помощью блот-гибридизации, ПЦР и ДНК-чипов [14].

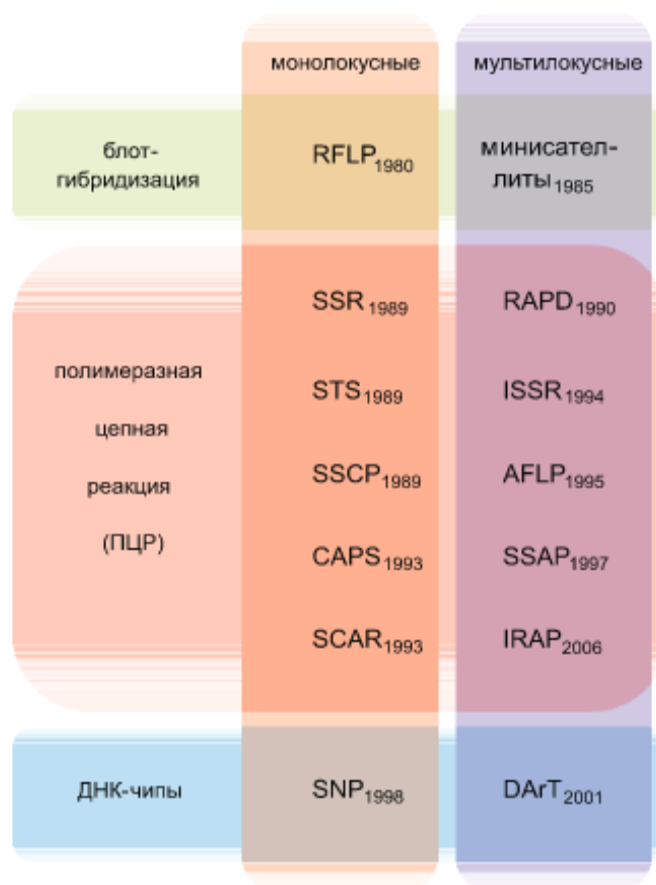


Рисунок 1 - Схематическая классификация молекулярных маркеров и год их первого упоминания в публикациях [14]

Преимуществом ДНК-маркирования является возможность использовать для анализа любые ткани и органы, независимо от стадии развития организма и имеет целый ряд преимуществ по сравнению с другими типами маркеров (таблица 1) [16].

Таблица 1. Свойства ДНК маркеров [16]

Полезные свойства	• Стабильность наследования; • Отсутствие плейотропного эффекта; • Множественность аллелей; • Информативность о природе генетических изменений; • Возможность проведения ретроспективных исследований. • Возможность тестирования любых последовательностей генома; • Повсеместность распространения; • Возможность анализа материнского типа наследования (митохондриальная ДНК); • Возможность анализа отцовского типа наследования (Y-хромосома);
Методическое удобство	• Возможность определения в любых тканях. • Возможность определения на любых стадиях развития. • Длительность хранения образцов ДНК. • Возможность использования гербарного материала, ископаемых остатков и т.п
Отсутствие ограничений в количестве маркеров	• Отсутствие ограничений в числе маркеров на образец. • Наличие маркеров для белок-кодирующих последовательностей. • Наличие маркеров для некодирующих последовательностей (интронные, межгенные, регуляторные области и другие). • Наличие маркеров для повторяющихся последовательностей

Основные классы молекулярных маркеров:

- AFLP (amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов;
- CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности;
- DArT (diversity array technology) – ДНК-чип технология для изучения разнообразия;
- IRAP (interretrotransposon amplified polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами;
- ISSR (inter simple sequence repeats) – межмикросателлитные последовательности;
- RAPD (random amplified polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК;
- RFLP (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов;
- SCAR (sequence characterized amplified region) – амплифицированная область, охарактеризованная нуклеотидной последовательностью;

- SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм.
- SSAP (sequencespecific amplification polymorphism) – полиморфизм сиквенспецифичной амплификации;
- SSCP (single strand conformation polymorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК;
- SSR (simple sequence repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты);
- STS (sequence tagged site) – сайт/локус, маркированный нуклеотидной последовательностью [14].

Данная классификация отражает процесс «эволюции» ДНК-маркеров. Первая из трех перечисленных выше групп представляет собой первое поколение ДНК-маркеров, получивших широкое распространение в 1980 годы. В 1990 годы ключевые позиции заняли ПЦР-маркеры, в 2000 годы их существенно потеснили молекулярные маркеры, основанные на использовании ДНК-чипов. В последние два-три года для анализа полиморфизма ДНК все чаще используют метод прямого секвенирования генома или его отдельных участков. К молекулярным маркерам наравне с классическими генетическими применяют термины «локус», «аллель», «доминантный», «кодоминантный». Молекулярные маркеры подразделяют на монолокусные и мультилокусные. Монолокусные маркеры наследуются чаще всего по кодоминантному типу, мультилокусные – по доминантному [14].

Маркирование полезных признаков с помощью однонуклеотидных замен у крупного рогатого скота. Поиск генетических маркеров широко ведется среди однонуклеотидных полиморфизмов – генных мутаций, обусловленных выпадением, добавкой или заменой одного нуклеотида. Маркерные SNP могут быть локализованы в пределах генов количественных признаков (генов-кандидатов) и обуславливать возникновение их аллелей с различными фенотипическими эффектами либо находиться на значительном удалении от них, но характеризоваться стабильным наследованием.

Маркерные SNP, расположенные в пределах гена-кандидата, могут оказывать различный фенотипический эффект в зависимости от локализации и характера мутации. Наибольшим эффектом обладают мутации, возникающие в областях экзонов, кодирующих аминокислотную последовательность белка, и приводящие к изменению его первичной структуры. В большинстве случаев мутации, приводящие к изменению в структуре белка или влияющие на интенсивность его экспрессии, фенотипически проявляются в виде различных патологий. В некоторых случаях измененный белок оказывается более эффективным, так как интенсифицирует обмен веществ и предоставляет его обладателю эволюционные преимущества, в случае, если это дикий вид, и селекционные преимущества, если это искусственно разводимый сорт или порода. Однонуклеотидные замены, возникающие в периферических зонах, могут затрагивать последовательности регуляторных элементов гена и таким

образом изменять эффективность его экспрессии. Мутации, возникающие в областях интронов – участков, вырезаемых в ходе посттрансляционных модификаций, чаще являются молчащими. Однако в тех случаях, когда интроны содержат регуляторные области, а также области альтернативного сплайсинга, нуклеотидные последовательности, находящиеся внутри интронов, участвуют в активации или репрессии работы гена, либо в посттрансляционных модификациях белка. В таком случае изменения нуклеотидной последовательности этих районов могут производить значительный фенотипический эффект.

Мутации, приводящие к возникновению аллелей генов, участвующих в формировании хозяйственно-полезных признаков, используются для поиска прямых ассоциаций с признаками продуктивности сельскохозяйственных животных [17 - 22].

Прежде чем внедрить использование генетических маркеров в селекцию животных, необходимо выполнить ряд мероприятий, таких как:

- 1) выделить спектр генов-кандидатов, которые могут служить молекулярно-генетическими маркерами QTL;
- 2) разработать тест-системы для анализа их аллельного полиморфизма;
- 3) определить частоты встречаемости аллельных вариантов данных генов у различных пород сельскохозяйственных животных;
- 4) провести корреляционные исследования;
- 5) оценить эффективность использования генетических маркеров в селекции.

Контрольные вопросы:

1. В каком случае гены могут использоваться в качестве генетических маркеров?
2. Что такое SNP?
3. Преимущества ДНК-маркеров

1.2 Генетическое маркирование признаков молочной продуктивности

В качестве общепринятых генов-маркеров молочной продуктивности коров выделяют гены, принимающие участие в контроле качественного состава молока: ген капа-казеина (*bCSN3*), ген лактоглобулина (*bLGB*) и α -лактальбумина (*b α -LA*), а также гены, контролирующие количественные характеристики молочной продуктивности, такие как удой, жирномолочность и белковомолочность: ген гипофизарного фактора роста-1 (*bPit-1*), ген гормона роста (*bGH*), ген рецептора гормона роста (*bGHR*) и пролактина (*bPRL*), а также ген инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*) и другие.

1.2.1 Полиморфизм гена каппа-казеина *bCSN3*

Ген, кодирующий белок каппа-казеин, локализован в шестой хромосоме, имеет размер 13 т.п.о. и состоит из пяти экзонов и четырех интронов. По своей структуре он значительно отличается от остальных казеиновых генов. Все его интроны имеют относительно большую длину, в том числе и второй интрон, который разрывает последовательность, кодирующую сигнальный пептид [23].

На сегодняшний день описано семь аллелей гена *bCSN3*: А, В, С, D, Е, F, G, Н. Наиболее часто у КРС встречаются А и В аллельные варианты гена каппа-казеина, отличающиеся двумя аминокислотными заменами в сто тридцать шестом и сто сорок восьмом положениях полипептидной цепи, вызванными соответствующими точковыми мутациями в позициях 5309 (С→Т) и 5345 (А→С). Показано, что аллель В гена каппа-казеина положительно коррелирует с более высоким содержанием общего протеина в молоке, повышенным содержанием каппа-казеина, а также лучшими сыродельными характеристиками молока. Анализ данных показал, что более твердые сыры могут быть изготовлены только из молока коров, имеющих генотип *bCSN3^{ВВ}*, также из такого молока получается больший выход сыра, чем из молока коров, имеющих генотипы *bCSN3^{АА}* или *bCSN3^{АВ}*. Также установлено, что в молоке коров, несущих ВВ-генотип по сравнению с АА-генотипом каппа-казеина процентное содержание белка выше, что является необходимым условием при производстве качественного твердого сыра. В связи с вышеперечисленным аллель В гена каппа-казеина можно использовать в качестве генетического маркера молочной продуктивности у КРС, что в свою очередь может быть использовано в селекционной практике.

На сегодняшний день во всех генетических центрах мира проводятся исследования КРС по генотипированию животных с помощью молекулярного маркера каппа-казеина, полиморфизм которого связан также с основными показателями молочной продуктивности крупного рогатого скота: с высокой удойностью коров, повышенным содержанием белков, хорошими технологическими свойствами молока.

Идентификация генотипов животных по ДНК-маркерам основного белка молока каппа-казеина направлена на повышение белковомолочности и улучшение технологических свойств молока [23].

Контрольные вопросы:

1. Какие гены являются генами-маркерами молочной продуктивности?
2. Сколько аллелей описано у гена каппа-казеина?
3. Какую из аллелей гена *bCSN3* можно использовать в качестве маркера молочной продуктивности?

1.2.2 Полиморфизм гена альфа-лактальбумина (*bα-LA*)

Альфа-лактальбумин - это важный белок сыворотки коровьего молока, а также молока других млекопитающих, кодируемый этим геном. Экспрессия гена альфа-лактальбумина повышается в ответ на гормон пролактин и приводит к повышению синтеза лактозы. Белок α-лактальбумин входит в состав гетеродимера регуляторной субъединицы синтетазы лактозы, а β-1,4-галактозилтрансфераза (beta4Gal-T1) является каталитической субъединицей. Эти белки активируют синтетазу лактозы, которая переносит остаток галактозы к молекуле глюкозы, образуя при этом дисахарид лактозу. В мономерной форме альфа-лактальбумин прочно связывает ионы цинка и кальция, что обуславливает бактерицидную и противоопухолевую функцию данного белка. Одна из форм фолдинга альфа-лактальбумина, называемая *hamlet*, вызывает апоптоз в опухолевых и недифференцированных клетках [24].

Белок - α-лактальбумин (α-LA), входящий в состав молочной сыворотки является важным признаком качества молока, характеризующим его полезные свойства. Белок α-LA — небольшой глобулярный протеин, состоящий из ста двадцати трех аминокислот и имеющий молекулярную массу четырнадцать кД, играет важную роль в биосинтезе лактозы. При участии эпителиальных клеток молочной железы, α-LA в комплексе с галактозилтрансферазой участвует в формировании фермента лактозсинтазы, который, в свою очередь, синтезирует лактозу в аппарате Гольджи, а лактоза, затем, в комплексе с α-LA секретируется в молоко. Содержание α-LA и лактозы в коровьем молоке составляет около 1,5 г/л, что соответствует 5%. Лактоза, содержащаяся в секреторных везикулах эпителиальных клеток молочных желез, создает внутри клетки повышенное осмотическое давление, благодаря которому внутрь везикул поступает вода. Таким образом, повышение концентрации α-LA, являющегося ключевым регулятором синтеза лактозы, вызывает пропорциональное увеличение выхода молока [25].

Ген, кодирующий бычий α-лактальбумин (*bα-LA*), локализован у КРС в 5 хромосоме и состоит из 2023 п.н., включая четыре экзона и три интрона. *bα-LA* характеризуется наличием нескольких полиморфных вариантов: в позициях +15, +21, +54 [23] и -1689 [26], относительно точки старта транскрипции 5' фланкирующего региона. Вариабельность в этом регионе может приводить к различной способности связывания РНК-полимеразы и факторов транскрипции, участвующих в регуляции экспрессии гена. Теоретически, замены в последовательности генетических регуляторных элементов в данном участке могут изменять степень экспрессии мРНК, кодируемой этим геном [25]. Данные полиморфизмы являются следствием точковых мутаций, в частности в позиции -1689, замена аденина на гуанин приводит к образованию двух аллельных вариантов гена. Аденин в этой позиции был обозначен как *bα-LA^A*-аллель, а гуанин — как *bα-LA^B*-аллель [25, 27]. Lundén А. с соавторами была показана взаимосвязь между (-1689) полиморфизмом и концентрацией лактозы

в молоке. Так у коров с $b\alpha-LA^{AA}$ -генотипом с 1 кг молока выделяется лактозы больше на 0,08 %, чем у особей с другими генотипами [28].

Таким образом, учитывая роль α -лактальбумина в биосинтезе лактозы и продукции молока в целом, ген $b\alpha-LA$ может быть использован как потенциальный генетический маркер молочной продуктивности КРС, в частности удойности и белковомолочности.

Контрольные вопросы:

1. Где локализован ген α -лактальбумина?
2. Какая аллель гена $b\alpha-LA$ связана с большим количеством лактозы в молоке?
3. Какова биологическая функция белка α -лактальбумина?

1.2.3 Полиморфизм гена β -Лактоглобулина ($b\beta LG$)

Бета-лактоглобулин – серосодержащий белок, являющийся, наряду с альбумином, основным белком молочной сыворотки, который не осаждается сычужным ферментом. Впервые был выделен в кристаллической форме в 1934 году из коровьего молока. При пастеризации молока β -LG денатурируется. Первичная структура этого белка была определена у КРС в 1967 году. Бета-лактоглобулин КРС состоит из ста семидесяти восьми аминокислот и имеет молекулярный вес мономера около 18300 Д. Биологическая функция β -LG предположительно состоит в транспорте витамина А, а также бета-лактоглобулин способствует перевариванию жира у новорожденных. Лактоглобулин очень стабилен к действию кислот и устойчив к действию ферментов, и, следовательно, проходит желудок без структурных и функциональных изменений, что приводит к известной аллергии на материнское молоко у новорожденных. Было доказано, что бета-лактоглобулин является основным аллергеном коровьего молока, и одним из способов снижения аллергенных свойств молока является уменьшение содержания данного белка в молоке. Поэтому перспективной технологией получения низкоаллергенного молока является идентификация животных, у которых вследствие естественного мутагенеза, произошло нарушение или снижение синтеза данного белка.

Ген $b\beta LG$ локализован в одиннадцатой хромосоме у КРС, имеет размер 4662 п.о. и состоит из семи экзонов и шести интронов. В настоящее время известно десять генетически обусловленных аллельных вариантов гена бета-лактоглобулина – А, В, С, D, E, F, G, I, J, W. Наиболее часто встречаются четыре аллеля – А, В, С и D, которые отличаются друг от друга аминокислотным составом. Редкий вариант D отличается от вариантов А, В, С, в позиции 45, имея замену аминокислоты глутаминовой кислоты на глутамин. Отличие варианта В выявляется в шестьдесят четвертой позиции, где в

результате замены второго основания триплета GAT на GGT происходит замена аспаргиновой кислоты на глицин. Вариант С характеризуется заменой последнего основания в триплете CAG на CAC, что влечет за собой образование гистидина вместо глутамина в пятьдесят девятой позиции β LG. Исследование полиморфизма локуса β LG показало, что отличие аллеля А от В определяется в шестьдесят четвертой аминокислотной позиции (аспаргиновой кислоты в А, глицин в В) и в сто восемнадцатой позиции (валина в А, аланина в В).

Установлена взаимосвязь варианта В $b\beta$ LG с высокими показателями молочной продуктивности и белковомолочности, что согласуется с результатами электрофоретического анализа белков молока, проведенного и описанного Braunschweig с соавторами. Полученные данные обсуждаются с точки зрения применения предложенного метода для оптимизации селекционных методов повышения частоты аллеля $b\beta$ LG^B в линиях КРС. Также Braunschweig и Leeb сообщают, что у животных-носителей аллельного варианта В гена β LG отмечен низкий синтез матричной РНК и, как следствие, отсутствие экспрессии данного белка. В этой связи, диагностика полиморфизма гена $b\beta$ LG, в частности обнаружение ценного аллеля В гена бета-лактоглобулина у КРС и выявление племенных животных-носителей данного аллеля является основным направлением в технологии получения высококачественного низкоаллергенного молока [29].

Контрольные вопросы:

1. В каком году впервые был выделен бета-лактоглобулин?
2. Биологическая роль белка β LG.
3. Сколько описано аллельных вариантов гена β LG?
4. Какая аллель гена бета-лактоглобулина связана с высокими показателями белковомолочности?

1.2.4 Полиморфизм гена пролактина ($bPRL$)

Ген пролактина ($bPRL$) - один из гормонов, принимающих участие в инициации и поддержании лактации у млекопитающих, и может рассматриваться как потенциальный генетический маркер молочной продуктивности крупного рогатого скота. Пролактин участвует в дифференцировке эпителиальных клеток молочной железы, инициации и поддержании лактации, регуляции синтеза молочных белков и жиров. У КРС ген $bPRL$ расположен на двадцать третьей хромосоме и состоит из пяти экзонов и четырех интронов. Установлено, что синонимичная А-Г замена, возникающая в кодоне для сто третьей аминокислоты, приводит к появлению полиморфного RsaI-сайта. Во многих исследованиях [30- 34] показана связь RsaI-генотипов гена $bPRL$ у КРС с параметрами молочной продуктивности. По литературным

данным известно, что наблюдается отрицательная зависимость жирности молока от ВВ-генотипа гена *bPRL*: количество животных с жирностью молока менее 4,5% у таких животных на 17-18% больше, чем у животных с генотипами *bPRL*^{AA} и *bPRL*^{AB}.

Гены соматотропинового каскада, такие, как ген гипофизарного фактора роста-1 (*bPit-1*), ген гормона роста (*bGH*), ген рецептора гормона роста (*bGHR*) и ген инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*) также участвуют в регуляции процесса лактации. Ниже эта информация будет рассмотрена более подробно.

Контрольные вопросы:

1. Биологическая роль белка пролактина.
2. Где локализован ген пролактина?
3. Какой генотип гена *bPRL* с низкой жирностью молока у животных?

1.3 Генетическое маркирование признаков мясной продуктивности

В настоящее время в литературе имеются сообщения о нескольких маркерных генах, связанных с липидным метаболизмом и влияющих на мясные качества крупного рогатого скота: тиреоглобулин (*bTG5*), диацилглицерол О-ацилтрансфераза (*bDGAT*), лептин, миостатин, калпаин и калпастатин.

1.3.1 Полиморфизм гена тиреоглобулина (*bTG*)

Ген тиреоглобулина находится в области центромеры четырнадцатой хромосомы КРС. Он отмечен в качестве позиционального и функционального гена-кандидата QTL мраморности мяса. Тиреоглобулин (Thyroglobulin) – гликопротеин, предшественник тиреоидных гормонов трийодотиронина (Т3) и тетрайодотиронина (Т4), участвующих в образовании жировых клеток и формировании мраморности [35]. Ген тиреоглобулина КРС был секвенирован Parma et al. (1987), наличие различных аллелей выявлено Georges et al. (1987). Ассоциативная связь мраморности с маркером CSSM66, расположенным на четырнадцатой хромосоме КРС, показана Barendse et al. (1997). Точный механизм влияния полиморфности гена на формирование качественных признаков мясной продуктивности еще неизвестен, но установлена связь его вариантов, обусловленных SNP в 5'- нетранслируемой области гена *bTG5* с мраморностью, в частности, показателем IMF в длиннейшей мышце спины [36]. Гомозиготный или гетерозиготный по дельта-тимин аллелю (*bTG5*^{TT} или *bTG5*^{CT}) скот отличается более высокой мраморностью, чем гомозиготный по дельта-цитозин аллелю (*bTG5*^{CC}). Исследования проводились в группах КРС ангусской и шортгорнской пород, результаты подтверждены также в коммерческих линиях и породе Wagyu. На рынке представлен коммерческий тест мраморности GeneSTAR®, основанный на полиморфизме гена

тиреоглобулина. Апробация проведена на поголовье более трех тысяч пятисот голов КРС с учетом породы и системы кормления. Самой высокой частотой встречаемости желательного аллеля характеризуется японская порода КРС Wagyu (76%), которая, как известно, отличается чрезвычайно высокой мраморностью мяса.

Контрольные вопросы:

1. Какие гены, связанные с липидным обменом, являются маркерами мясной продуктивности?
2. Где локализован ген тиреоглобулина?
3. С каким признаком мясной продуктивности связан ген тиреоглобулина?

1.3.2 Полиморфизм гена диацилглицерол О-ацилтрансферазы (*bDGAT*)

Содержание внутримышечного жира у крупного рогатого скота обуславливает мраморность мяса и, в конечном счете, влияет на качественные показатели мясной продуктивности. Диацилглицерол О-ацилтрансфераза (Diacylglycerol O-Acyltransferase 1, DGAT) катализирует ацилкоэнзим А-зависимое ацилирование sn-1,2-диацилглицерола (sn-1,2-diacylglycerol) для синтеза триацилглицерола (TAG). Роль *bDGAT* в липидном обмене заключается в участии фермента в процессе преобразования углеводов в жиры и сохранению их в жировых депо. Ген *bDGAT* картирован, также, как и ген тиреоглобулина, на четырнадцатой хромосоме крупного скота, то есть варианты этих генов наследуются совместно [36]. Аллели, идентифицированные Grisart et al., (2002), представляют собой динуклеотидную замену (AA/GC) в начале экзона восемь (6 829 bp) в гене диацилглицерол О-ацилтрансферазы. Мутация приводит к неконсервативной замене лизина (K) на аланин (A). (Kühn et al., 2004) Имеются данные о положительной корреляции показателей активности фермента DGAT и IMF в длиннейшей и полусухожильной мышцах в породах голштино-фризская и каролас: у животных с желательным генотипом *bDGAT*^{KK} активность DGAT была более чем в пять раз выше по сравнению с *bDGAT*^{AK} и *bDGAT*^{AA} [38]. Thaller et al. (2003) сообщают о достоверном влиянии полиморфизма этого гена на содержание внутримышечного жира [37]. Winter et al. (2002) в исследованиях показали, что животные-носители *bDGAT*^K-аллеля имеют более высокие показатели содержания молочного жира как в общем количестве, так и в процентном отношении по сравнению с *bDGAT*^{AA}-гомозиготными животными (разница между гомозиготами - до 51%) [39].

Контрольные вопросы:

1. Биологическая функция диацилглицерол О-ацилтрансферазы.
2. Какая аллель гена *bDGAT* более высокими показателями содержания молочного жира?
3. Где картирован ген диацилглицерол О-ацилтрансферазы?

1.3.3 Полиморфизм гена лептина (*bLep*)

Лептин – 16-кД-гормональный продукт гена тучности, участвует в контроле питания, расхода энергии, регулировании массы тела млекопитающих, воспроизводства и определенных функций иммунной системы [40]. Синтезируется в основном в адипоцитах и при увеличении массы тела возрастает, соответственно, его периферийная концентрация [41]. Лептин – возможно, один из лучших маркерных генов, характеризующих липидный обмен у животных и человека. Jolanta Oprzadek (2005), Geary et al. (2003) сообщают о положительной корреляции ($P < 0.01$) концентрации лептина в сыворотке крови с мраморностью мяса ($r = 0,35$ и $0,50$) в коммерческих кроссбредных линиях КРС. Buchanan et al. (2002) идентифицировали полиморфизм в кодирующей области гена лептина крупного рогатого скота в семьдесят третьей позиции от старта второго экзона: замена цитозина (С) на тимин (Т), кодирующая замену аминокислоты аргинин на цистеин (С/Т, Arg/Cys). Приводятся сведения об ассоциативной связи мутации гена лептин быка с содержанием жира в туше и уровнем лептин-мРНК. В исследованиях на четырех породах КРС показана связь аллеля *bLep^T* с высоким и аллеля *bLep^C* – с низким содержанием жира в туше, выявлена связь с повышенным жиросодержанием у мясного и с увеличенным надоем у молочного скота [42].

Гены комплекса соматотропинового каскада являются весьма перспективными для применения в маркер-зависимой селекции. Следовательно, для этих генов является перспективным поиск универсальных маркеров и мясной, и молочной продуктивности.

Контрольные вопросы:

1. Какую биологическую роль у млекопитающих играет лептин?
2. С каким признаком мясной продуктивности связан ген лептина?
3. Какая аллель гена *bLep* связана с низким содержанием жира в туше скота?

2 Маркирование молочной и мясной продуктивности по генам соматотропинового каскада

Оценка животных по генетическим маркерам является более эффективной, если в ней включены гены одного физиологического пути, так как в таком случае экспрессия одного гена влияет на экспрессию всех остальных. Следовательно, при анализе комплексного влияния полиморфизмов на исследуемые признаки, обнаруживаются парные сочетания с потенцирующим действием [43, 44].

Большой интерес для повышения мясной продуктивности крупного рогатого скота представляют гены соматотропинового каскада, белковые продукты которых являются ключевыми звеньями одной гуморальной цепи, участвующей как в процессе лактации, так и в процессах роста и развития млекопитающих (*bPit-1*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*) [45]. Следовательно, изучение полиморфизмов этих генов является перспективным с точки зрения поиска маркеров, ассоциированных с признаками и молочной, и мясной продуктивности у крупного рогатого скота.

Характеристика соматотропинового каскада. Известно, что гормон роста и целый ряд других белков (прямо или косвенно необходимых для его функционирования) обеспечивают разнообразные молекулярные и клеточные эффекты, приводящие, в конечном счёте, к развитию и росту организма [46, 47, 50]. Эти белки составляют своеобразную ось («axis») или систему, которая запускает и контролирует совокупность метаболических процессов, ведущих к росту и связанных с клеточной дифференцировкой [46 - 48].

Функционирование системы гормона роста представляется в виде целого ряда последовательных молекулярных процессов, в которых принимают участие десятки других белков/пептидов. Компоненты этой системы участвуют в запуске секреции гормона роста, его транспорте в кровотоке, в передаче гормонального сигнала в клетке – мишени (внутриклеточный сигналинг) и, наконец, в целенаправленных изменениях генной экспрессии в клетках – мишенях [47, 49 - 51]. В целом, в системе гормона роста выделяют две ветви – «основную» и «боковую» или «дополнительную», а также три специальных регуляторных звена, обусловленных действием:

- 1) соматолиберина (гипоталамический релизинг-фактор гормона роста или соматокрин, GHRH);
- 2) соматостатина (SST, SRIF);
- 3) грелина («ghrelin», GHRL).

Каждое из этих регуляторных звеньев представляет собой целую цепь молекулярных событий, влияющих на секрецию гормона роста [50]. Боковая ветвь является одним из результатов воздействия гормона роста на многие клетки – мишени, ответ которых приводит к синтезу и секреции гормоноподобного белка, получившего название инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) [46-47, 50]. Ряд авторов, подчеркивая данное обстоятельство,

включают в название системы указание на участие в ней IGF-1— система или ось ГР/ИФР. Вместе с тем не исключается возможность и независимой от гормона роста продукции IGF-1, который может играть самостоятельную роль в регуляции клеточной пролиферации [47, 52, 53].

Центральной фигурой в системе ГР/ИФР, естественно, считают сам гормон роста, который продуцируют высокодифференцированные соматотрофные клетки гипофиза. Синтез гормона роста обеспечивает ген *bGH*. Установлено, что он входит в кластер из пяти родственных генов, располагающийся на сравнительно коротком участке полинуклеотидной последовательности [54]. При реализации биологических эффектов гормона роста по основной ветви особое значение принадлежит нескольким белковым продуктам одного гена, получившего название – ген рецептора гормона роста (ген *bGHR*). Этот ген и его продукты к настоящему времени достаточно хорошо изучены [47, 50, 55, 56]. Установлено, что ген *bGHR*, направляет синтез трансмембранного белка и именно этот полноразмерный продукт (зрелый белок – 620 а.о.; предшественник – 638 а.о.), образуя функционально активный димер, выполняет роль рецептора гормона роста (РГР).

Индукцируемый ГР синтез ИФР-1 был обнаружен в клетках печени, в мышцах и в ряде других тканей, включая предстательную железу [47, 50, 51, 57, 58]. Согласно современным представлениям ИФР-1 функционирует в организме животных и человека не только как ростовой фактор, но выступает и в качестве эндокринного агента, секретируемого в кровотоки и участвующего в нормальных и патологических процессах многих клеток – мишеней [46- 48, 57].

Таким образом, регуляция синтеза гормона роста представляет собой многоуровневый каскад взаимодействий белок-рецептор, тесно связанных между собой. Нарушение, и, тем более, выпадение любого звена влечет за собой изменения в работе соматотропиновой оси, которые могут привести как к различиям в фенотипических проявлениях количественных признаков продуктивности у сельскохозяйственных животных, так и к заболеваниям, развивающимся на разных этапах онтогенеза.

Контрольные вопросы:

1. Какие гены соматотропинового каскада являются перспективными маркерами мясной и молочной продуктивности крупного рогатого скота?
2. Биологическая роль соматотропинового каскада?
3. Структура системы гормона роста.

2.1 Гипофизарный фактор транскрипции

Гипофизарный фактор транскрипции (PIT-1) участвует в регуляции экспрессии генов пролактина (*bPRL*), соматотропина (*bGH*) и тиреотропного гормона, а также регулирует дифференциацию и пролиферацию клеток

гипофиза в раннем эмбриогенезе и определяет развитие зон, ответственных за синтез соматотропина [59-62].

PIT-1 (рис.2) является членом ROU-домена, в который входит группа транскрипционных регуляторов, имеющих важную роль в дифференциации и пролиферации клеток [63]. ROU является бинарным ДНК-связывающим доменом [64]. Он включает два высоко консервативных региона [65]. Эти регионы ответственны за высокое сродство с ДНК генов соматотропина, пролактина и других. Ингибирование синтеза PIT-1 приводит к заметному снижению экспрессии генов пролактина и гормона роста и к значительному снижению пролиферации клеточных линий, продуцирующих эти гормоны

Белок PIT-1 состоит из двести девяносто одной аминокислоты, узнает мотив ATGNATA(A/T)(A/T) [66].

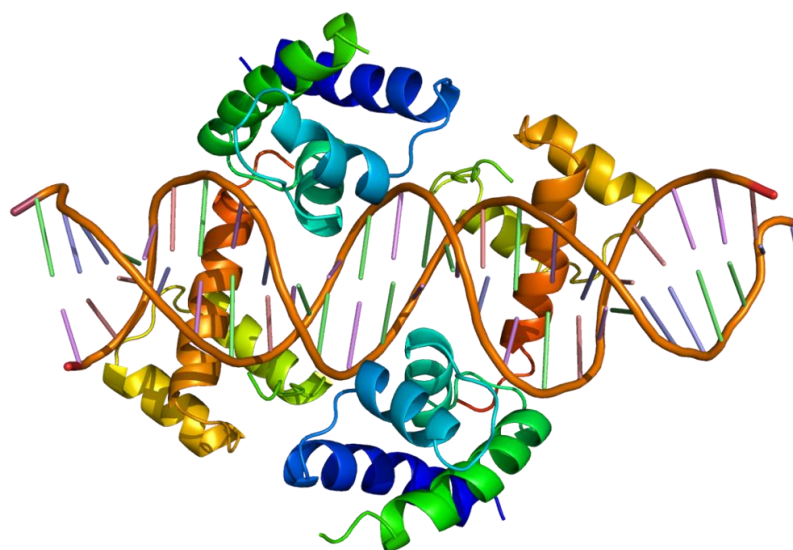


Рисунок 2 - Белок гипофизарного фактора транскрипции

Ген *bPit-1* человека больше 14 кб, расположен в локусе 3p11 [67]. Ген *bPit-1* мыши локализован в шестнадцатой хромосоме [68]. Ген *bPit-1* крупного рогатого скота расположен в центромерной зоне первой хромосомы между локусами TGLA57 и RM95 [69]. Мутации в гене *bPit-1* приводят к гипоплазии гипофиза, синдрому врожденного гипотиреоза у мышей, а также к отсутствию соматотропина [68]. Удаление из организма гена *bPit-1* приводит к эмбриональной смертности [70, 71].

У млекопитающих *bPit-1* имеет три варианта сплайсинга. Основной тип, *Pit-1-α*, два других – *Pit-1-β* и *Pit-1-γ* [72, 73]. Все варианты сплайсинга являются биологически активными. Каждый из вариантов избирательно воздействует на промоторные зоны генов мишеней. *Pit-1-α* активирует

промоторы *Pit-1-β* и *Pit-1-α*. *Pit-1-β* активирует промотор гена соматотропина [74]. *Pit-1* стимулирует экспрессию TSH-β [75, 76].

Контрольные вопросы:

1. Биологическая функция гипофизарного фактора транскрипции.
2. На какой хромосоме расположен ген *bPit-1* мышей?
3. Из скольких аминокислот состоит белок гипофизарного фактора транскрипции?

2.1.1 Структура гена *bPit-1*

Бычий ген *bPit-1* локализован на первой хромосоме [69]. Исследования структуры гена *bPit-1* показали, что он имеет шесть экзонов и его способность регулировать работу разных генов обусловлена наличием различных вариантов сплайсинга. У млекопитающих *bPit-1* имеет три различных варианта сплайсинга, основной тип - *Pit-1a*, и два других - тип *Pit-1b* и *Pit-1t* [72, 73, 77]. Все варианты сплайсинга биологически активны. Эти разные варианты по-разному воздействуют на промоторные элементы регулируемых генов. *Pit-1a* строго активизирует *Pit-1a* и *Pit-1b* промоторы [78, 79]. *Pit-1b* содержит 26-аминокислотную вставку в трансактивационном домене благодаря альтернативному сплайсингу транскрипта гена *bPit-1* и первого интрона [63, 72, 80]. В результате он утрачивает способность активировать промотор гена *bPRL* и предпочтительно активирует промотор *bGH* гена [72, 77]. *Pit-1t* содержит в трансактивационном домене инсерцию четырнадцати аминокислот, благодаря чему стимулирует только *TSH-β* ген. Такая форма экспрессируется только в клетках производных тиротрофов [74, 75]. Наличие альтернативного сплайсинга обуславливает различия в физиологическом эффекте мутаций данного гена в зависимости от места их возникновения. Участие первого интрона в образовании *Pit-1b* формы, регулирующей работу гена гормона роста, позволяет предположить, что присутствие точковых мутаций в этой области может быть ассоциировано с развитием признаков продуктивности у домашнего скота регулируемых непосредственно соматотропином.

Контрольные вопросы:

1. Структура гена гипофизарного фактора транскрипции.
2. Сколько вариантов сплайсинга имеет ген *bPit-1*?
3. Где локализован ген *bPit-1* крупного рогатого скота?

2.1.2 Механизм регуляции экспрессии гена *bPit-1*

Молекулярный механизм участия белковых продуктов экспрессии гена *bPit-1* в регуляции работы генов гормона роста и пролактина заключается в

следующем. В генах *bGH* и *bPRL* регуляторная область, расположенная выше сайта транскрипции, содержит А/Т регион общий для обоих генов и необходимый для их экспрессии [81-83]. Ген *bPit-1* был клонирован в 1988 году благодаря его афинности к этим А/Т богатым сайтам и была показана его роль в контроле транскрипции этих генов [61, 63, 66, 70]. Дальнейшие исследования показали так же его участие в регуляции экспрессии гена β -субъединицы тироид-стимулирующего гормона [84-87], гена рецептора ГН-высвобождающего гормона (growth hormone releasing hormone receptor (*bGHRH-R*)) [88]. Иммуно-гистологический анализ выявил высокую экспрессию гена *bPit-1* в трех типах клеток гипофиза: соматотрофы, лактотрофы и тиреотрофы [86, 89], которые секретируют гипофизарные гормоны ГН, PRL, и TSH- β , соответственно. Было показано, что *bPit-1* играет важную роль в дифференциации и пролиферации этих трех типов клеток [70].

Контрольные вопросы:

1. В каком году был клонирован ген гипофизарного фактора транскрипции?
2. Какую биологическую роль играет ген *bPit-1*?
3. В каких клетках гипофиза установлена высокая экспрессия гена *bPit-1*?

2.1.3 Биологическая роль белка bPit-1

Физиологическая роль белка Pit-1 в развитии клеток и секреции гормонов была продемонстрирована на мутациях гена *bPit-1* у мышей и человека. Так мутации гена *bPit-1* приводят карликовости у мышей [68]. Мутация у Snell dwarf мышей, идентифицированная как одиночная рецессивная аутосомная мутация, препятствует развитию клеток гипофиза, которые секретируют гормон роста, пролактин и тиреотропин. Это нарушает пролиферацию соматотрофов, лактотрофов и тиротрофов и приводит к отсутствию экспрессии генов гормона роста, пролактина и тиреотропина [90-92].

Другая мутация у карликовых мышей Jackson mouse представляет собой значительное изменение структуры гена *bPit-1* и отсутствию экспрессии *bPit-1* [68]. Такие мыши так же имеют недоразвитый гипофиз и характеризуются комбинированным дефицитом гормона роста, пролактина и β -субъединицы тиреотропина.

У человека и грызунов Pit-1 выполняет сходные функции. Как и следовало ожидать, возникновение мутаций в гене *bPit-1* у человека вызывает комбинированный гормональный дефицит гипофизарных гормонов сопровождающийся различными эндокринных заболеваний [93].

Имеются данные в пользу того, что мутации, возникающие в гене *bPit-1*, могут быть ассоциированы со скоростью роста, признаками мясной и молочной продуктивности у других животных, в том числе и домашнего скота. В

частности, было обнаружено, что ген *bPit-1* ассоциирован с мясными признаками у свиней [94, 95].

Контрольные вопросы:

1. К чему приводят мутации гена гипофизарного фактора транскрипции у мышей?
2. Какие последствия вызывает мутация гена *bPit-1* у человека?
3. У каких животных ген *bPit-1* ассоциируется с признаками мясной продуктивности?

2.1.4 Полиморфизм гена *bPit-1*

В настоящее время выявлено значительное количество точковых мутаций гена *bPit-1* у представителей различных пород, как мясного, так и молочного направления. Три мутации - *Pit1I3H* (С- и D –аллели), *Pit1I3N* (М- и N –аллели) и *Pit1I3NL* (G- и H –аллели), локализованы в третьем интроне. Эти мутации выявляются с помощью рестриктаз *HinfI*, *NciI* и *NlaIII*, соответственно. Так же по одной мутации *Pit1I4N* (Е- и F –аллели), *Pit1I5*, *Pit1E6H* (О- и Р –аллели) были обнаружены в четвертом, пятом интронах и шестом экзоне гена *bPit-1*. Нуклеотидные замены в четвертом интроне и шестом экзоне идентифицируются эндонуклеазами *BstNI* и *HinfI*, соответственно [76, 96].

Несколько новых мутаций гена *bPit-1* были выявлены при исследовании американской популяции голштинского крупного рогатого скота. Так, были идентифицированы три молчащие трансверсии: G→А во втором экзоне, Т→С, А→G, С→А в третьем экзоне .

Таблица 2 – Точковые мутации гена *bPit-1*

Мутация	Аллели	Рестриктаза	Место мутации
Pit1I3H	С- и D	HinfI	3 интрон
Pit1I3N	М- и N	NciI	3 интрон
Pit1I3NL	G- и H	NlaIII	3 интрон
Pit1I4N	Е- и F	BstNI	4 интрон
Pit1I5	О-и Р		5 интрон
Pit1E3H	А-и С	StuI	3 экзон
Pit1E6H	А-и В	HinfI	6 экзон

Для гена *bPit-1* идентифицирован полиморфизм, распознаваемый рестриктазой *HinfI*. Молекулярной основой для данного полиморфизма является молчащая мутация (G→А), локализованная в шестом экзоне [97]. Несмотря на то, что данная мутация не приводит к аминокислотной замене белка и теоретически не должна влиять на его физиологические свойства, рядом авторов выявлены различные виды ассоциации этого полиморфизма, как

с признаками мясной, так и молочной продуктивности у представителей разных пород. Высокая частота аллеля *bPit1-HinfI^A* (0.26, 0.757, 0.296, 0.35) была выявлена в исследованиях Moody D.E. et al. (1995), Klauzinska et al. (2001), Oprzadek et al. (2003), Dybus A. et al. (2004) Moravcikova N. et al. (2013), Тюлькин С.В [69, 99 - 102]. Низкая частота аллеля *bPit1-HinfI^A* (0.18, 0.15 и 0.15) наблюдалась в исследованиях Renaville et al. (1997), Woollard et al. (1994), Hori-Oshima и Barreras-Serrano (2003) [62, 76, 103].

В некоторых литературных источниках имеются данные о преобладании *bPit1-HinfI^B* -аллеля в группах крупного рогатого скота разных пород. В работе Dybus A. et al. (2004) по изучению генетической структуры по гену *bPit-1* в группах коров польской черно-пестрой породы частота *bPit1-HinfI^B* -аллеля составляла 0,757 [99]. Такую же частоту *bPit1-HinfI^B* -аллеля выявил Noor R. R. et. al (2015) при исследовании полиморфизма *Pit1-HinfI* в популяции крупного рогатого скота *Bos javanicus* в Индонезии [104]. Михайлова М.Е. (2008) в группе быкопроизводящих коров черно-пестрой породы зафиксировала частоту *bPit1-HinfI^B* -аллеля 0,64 [105]. Mohammad Ali E. et. al. (2009) в группе коров голштинской породы выявил частоту этого аллеля – 0,744 [106]. Hori-Oshima S. et. al установил, что доля *bPit1-HinfI^{BB}* -генотипа составляет более 71% [103].

В настоящее время работы по выявлению новых полиморфных вариантов для гена *bPit1* продолжаются.

Так, выявлены три новых полиморфизма гена: С→G замена в области первого интрона, миссенс-мутация Т→С приводящая к замене фенилаланина (ТТС) на серин (ТСС) в пятьдесят седьмом положении белка и молчащая G→A замена в области второго экзона. Данная замена детектируема с помощью метода ПЦР-ПДРФ и распознается рестриктазой TagI. Данный полиморфизм протестирован на китайских популяциях голштинского и ангусского скота, а также на животных породы Qinchuan, Jiaxian Red, Luxi. Значимой ассоциации с признаками мясной продуктивности выявлено, однако, не было [107].

W. Huang et al. (2008) при исследовании американской популяции голштинского скота так же выявлено несколько новых мутаций гена *bPit1*. В частности, ими идентифицировано три молчащие мутации: G→A замена во втором экзоне, Т→С и А→G замена в третьем экзоне. Так же в третьем экзоне ими выявлена мутация, приводящая к аминокислотной замене пролина на гистидин в семьдесят шестом положении белка. Данная одонуклеотидная замена идентифицируется с помощью метода ПЦР ПДРФ и распознается с помощью рестриктазы StuI. Рестриктаза распознает С аллель. *bPit1-StuI* полиморфизм исследован на данной популяции с целью выяснить его влияние на развитие признаков молочной продуктивности. Было отмечено, что носители редкого генотипа *Pit1-StuI^{AA}*, характеризуются большей длительностью периода лактации более высокими показателями общей молочной продуктивности [108].

Контрольные вопросы:

1. Какие мутации гена *bPit-1* известны в настоящее время?
2. Какими исследователя была отмечена высокая частота *bPit1-HinfI*^A аллеля?
3. Какое влияние на молочную продуктивность американской популяции голштинского скота оказывает редкий генотип *Pit1-StuI*^{AA}?

2.1.5 Ассоциация полиморфных вариантов гена *bPit1* с признаками мясной и молочной продуктивности

Исследования ассоциации полиморфных вариантов гена *bPit1* с признаками мясной и молочной продуктивности у крупного рогатого скота в настоящее время широко проводятся за рубежом в рамках различных селекционных программ. Такие работы в основном направлены на поиск новых мутаций и выявление их ассоциации с признаками мясной или молочной продуктивности, для какой - либо отдельной, наиболее распространенной на данной территории, породы.

Наибольший интерес с точки зрения применения в молекулярном маркировании хозяйственно полезных признаков, представляют собой мутации, приводящие либо к изменению работы гена-кандидата (возникающие в его регуляторной области), либо приводящие к изменению структуры и свойств транслируемого с этого гена белка (мутации, возникающие экзонах и приводящие к аминокислотным заменам, либо в области интронов, в случае участия их в альтернативном сплайсинге).

Основным методом их детекции является метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, применяющий рестриктазы способные распознавать уникальные последовательности нуклеотидов (нормальные или мутантные). Поэтому название исследуемого полиморфного варианта обычно включает название гена и рестриктазы используемой для его распознавания с указанием участка гена, в котором данная мутация расположена.

В настоящее время выявлено значительное количество точковых мутаций гена *bPit1* у представителей различных пород, как мясного, так и молочного направления.

Ассоциация полиморфизмов с мясной продуктивностью. Исследования ассоциации полиморфных вариантов гена *bPit1* с признаками мясной продуктивности ведутся на различных породах.

Наиболее исследованным из них является *bPit1-Hinf I* полиморфизм, впервые описанный Woollard J. (1994) [76] и впоследствии идентифицированный как молчащая G→A замена в области шестого экзона [99]. Несмотря на то, что данная мутация не приводит к аминокислотной замене белка и теоретически не должна влиять на его физиологические свойства, рядом авторов выявлены различные виды ассоциации этого полиморфизма, как

с признаками мясной, так и молочной продуктивности у представителей разных пород. Так, в работе Renaville R. (1997) данная мутация исследована на голштино-фризской породе. Редкий аллель, характеризующийся отсутствием сайта рестрикции для фермента *Hinf* обозначен как А аллель. Наиболее частый аллель, разрезаемый рестриктазой *Hinf* обозначен как В аллель. Было выявлено, что аллель *bPit1-Hinf^A* ассоциирован с повышенной продуктивностью молока, более высоким содержанием молочного белка и более высокими показателями по признакам мясной продуктивности. В то же время носители редкого аллеля характеризуются более низким содержанием молочного жира [62].

Также ассоциация данного полиморфизма с признаками мясной продуктивности исследована в следующих работах.

Renaville R. (1997) у бельгийского голубого скота определил генотип *bPit1-Hinf^{AA}*, как более редкий в исследуемой популяции. По его данным телята с генотипом *bPit1-Hinf^{BB}* обладали более высоким весом тела в возрасте семь месяцев по сравнению с телятами носителями генотипов *bPit1-Hinf^{AB}* и *bPit1-Hinf^{AA}*, в то время, как в возрасте тринадцать месяцев по показателю веса тела, предпочтительным оказался генотип *bPit1-Hinf^{BB}*. По мнению автора, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что аллель *bPit1-Hinf^B* ассоциирован с более высокой массой тела в раннем периоде постнатального развития [62].

Zwierzchowski в 2001 году при изучении мясных пород польского скота, также выявил положительную ассоциацию со скоростью роста в ранний период постнатального развития у телят носителей аллеля *bPit1-Hinf^A*. При исследовании *bPit1-Hinf I* полиморфизма у Piedmontese скота он отмечает значительно меньшую частоту встречаемости аллеля *bPit1-Hinf^A* по сравнению с другим аллелем. Им так же были исследована ассоциация данного полиморфизма со скоростью роста животных, размером и качеством мяса [109]. Однако данные об ассоциации *bPit1-Hinf^B* аллеля с весом тела телят в раннем возрасте, полученные Renaville, в исследованной популяции пьемонтского скота подтверждения не получили [110].

Rogério в 2006 году, исследуя данный полиморфизм у зебу и кроссбридного скота мясных пород обнаружил, что у представителей таких пород, как симментальская, ангусская, канхимская, и неллорская гораздо выше частота аллеля *bPit1-Hinf^A*. Исследование ассоциации аллелей с мясными признаками у этих пород показало, что для них данный полиморфизм не является молекулярным маркером мясной продуктивности [111].

Кроме того, группой ученых университета штата Огайо США под руководством профессора Дэвиса М. проведен ряд исследований ассоциации других полиморфных вариантов гена *bPit1* с признаками мясной продуктивности у представителей ангусского скота [112]. Ими было обнаружено три полиморфизма в области третьего интрона: *Pit1-Hinf I* (ААТ делеция у мутантного аллеля), *Pit1- Nla III* (G → C транзигия у редкого аллеля), и *Pit1- Nci I* и один полиморфизм в области четвертого интрона *Pit1-BstN I* (G

→Т транзигция у мутантного аллеля). Однако, ни для одного из исследованных полиморфизмов не было выявлено значительной ассоциации на со скоростью роста, ни с параметрами туши [113-115]. Так же ими был исследован ранее описанный другими авторами полиморфизм шестого экзона *Pit1-Hinf I*. Для данной мутации была выявлена значительная взаимосвязь с темпами прироста на ранних этапах пост нательного развития.

Kai Xue провел анализ между полиморфизмом *Pit1-HinfI* и чертами роста крупного рогатого скота Nanyang. Частоты аллелей в популяции составили 0.465/0.535 соответственно. Kai Xue установил превосходство коров Nanyang с *bPit1-HinfI^{BB}*-генотипом по следующим признакам: масса при рождении, средний прирост, длина тела и охват груди за шесть и двенадцать месяцев ($P < 0,05$) Также было выявлено, что вес тела в двенадцать месяцев у особей с *bPit1-HinfI^{BB}*-генотипом ($p < 0,05$) был значительно больше, чем у животных с другими генотипами. Эти результаты показывают, что аллель *bPit1-HinfI^B* гена *bPit1* положительно коррелирует с характером роста крупного рогатого скота [116].

Zwierchowski и Dybus не выявили ассоциаций вариантов гена *bPit-1* с мясной продуктивностью КРС [109, 117]. Zhao в группе мясного скота ангусской породы не выявил никаких существенных ассоциаций вариантов *bPit-1* со скоростью роста животных [96].

Ассоциация полиморфизмов с признаками молочной продуктивности.

Исследования ассоциации полиморфных вариантов гена *bPit-1* с признаками молочной продуктивности проводятся так же на различных породах, однако сводятся в основном к исследованию *bPit1-HinfI* полиморфизма.

Renaville R. (1997) в исследованиях на итальянской голштино-фризской породе показал, что коровы носители аллеля *bPit1-Hinf I^A* обладали более высокими показателями общей молочной продуктивности и более низким содержанием жира в молоке [62]. Такие же данные получены Parmentier et al. (1999) [118].

Zwierchowski L. в 2002 году также подтвердил наличие положительной ассоциации *bPit1-Hinf I^A* аллеля с ежедневной продуктивностью молока и содержанием молочного жира при исследовании польского черно-пестрого скота [119].

В 2004 году K. De Mattos обнаружил, что гетерозиготные *bPit1-Hinf I^{AB}* Гуг быки более предпочтительны по сравнению с *bPit1-Hinf I^{BB}* быками по молочной продуктивности их дочерей [60].

Таким образом, можно отметить, что, во-первых, не всегда совпадают данные, полученные на разных породах, во-вторых, один и тот же аллель в пределах одной породы по-разному влияет на признаки мясной и молочной продуктивности. Эти отличия в эффекте аллеля у представителей мясных и молочных пород подтверждают нефункциональную роль данного

полиморфизма. Возможно в данное явление вовлечен сцепленный с *bPit1* функциональный локус, который собственно и влияет на молочную продуктивность и который может быть расположен ближе или дальше от локуса *bPit1-HinfI* у представителей разных пород [120]. Другим объяснением такого эффекта может служить существование некоторого дополнительного генетического фактора. Длительная дивергенция между *B. Indicus* и *B. Taurus* могла привести к возникновению некоторых геномных различий. Поэтому, безусловно, возможно, что присутствие одинаковых аллелей отличается по физиологическому эффекту из-за присутствия других фоновых геномных влияний.

Для гена *bPit-1* идентифицирован полиморфизм, распознаваемый рестриктазой *StuI*. Данная мутация обуславливается трансверсией С→А в третьем экзоне и вызывает замену аминокислоты пролин на аминокислоту гистидин в семьдесят шестом положении белка. Данный полиморфизм в настоящее время практически не изучен, однако, имеются данные о влиянии его на молочную продуктивность. Так, Huang W. et al. выявил, что животные с генотипом *bPit1-StuI^{AA}* характеризуются более длительным лактационным периодом и более высокими показателями удоя по сравнению с животными генотипа *bPit1-StuI^{CC}* [108].

Таким образом, приведенные литературные данные показывают значимость полиморфизмов *bPit1-HinfI* и *bPit1-StuI* в формировании признаков мясной продуктивности.

Контрольные вопросы:

1. Какой из полиморфизмов гена гипофизарного фактора транскрипции является наиболее изученным?
2. На каких породах крупного рогатого скота проводились исследования ассоциации полиморфных вариантов гена *bPit-1* с признаками мясной и молочной продуктивности?
3. Какая аллель *bPit1-HinfI* положительно связана с характером роста у животных?

2.2 Гормон роста (GH)

2.2.1 Структура гена *bGH*. Регуляция экспрессии гена гормона роста GH

Ген бычьего гормона роста (*bGH* или *bST*) картирован на девятнадцатой хромосоме и является участником мультигенного семейства, которое включает так же пролактин, и плацентарные лактогены [121]. Его протяженность составляет примерно 1800 п.о. и включает пять экзонов (I-V), которые кодируют матричную РНК размером 786 п.о., и четыре интрона (A-D). По большей части его последовательность сходна с таковой у мышей и человека

[84]. Промоторный регион *bGH* расположен на расстоянии пятисот пар оснований выше точки старта транскрипции и содержит сайты связывания для полимеразы и транскрипционного фактора. На более удаленном расстоянии расположена энхансерная последовательность, которая обеспечивает тканеспецифичную экспрессию гена [122]. Ген *bGH* репрессируется соленсером, находящимся выше регуляторной области.

Регуляция экспрессии гена гормона роста *bGH*. Экспрессия гена *bGH* регулируется на трех уровнях: гормональном (внутренней средой организма), клеточно-специфическом и базовом (нижний уровень регуляции).

На гормональном уровне синтез *bGH* стимулируется в гипофизе под воздействием ГН-высвобождающего гормона (соматокринина или GH RH). Синтез гормона роста активизируется так же тиреоидным гормоном, ретинолом и глюкокортикоидами. Активин снижает синтез *bGH* матричной РНК посредством снижения концентрации Pit-1 [123]. Синтез гормона роста подавляется так же инсулином. Секреция гормона роста так же регулируется другими нейrogормонами и нейропептидами, такими, как белок гистидин, изолейцин, гипофизарная аденилат циклаза, тиротропин высвобождающий гормон, галанин и дофамин [124].

Тканеспецифический уровень регуляции синтеза гормона роста в гипофизе осуществляется под контролем Pit-1 [125]. На базовом (нижнем) уровне регуляция экспрессии гена *bGH* осуществляется посредством нескольких не-тканеспецифических факторов транскрипции, представляющих собой регуляторные нуклеотидные повторы, контролирующие пространственную конфигурацию ДНК и возможность доступа факторов экспрессии регуляторным областям гена [126-127].

Контрольные вопросы:

1. На какой хромосоме картирован ген бычьего гормона роста?
2. Какова структура гена гормона роста?
3. Механизм регуляции экспрессии гена гормона роста.

2.2.2 Характеристика белка гормона роста и его биологический эффект

Белок соматотропина представляет собой одонитевой полипептид размером примерно двадцать два кД, включающий от ста девяносто до ста девяносто девяти аминокислотных остатка [128]. Конформация белка представляет собой двухпетлевую структуру, поддерживаемую за счет двойных внутринитевых дисульфидных мостиков. Пептидные гормоны не проникают внутрь клеток мишеней и взаимодействуют с белковыми рецепторами, расположенными на их поверхности, в плазматической мембране. Поэтому их

механизм действия принципиально отличается от такового стероидных гормонов.

Основной биологический эффект *bGH* заключается в стимуляции постнатального роста и стимуляции метаболизма (липидного, белкового, углеводного и минерального), а также на лактацию и состав молока [129]. Все эти эффекты достигаются путем активации экспрессии множества генов включая *IGF-I*. Начальным этапом этого сложного процесса является связывание белковых молекул последовательно с двумя мембрано-ассоциированными GH-рецепторными (GH R) молекулами и начало трансмембранной передачи сигнала в клетку [130, 131]. Димеризованный рецептор GH активирует внутриклеточную тирозин протеин киназу, которая фосфорилирует тирозины в белках, передающих сигнал ниже по цепи. Это, в свою очередь, приводит к стимуляции митоген-активируемых протеин киназ и подавлению транскрипции [132, 133].

В настоящее время установлено, что гормон роста обладает широким спектром метаболических функций:

1) **Синтез белка.** ГР стимулирует транспорт аминокислот в мышечные клетки и, кроме того, усиливает синтез белка, причем независимо от влияния на транспорт аминокислот. У животных, получающих ГР, возникает положительный азотный баланс, что отражает общее повышение белкового синтеза и снижение содержания аминокислот и мочевины в плазме и моче. Указанные изменения сопровождаются повышением уровня синтеза РНК и ДНК в отдельных тканях. В этом отношении действие ГР сходно с некоторыми эффектами инсулина;

2) **Углеводный обмен.** В плане влияния на углеводный обмен гормон роста является антагонистом инсулина. Гипергликемия, возникающая после введения ГР, — результат сочетания сниженной периферической утилизации глюкозы и ее повышенной продукции печенью в процессе глюконеогенеза. Действуя на печень, ГР увеличивает содержание в ней гликогена, вероятно, вследствие активации глюконеогенеза из аминокислот. ГР может вызывать нарушение некоторых стадий гликолиза, а также торможение транспорта глюкозы. Обусловлен ли данный эффект прямым действием ГР на транспорт или он является результатом подавления гликолиза, пока не установлено. Ингибирование гликолиза в мышцах может быть также связано с мобилизацией жирных кислот из триацилглицероловых резервов. При длительном введении ГР существует опасность возникновения сахарного диабета;

3) **Липидный обмен.** При инкубации жировой ткани с ГР *in vitro* усиливается высвобождение незэстерифицированных (свободных) жирных кислот и глицерола. Введение ГР *in vivo* вызывает быстрое (30—60 мин) повышение содержания свободных жирных кислот в крови и их окисления в печени. В условиях недостаточности инсулина (например, при диабете) может возрасти кетогенез. Эти эффекты так же, как и действие ГР на углеводный обмен, скорее всего не опосредуются *IGF-1*;

4) **Минеральный обмен.** ГР или, что более вероятно, IGF-1 способствует положительному балансу кальция, магния и фосфата и вызывает задержку натрия, калия и хлора. Первый эффект, возможно, связан с действием ГР на кости: он стимулирует рост длинных костей в области эпифизарных пластинок у детей и аппозиционный или акральный рост у взрослых. У детей ГР усиливает и образование хряща;

5) **Пролактиноподобные эффекты.** ГР связывается с лактогенными рецепторами и поэтому обладает многими свойствами пролактина, в частности способностью к стимуляции молочных желез, лактогенеза и роста зоба у голубей.

Контрольные вопросы:

1. Структура белка гормона роста.
2. Какие биологические функции выполняет гормон роста?
3. Какую роль в минеральном обмене играет гормон роста?

2.2.3 Ассоциация полиморфных вариантов гена гормона роста с признаками мясной и молочной продуктивности

Учитывая значительную роль в процессе роста и лактации, ген *bGH* является потенциальным объектом для изучения ассоциации его молекулярных вариантов с признаками продуктивности крупного рогатого скота. У представителей различных пород крупного рогатого скота было описано несколько полиморфных вариантов гена соматотропина, их перечень представлен в таблице 3.

Таблица 3 - Локализация однонуклеотидных замен гена гормона роста.

Локализация	Положение	Изменения	Авторы (порода, у которой мутация впервые выявлена)
5'-фланкирующая область	125-142	Вставка-делеция TGC	J.Yao et. Al. 1996 (голштинский скот).
	193	Инсерция C	Ferraz et.al. 2006 (мясные породы)
	253	C→T	W. Ge et.al 2003 (ангусский скот)
	303	C→T	W. Ge et.al 2003 (ангусский скот)
	313	C→T	W. Ge et.al 2003 (ангусский скот)
	354	C→G	Ferraz et.al. 2006 (мясные породы)
	502	C→T	A.Lagziel, E. Lipkin 1999 (голштинский скот)
	591	G→C	A.Lagziel, E. Lipkin 1999 (голштинский скот)
Интрон 1	609-613	AAG делеция	Ferraz et.al. 2006 (мясные породы) Rodrigues 1998
	728	G→T	Ferraz et.al. 2006 (мясные породы)
	781	C→T	Ferraz et.al. 2006 (мясные породы)

Продолжение Таблицы 3

Интрон 3	837	C→G	Zhang et al. 1993 (мясные породы)
	1547	C → T	J.Yao et. Al. 1996 (голландский скот) A.Lagziel, E.Lipkin 1999 (голландский скот)
	1692	C → T	J.Yao et. Al. 1996 (голландский скот)
Интрон 4	1947	T→G	A.Lagziel, E.Lipkin 1999 (голландский скот)
	2017	C → T	J.Yao et. Al. 1996 (голландский скот) A.Lagziel, E Lipkin 1999 (голландский скот)
Экзон 5	2141	C→G	J.Yao et. Al. 1996 (голландский скот). A.Lagziel, E. Lipkin 1999 (голландский скот) W. Ge et.al 2003(английский скот)
	2291	A→C	J.Yao et. Al. 1996 (голландский скот). A.Lagziel, E. Lipkin 1999 (голландский скот)
3'-фланкирующая область	2565	A→G	A.Lagziel, E.Lipkin 1999 (голландский скот)
	2567	G→T	A.Lagziel, E.Lipkin 1999 (голландский скот).
	2731	Два и три повтора TC	A.Lagziel, E.Lipkin 1999 (голландский скот)

Большая часть выявленных полиморфных сайтов расположена в нетранслируемых интронах, некоторые - в регуляторной последовательности и лишь один из них расположен в транслируемой области пятого экзона, в положении - 2141 и представляет собой трансверсию C→G.

Именно она и привлекает наибольшее внимание в исследованиях, связанных с поиском ассоциаций полиморфных вариантов гена гормона роста с признаками мясной и молочной продуктивности у крупного рогатого скота.

С помощью метода ПЦР-ПДРФ, используя рестрикционный фермент *AluI* Lusy et al. (1993) выявил два аллеля, отвечающих за две альтернативные формы бычьего соматотропина с остатком лейцина или валина в положении 127. Было показано, что инъекции рекомбинантного бычьего GH с остатком валина лактирующим коровам более интенсивно повышало жирность молока по сравнению с применением GH-Leu127 [134]. Это наблюдение подтверждает, что аллель, кодирующий валин содержащий протеин, является предпочтительным для молочной продуктивности. С другой стороны, Lusy et al. (1993) показали значительно более высокую молочную продуктивность генотипа *bGH-AluI^{LV}* у джерсейских коров и отсутствие эффекта в их образцах голштинских, Guernsey, Ayrshire или джерсейских быков. В большинстве исследований животные с генотипом *bGH-AluI^{NV}* (две копии гена с Валином в сто двадцать седьмом положении) демонстрировали более низкие темпы роста [135-137], чем животные с генотипом *bGH-AluI^{LL}* и *bGH-AluI^{LV}*. Они так же

обладали более низкими показателями веса, ежедневного прироста веса и другими. [138, 139]. Имеются так же данные о том, что по этим признакам преимущественным является генотип *bGH-AluI^{LV}*. Недавно Zwerzchowski et. al. [109] было показано, что *bGH-AluI^{NV}* мясные быки имели более высокий суточный прирост веса по сравнению с быками обладавшими другими генотипами. С другой стороны, Di Stasio et al. [110], изучая Piedmontese cattle, показал отсутствие связи между полиморфизмом гена *bGH-AluI* и признаками мясной продуктивности. Имеющиеся на данный момент данные позволяют предположить, что фенотипические эффекты гена *bGH* на рост и мясные количественные признаки отличны между собой. Возможно, что L/V полиморфизм является всего лишь генетической маркерной системой, связанной с другими, недостаточно изученными, факторами. М. Switonski [140] была высказана идея о том, что разногласия в имеющихся данных могут быть обусловлены тем, что исследования проводились на разных популяциях, представленных молочными и мясными породами.

В своих работах по исследованию эффекта L/V полиморфизма на молочную продуктивность R.S. Pawar так же указывает на неоднозначность наблюдаемых взаимосвязей [141]. Им получены данные, свидетельствующие о значительном влиянии генотипа по GH локусу на признаки молочной продуктивности. В частности, общий удой у коров с *bGH-AluI^{LL}* генотипом был значительно ниже, чем у коров с генотипом *bGH-AluI^{LV}* и *bGH-AluI^{NV}*. Причем различия по данному признаку между генотипами *bGH-AluI^{LV}* и *bGH-AluI^{NV}* оказались незначительными, что позволило ему высказать предположение о доминировании *bGH-AluI^N*-аллеля. Напротив, Grochowska and Zwierzchowski [119, 138] обнаружили значительную взаимосвязь между наличием *bGH-AluI^L*-аллеля и высокой молочной продуктивностью у голштинов. Исследования же Van der Welf et al. [142] значительной ассоциации между GH локусом и молочной продуктивностью не выявили вовсе.

Хатами С.Р. и Ильясов А.Г. в группах коров ярославской, черно-пестрой и у бестужевской пород, установили, что самое высокое содержание жира в молоке, наблюдается у коров с гетерозиготным генотипом *bGH-AluI^{LV}* [143, 144]. Михайлова М.Е. (2008) определила, что самые высокие показатели по общему удою также характерны для коров черно-пестрой породы с *bGH-AluI^{LV}* генотипом, но наиболее высокое содержания жира в молоке демонстрируют животные с генотипом *bGH-AluI^{LL}* [103].

Хабибрахманова Я.А. отмечает, что у коров холмогорской породы с генотипом *bGH-AluI^{NV}* наблюдался наибольший удой по первой и наивысшей лактации. Наибольшие значения выхода молочного жира и белка по наивысшей лактации наблюдаются у животных с генотипом *bGH-AluI^{NV}* (361 кг и 288 кг), что больше на 11% и 10%, чем у генотипа *bGH-AluI^{LV}*. Коровы черно-пестрой породы с генотипами *bGH-AluI^{LV}*, *bGH-AluI^{NV}* по первой лактации имели лучший удой, чем коровы с генотипом *bGH-AluI^{LL}*. Наибольшие значения жирномолочности и белкомолочности показали коровы с генотипом *bGH-*

AluI^{LV}. Однако, коровы с генотипом *bGH-AluI^{LL}* имели большее содержание белка и жира в молоке. По наивысшей лактации коровы с генотипом *bGH-AluI^{VV}* имели наиболее высокие показатели удоя [145].

Dario C. получил данные, что у коров итальянской джерсейской породы с генотипом *bGH-AluI^{LL}* более высокий надой молока, по сравнению с *bGH-AluI^{LV}* генотипом. Генотип *bGH-AluI^{LL}* существенно отличается от генотипа *bGH-AluI^{LV}* содержанием жира (4.95% и 4.13%) и белка (4.00% против 3.47%) в молоке [146]. Аналогичную зависимость выявил и Chung E.R., он также установил, что в молоке коров джерсейской породы с генотипом *bGH-AluI^{LL}* более высокое содержание белка, чем у животных с *bGH-AluI^{LV}* генотипом [147]. Lucy M.C. с соавторами сообщили, что *bGH-AluI^L* аллель тесно связана с более высокими параметрами молочной продуктивности у американских голштинов [148].

Транзиция С→G в восьмьсот тридцать седьмом положении третьего интрона, описанная Zhang et al. (1993), может быть детектирована методом ПЦР-ПДРФ с помощью рестриктазы *MspI* [149]. При исследовании данного полиморфизма у датского и норвежского скота, Hoj et al. (1993) обнаружил, что *MspI* (-) аллель является более частым у линий, селективируемых на молочную жирность [150]. Lee et al. (1993, 1994) также обнаружил положительную ассоциацию *MspI* (-) аллеля с высокой жирностью молока у голштинских коров [151-152]. Lagziel et al (1999) обнаружил значительный повышающий эффект *MspI* (-) аллеля на процентное содержание белка и общую продуктивность молочного белка за 305 суточные лактации [153]. Авторы считают, что наблюдаемый эффект имеет место благодаря локусу, сцепленному с *bGH*, но находящемуся вне его. Напротив, по данным Yao et al. (1996), которые детектировали этот сайт методом SSCP, предпочтительным с точки зрения продуктивности молока, молочного жира и белка является аллель *MspI* (+) [154].

По данным Furu et al. (1998), *MspI* (+/-) генотип, локализованный в третьем интроне, сцеплен с инсерцией/делецией размером примерно 0,9 кБ, локализованной в 3'-фланкирующем регионе, несущем сайт регуляции транскрипции. По данным этих авторов, полученным при исследовании быков голштинской породы, данный полиморфизм не приводит к различиям в признаках генетической ценности животных [155].

Объектом для изучения ассоциаций данного полиморфизма с признаками продуктивности являются различные породы крупного рогатого скота от широко распространенных общепризнанных лидеров, до пород, локально разводимых на конкретной территории. A. Dubus et al. (2004) исследовали представителей черно-пестрой и голштино-фризской породы польского скота. В работе показано, что животные с генотипом *MspI* (+/+) обладали более высокими показателями удоя по сравнению с обладателями генотипа *MspI* (+/-) и *MspI* (-/-) [156].

Третий полиморфизм с применением рестриктазы TaqI был описан Rocha et al. (1992). Falaki et al. (1996a, 1996b) выявил ассоциацию данного полиморфизма у симментальских коров, и отсутствие ассоциации у голштино-фризских быков [157, 158]. Полиморфизм GH- TaqI существует благодаря инсегции/делеции размером примерно 1000 п.н. в области 3'-конца гена [150, 159]. В гене бычьего соматотропина существуют так же другие полиморфные сайты, которые будут интересны для исследований их ассоциации с признаками молочной продуктивности.

Necht и Geldermann (1996) показали семь мутаций в гене гормона роста. Шесть из них были идентифицированы в 5'-фланкирующем регионе и одна в первом интроне. Некоторые из этих вариантных сайтов являются потенциально связывающими сайтами для транс взаимодействующих факторов (таких, как СААТ/энхансер, связывающий протеин и тиротид гормон распознающий элемент) и вероятно вовлечены в регуляцию экспрессии гена гормона роста [160].

Rodrigues et al. (1998) идентифицировал полиморфный сайт в промоторной зоне гена. Этот полиморфизм представляет собой делецию тринуклеотида AAG, локализованного на девять нуклеотидов выше ТАТААА последовательности [161].

К сожалению, в этих последних исследованиях ассоциация с признаками продуктивности не исследована.

Таким образом, можно отметить, что исследования полиморфных вариантов гена гормона роста как гена-кандидата для маркер-сопутствующей селекции имеют значительные перспективы, учитывая его несомненную роль в контроле процессов роста и лактации. С другой стороны, некоторая противоречивость получаемых данных свидетельствует о недостаточности знаний о механизмах формирования его фенотипического эффекта. Так же необходимо учитывать возможность того, что фенотипический эффект исследуемых полиморфизмов в некоторых случаях обусловлен не собственно полиморфизмом, а является результатом сцепления с другим локусом, непосредственно ответственным за формирование признака. Исходя из выше перечисленных аспектов, для своего исследования гена гормона роста, как ключевого участника соматотропиновой оси мы выбрали AluI полиморфизм, так как он во-первых обуславливает аминокислотную замену в структуре белка, во-вторых его ассоциация с признаками молочной продуктивности практически не изучалась на черно-пестрой породе а в Беларуси и на голштинском поголовье, в третьих представляет значительный интерес его исследование в связке гаплотипов по ключевым генам соматотропиновой оси.

Таким образом, можно отметить, что исследования полиморфных вариантов гена гормона роста как гена-кандидата для маркер-сопутствующей селекции имеют значительные перспективы, учитывая его несомненную роль в контроле процессов роста. С другой стороны, некоторая противоречивость

получаемых данных свидетельствует о недостаточности знаний о механизмах формирования его фенотипического эффекта.

Контрольные вопросы:

1. Какие известны полиморфные варианты гена гормона роста?
2. Какими учеными и на каких породах скота был исследован полиморфизм *bGH-AluI*?
3. Кем был открыт полиморфизм гена гормона роста, распознаваемый с помощью рестриктазы *MspI*?

2.3 Рецептор гормона роста (GHR)

2.3.1 Структура гена рецептора гормона роста *bGHR*. Особенности экспрессии

GHR кодируется одиночным геном, который локализован на двадцатой хромосоме у КРС [162, 163]. Он содержит одиночный трансмембранный домен, содержащий двадцать четыре аминокислоты, экстрацеллюлярный (гормон-связывающий) домен и длинный цитоплазматический домен (сигнал-индуцирующий) [164].

Изначально предполагалось, что данный ген содержит десять экзонов, со стартовым кодоном трансляции во втором экзоне [165], однако последние исследования выявили, что *bGHR* ген у разных видов содержит множественные лидирующие экзоны (экзоны 1) [166, 167]. В настоящее время известно, что *bGHR* состоит из девяти экзонов в транслируемой части (со 2 по 10) и девяти экзонов в 5'-некодирующем регионе, который включает девять нетранслируемых экзонов: 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I [168]. 5'-регуляторная область данного гена содержит составные промоторные элементы, энхансеры, репрессоры, детермианты тканеспецифичной экспрессии гена и другие регуляторные элементы [169]. Экзоны нетранслируемой области подвергаются альтернативному сплайсингу и каждый из них имеет личный сайт начала транскрипции. У *Bos Taurus* обнаружен LINE-1 элемент, размером примерно 1,2 кб, расположенный выше экзона 1A [170].

Регуляция экспрессии гена рецептора гормона роста *bGHR*. О механизмах, регулирующих экспрессию этого гена, известно очень мало. Инициация транскрипции в различных лидирующих экзонах и сплайсинг разных лидирующих экзонов на втором экзоне приводит к образованию множественных матричных РНК рецептора гормона роста, которые отличаются между собой 5'-нетранслируемым регионом [171], что приводит к образованию не идентичных белковых продуктов.

Гетерогенность нетранслируемого 5' региона рецептора гормона роста продемонстрирована у разных видов млекопитающих. Девять вариантов mRNA

GHR идентифицированы у человека (V1–V9; [172]) и крупного рогатого скота (1A–1I; [168]). У КРС вариант 1A исключительно экспрессируется в печени и транскрипционно контролируется печеночным фактором (liver-enriched factor) и гепатоцит-нуклеарным фактором-4 (HNF-4; [173]). Более того, имеются сведения в пользу экспрессии различных транскриптов в ходе развития и ткане-зависимой регуляции [172, 174].

Контрольные вопросы:

1. Структура гена рецептора гормона роста?
2. На какой хромосоме локализован ген *bGHR* крупного рогатого скота?
3. Каков механизм регуляции экспрессии гена рецептора гормона роста?

2.3.2 Характеристика белка рецептора гормона роста GH R и его биологическая функция

Белок рецептора гормона роста (growth hormone receptor GH R) представляет собой мембрано-ассоциированный белок, содержащий 620 а.о. Молекула рецептора состоит из трех функциональных доменов: экстрацеллюлярного (расположенного на поверхности клетки), трансмембранного (расположенного в пределах мембраны) и интрацеллюлярного или цитоплазматического (расположенного внутри клетки). Экстрацеллюлярный домен состоит из двести сорока остатков аминокислот и является N-терминальным, трансмембранный домен включает триста пятьдесят остатков, внутриклеточный домен состоит из двадцати четырех остатков аминокислот и является C-терминальным. GH R принадлежит к цитокинин/гематопоезическому семейству рецепторов, участники которого, имеют сходства между собой по структуре и свойствам [175-177].

Экстрацеллюлярный домен гормона роста состоит из двух функциональных частей: одна выполняет функцию связывания с гормоном роста [178], другая, прилегающая к мембране, связана с трансмембранным доменом с помощью линкера, состоящего из одиннадцати аминокислотных остатков. Внутриклеточный домен содержит консервативные последовательности, являющиеся сайтами связывания с сигнальными пептидами, такими, как JAK-2 [132].

Биологическая функция GHR состоит в передаче действия GH на клетки, т.е. сигнальная трансдукция через клеточную мембрану.

Первый этап сигнальной трансдукции включает присоединение GH к GHR и димеризацию двух молекул GHR. Димеризация приводит к связыванию цитоплазматического домена с интрацеллюлярной протеин киназой JAK-2 и другими киназами, которые в свою очередь другие киназы, энзимы и нуклеарные протеины, являющиеся сигнальными преобразователями и активаторами транскрипции. Таким образом, посредством различных

последовательных биохимических событий, в конечном счете, активируется транскрипция генов инсулина, инсулиноподобного фактора-1 и множества других генов [172, 179, 180].

Присутствие GHR в различных тканях и клетках свидетельствует о широком диапазоне влияния гормона роста на физиологические процессы организма. GHR был идентифицирован в печени, сердце, почках, сердечной и скелетной мускулатуре, кишечнике, желудке, надпочечниках и многих других тканях и органах [181]. Естественно, что мутации, приводящие к изменению структуры белка рецептора, приводят и к изменению его способности трансдуцировать сигнал гормона роста. А так как для гена рецептора характерным является альтернативный сплайсинг, то большое значение приобретают так же мутации, возникающие в областях интронов и, несомненно, мутации регуляторных областей. Соответственно, при рассмотрении данного гена, как гена-кандидата для использования в маркер-сопутствующей селекции, значительное внимание уделяется исследованию аллелей гена, полиморфных не только по кодирующим, но и по фланкирующим областям. В настоящее время интенсивные исследования гена рецептора гормона роста направлены на выявление его полиморфных вариантов, в частности одиночных нуклеотидных замен как в экспрессируемых, так и в регуляторных областях.

Контрольные вопросы:

1. Структура белка рецептора гормона роста?
2. В чем состоит биологическая функция рецептора гормона роста?
3. Где был идентифицирован рецептор гормона роста?

2.3.3 Ассоциация полиморфных вариантов гена рецептора гормона роста с признаками мясной и молочной продуктивности

Несколько полиморфных последовательностей было идентифицировано в гене рецептора гормона роста. Их список представлен в таблице 4.

Таблица 4 - Локализация однонуклеотидных замен гена рецептора гормона роста

Локализация	Положение относительно точки старта	Полиморфизм; Рестриктаза, распознающая замену	Авторы (порода, у которой мутация впервые выявлена)
5'-фланкирующий регион	-887	C→T (AccI)	Aggrey (1999) Голштинский скот
	-1177	A→T (AluI)	Aggrey (1999) Голштинский скот
	- 232	C→T (StuI)	Aggrey (1999) Голштинский скот

Локализация	Положение относительно точки старта	Полиморфизм; Рестриктаза, распознающая замену	Авторы (порода, у которой мутация впервые выявлена)
5'-фланкирующий регион	-1104	C→T (Fnu4HI/TseI)	A Maj (2002) черно-пестрый скот
	-154	A → G (NsiI)	Ge W (1999) ангусский скот
Экзон 8		T→A фенилаланин на тирозин в положении 279	Blott (2003) джерсейский, голштино-фризский, черно-пестрый скот
Экзон 10	200	G→A аланин на треонин (NarI)	Ge W 2000 (ангусский скот)
		A→T аспарагин на треонин. 528	Blott (2003) джерсейский, голштино-фризский, черно-пестрый скот
	1681	A→G серин на глицин в положении 541	Ge W (2000) ангусский скот

Исследования полиморфизмов периферической части гена.

В 1999 году Aggrey et al. при изучении голштинских быков области региона было выявлено три полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с использованием рестриктаз AluI, StuI, и AccI. Рестриктаза AccI распознает транзицию C→T в положении -887. Аллелю AccI (+), разрезаемому рестриктазой, соответствует нуклеотид C. Полиморфизм по StuI рестриктазе выявляет транзицию C→T в положении - 232. Рестриктаза AluI распознает A→T замену в положении -1177 [182]. Аллелю AluI (+), разрезаемому рестриктазой, соответствует нуклеотид A. Ассоциация данных полиморфизмов с признаками продуктивности изучалась впоследствии различными учеными.

Относительно *bGHR*-AluI полиморфизма, у голштинской породы Aggrey et al было показано, что животные с генотипом *bGHR*-AluI (+/+) имеют более высокое содержание жира в молоке, по сравнению с животными, с генотипами *bGHR*-AluI (+/-) и *bGHR*-AluI (-/-) [182]. В работах A Maj при изучении ассоциации полиморфизма *bGHR*-AluI с признаками мясной продуктивности у животных польской черно-пестрой породы, показано, что животные-носители аллеля *bGHR*-AluI(-) обладали более высокими показателями по таким параметрам, как вес тела и масса вырезки [183]. При этом наибольшие результаты по этим признакам были характерны для животных с генотипом *bGHR*-AluI (-/-) [184].

Исследования *bGHR*-StuI полиморфизма 5'-промоторной зоны гена рецептора гормона роста также проводились (молочные признаки у голштинского скота, Aggrey et al. 1999). Животные с генотипами *bGHR*-StuI(+/+) обладали более высоким содержанием, жира и белка в молоке, по сравнению с животными обладающими генотипами *bGHR*-StuI(+/-) и *bGHR*-StuI(-/-).

При исследовании полиморфизма по *bGHR*-AccI в работах Aggrey et al. статистически значимой ассоциации генотипа с молочными признаками выявлено не было. В дальнейшем эти полиморфные замены были исследованы другими авторами. Maj A с соавторами обнаружил, что животные мясных пород, обладавшие *bGHR*-AccI (+/-) генотипом, имели больший ежедневный прирост по сравнению с *bGHR*-AccI (-/-) животными, а так же давали наибольшее содержание полезной вырезки по сравнению с AccI +/- животными [185]. В то же время у животных молочной, польской черно-пестрой породы, никакой ассоциации с мясной продуктивностью выявлено не было [184]. При исследовании польской черно-пестрой породы на предмет связи AccI полиморфизма с признаками молочной продуктивности А. Maj было обнаружено, что он связан с некоторыми параметрами молочной продуктивности (общая энергия) и состава молока (процент сухого вещества) [185].

Новый полиморфизм был обнаружен А Maj и соавт. в положении -1104 5'фланкирующей области и представляет собой транзицию С→Т. Данный полиморфизм обнаруживается с помощью рестриктазы Fnu4HI /TseI: *bGHR*-Fnu4HI (+) соответствует аллель, содержащий в данном положении нуклеотид С [183].

В ходе исследования мясных пород, таких как лимузинская, ангусская и герефорды, было показано, что животные с генотипом *bGHR*-Fnu4HI (+/+) обладали большим суточным приростом и большей конверсией корма по сравнению с животными, обладателями генотипа Fnu4HI (+/-) и Fnu4HI (-/-). Генотип *bGHR*-Fnu4HI (+/+) был ассоциирован со значительно более высокой скоростью роста между 13 и 15 месяцами жизни [183]. При исследовании данного полиморфизма на представителях молочной породы, польской черно-пестрой, не было выявлено ассоциации ни с признаками мясной [184], ни с признаками молочной продуктивности [186].

В 1999 году Ge W. с соавторами при исследовании популяции ангусского скота была обнаружена одиночная нуклеотидная замена (SNP) в области промоторной зоны первого экзона [187]. Данная нуклеотидная замена впоследствии была идентифицирована как А → G транзиция в положении -154 и распознается рестриктазой NsiI. Аллель *bGHR*-NsiI (+) в данном положении содержит нуклеотид G [188]. Maj A. исследовал данный полиморфизм на мясных породах, таких как ангусский скот, лимузинский и герефорды. FLP-NsiI генотип оказался ассоциированным с ежедневным поглощением корма. Генотип *bGHR*-NsiI (-/-) или *bGHR*-NsiI (+/-) был ассоциирован с меньшим потреблением корма, а также у животных с генотипом *bGHR*-NsiI (-/-) был более высокий показатель процента постной вырезки по сравнению с другими генотипами [183]. Ассоциация данного полиморфизма с признаками мясной продуктивности была так же исследована группой Maj A. на молочной черно-пестрой породе польского скота. И в этом случае положительная ассоциация по мясным показателям была характерна для аллеля *bGHR*-NsiI (+). Хотя

ассоциация была выявлена по другим параметрам, например, вес холодной туши и так далее [184]. При изучении на данной породе параметров молочной продуктивности, предпочтительным оказался аллель *bGHR-NsiI* (–). Животные с генотипом *bGHR-NsiI* (–/–), по сравнению с животными с генотипом *bGHR-NsiI* (+/+), давали больше молока с большим содержанием основных белковых компонентов, таких как жир, белок и лактоза [186].

Исследования кодирующей части гена рецептора гормона роста.

Исследования кодирующей части гена рецептора гормона роста проводились параллельно с исследованиями регуляторных зон.

В 2000 году Ge W. et al. было выявлено несколько полиморфных вариантов гена, обусловленных наличием одиночных нуклеотидных замен (SNP) в области десятого экзона. Из них нуклеотидная замена G → A приводит к замене аминокислот в последовательности белка аланин (GCC)→треонин (ACC). В случае данного полиморфизма рестриктаза *NarI* узнает нуклеотид G. Другая замена A → G приводит к замене серин(AGC)→глутаминовая кислота (GGC) и может быть идентифицирована с помощью рестриктазы *AluI* [189]. Однако, ассоциация этих полиморфных вариантов с признаками продуктивности (ни мясной, ни молочной) не изучалась.

Кодирующая часть гена была так же исследована в 2003 году Blott et al. на предмет выявления SNP у джерсейского, голштино-фризского и чернопестрого скота. Было выявлено несколько полиморфных вариантов, два из которых изменяют аминокислотную последовательность рецептора гормона роста [170].

A→T замена в десятом экзоне приводит так же к замене аспаригина на треонин (N528T) в цитоплазматическом домене. Обе аминокислоты являются полярными незаряженными остатками. Эти остатки являются менее консервативными в ходе эволюции и могут заменяться или аспарагином (человек, кролик, свинья и куры), либо серином (овцы, мыши и крысы). Однако данные по ассоциации этого полиморфизма с признаками продуктивности отсутствуют [170].

Замена T→A в восьмом экзоне вызывает неконсервативную замену нейтрального фенилаланина на незаряженный, но полярный остаток тирозина (F279Y). Соответствующий остаток фенилаланина локализован в трансмембранном домене гена рецептора гормона роста и является консервативным для всех изученных млекопитающих. Blott выявила значительную ассоциацию фенилаланин/тирозин полиморфизма в трансмембранном домене с большим молочной продуктивностью и составом молока у животных немецкой и новозеландской популяции голштинских коров [170]. По данным авторов, животные, обладатели аллеля Y, характеризовались более высокой общей продуктивностью молока, в то время как у животных носителей аллеля F общая продуктивность была ниже, а процентное содержание белка и жира в молоке было более высоким. Механизм формирования такого эффекта до конца не выяснен. Предполагается, что

отмеченный эффект обусловлен тем, что ароматическое кольцо тирозина содержит реактивную карбоксильную группу, которая делает его менее гидрофобным, чем такой же ароматический и нейтральный фенилаланин [190]. В дальнейшем мутация F279Y была исследована Luca Fontanesi et al. (2007) на животных итальянской голштино-фризской породы, итальянской черной, итальянской симментальской, джерсейской пород. Была отмечена довольно высокая частота предпочтительного аллеля у представителей итальянских популяций исследованных пород [191]. Предполагается, что обнаруженная мутация является одной из причин, объясняющих QTL двадцатой хромосомы, обнаруженные при ее картировании [192, 193]. В 2006 году Viitala S. et al. также была подтверждена положительная роль мутации F279Y на общую продуктивность и состав молока при исследовании популяции финского айрширского скота (Finnish Ayrshire) [194].

Замена нуклеотидов T → A в восьмом экзоне гена рецептора гормона роста вызывает замену аминокислотной последовательности от фенилаланина к тирозину и идентифицируется эндонуклеазой рестрикции SspI. В настоящее время практически не изучено влияние *bGHR*-SspI полиморфизма на мясные признаки крупного рогатого скота, однако рядом ученых доказана ассоциация данного полиморфизма с молочной продуктивностью. Исследованиями, проводимыми на разных породах, было выявлено, что замена аминокислотной последовательности от фенилаланина к тирозину приводит к снижению содержания жира и белка в молоке. Исследование Rahmatalla S.A. подтверждает влияние полиморфизма *bGHR*-SspI на удои, а также на содержание белка и жира в молоке немецкой популяции голштинского скота, так, гомозиготные коровы с генотипом *bGHR*-SspI^{YY} ($p < 0,05$) имеют более высокое содержание жира и белка по сравнению с животными других генотипов. В дополнение к ранее сделанным выводам, в исследовании Rahmatalla S.A. было также обнаружено значительное влияние полиморфизма гена рецептора гормона роста на содержание казеина и лактозы голштинской породы [195]. Таким образом, можно отметить, что для молочной продуктивности предпочтительным является аллель *bGHR*-SspI^Y.

Jolanta Komisarek, предполагает, что полиморфизм *bGHR* в двести семьдесят девятом положении может влиять на изменчивость удоя молока, а также на содержание молочного жира и белка джерсейской породы крупного рогатого скота [196]. Viitala S. также сообщает о связи полиморфизма *bGHR*-SspI с удоем, процентным содержанием белка и жира айрширской породы крупного рогатого скота [197].

Учитывая значительную роль рецептора гормона роста в формировании внутриклеточного ответа на воздействие гормона роста, необходимость исследования данной проблемы становится абсолютно очевидной. Причем, такие данные представляют не только теоретический интерес, направленный на выявление механизмов взаиморегуляции генов, но и практический интерес для развития маркер-зависимой селекции. Для нашего исследования мы выбрали

полиморфизм Т→А в восьмом экзоне, приводящий к замене фенилаланина на тирозин в трансмембранном домене. Так как, во-первых, данный полиморфизм достоверно приводит к изменению структуры белка, во-вторых, ассоциация его с признаками молочной продуктивности практически не изучена ни на голштинской, ни на черно-пестрой породе.

Контрольные вопросы:

1. Какие полиморфизмы были идентифицированы у гена рецептора гормона роста?
2. Какая аллель полиморфизма *bGHR-SspI* является наиболее перспективной для молочной продуктивности скота?
3. На каких породах изучали разные полиморфные варианты гена рецептора гормона роста?

2.4 Инсулиноподобный фактор-1. Структура и экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста-1 (*bIGF-1*).

Инсулиноподобные факторы (IGF-I и IGF-II) являются факторами множественного действия, которые наряду с инсулином регулируют рост, развитие, лактацию и участвуют в реализации различных физиологических функций в ряду тканей и специфических клеток.

У млекопитающих *bIGF-1* ген состоит из шести экзонов и составляет 90 кб хромосомальной ДНК [198]. Для гена *bIGF-1* характерно два лидирующих экзона, так же наличие в области 5' фланкирующих регионов первого и второго экзонов нескольких сайтов старта транскрипции. Применение различных ССТ регулируется на основе тканеспецифичности и множеством физиологических условий [199, 200].

Двумя альтернативными лидирующими экзонами продуцируются два класса транскриптов. Транскрипты первого класса (образующиеся с первого экзона), являются основными транскриптами во всех тканях, включая печень, на всех стадиях развития. Транскрипты второго класса локализованы в зрелой печени постоянно и в некоторых других тканях в течение короткого периода неонатального развития [199, 201]. Транскрипты второго класса более восприимчивы к гормону роста, чем транскрипты первого класса [202], в то время как транскрипты первого класса, кроме гормона роста, чувствительны так же к другим факторам.

Регуляция экспрессии гена *bIGF-1*. Регуляция экспрессии *bIGF-1* осуществляется на четырех уровнях: транскрипция, сплайсинг и стабилизация мРНК, трансляция и посттрансляция. Множественные сайты старта транскрипции, альтернативные промоторы и лидирующие экзоны избирательно транскрибируются на разных этапах развития и под действием различных факторов. Синтез и секреция *bIGF-1* регулируется различными гормонами, но в

большей степени гормоном роста. Употребляемые в пищу вещества также стимулируют синтез и секрецию *bIGF-1* [203 - 205].

Синтез *bIGF-1* в основном осуществляется в печени, откуда он экскретируется в плазму крови и на основе тканеспецифичности действует как эндокринный фактор на органы-мишени. К органам-мишеням IGF в том числе относится и молочная железа. В некоторых тканях белок IGF-1 синтезируется локально [206 - 208]. В частности, IGF-1 мРНК экспрессируется в молочной железе коров, тем самым подтверждая возможность его локального синтеза. Причем имеющиеся данные подтверждают, что способностью к синтезу IGF-1 обладают не секреторные эпителиальные, а стромальные клетки молочной железы [207]. Ronge было показано, что концентрация IGF-1 в крови обратно коррелирует с процессом лактации [207]. В то время как концентрация IGF-2 в ходе лактации остается практически неизменной.

Контрольные вопросы:

1. Из скольких экзонов состоит ген инсулиноподобного фактора-1 роста у млекопитающих?
2. Механизм регуляции экспрессии гена *bIGF-1*?
3. Где преимущественно синтезируется ген *bIGF-1*?

2.4.1 Характеристика белка IGF-1 и биологическая роль

IGF принадлежат к семейству структурно родственных полипептидов, которое так же включает инсулин и релаксин. Участники этого семейства демонстрируют 40-50% аминокислотную гомологию друг с другом [209]. Последовательность бычьего IGF-1 является идентичной таковой у человека. Зрелый IGF-1 пептид является одонитевым пептидом, состоящим из семидесяти аминокислот (молекулярный вес 7.646 Д). Данный полипептид состоит из функциональных доменов А, В, С, и D. Домены А и В обладают высокой гомологией с доменами А и В инсулина. Домен А является важным для связывания IGF-1 с собственным рецептором и запускания последующих внутриклеточных событий. Домен В участвует в связывании с IGF-ассоциированными белками, участвующими в его транспорте, депонировании и реализации некоторых физиологических эффектов [210].

IGF-1 является важнейшим эндокринным посредником действия соматотропного гормона, почему и называется также соматомедином. Он производится гепатоцитами печени в ответ на стимуляцию их соматотропиновых рецепторов. В периферических тканях именно IGF-1 обеспечивает практически все физиологические эффекты соматотропного гормона. IGF-1 также обеспечивает обратную связь с гипоталамусом и гипофизом по соматотропной оси: от уровня IGF-1 в крови зависит секреция соматотропин-рилизинг-гормона и соматотропного гормона. При низком

уровне IGF-1 в крови секреция соматотропин-рилизинг-гормона и соматотропина возрастает, при высоком — снижается. Также IGF-1 регулирует секрецию соматостатина: высокий уровень IGF-1 приводит к возрастанию секреции соматостатина, низкий — к её снижению. Этот механизм является ещё одним способом регуляции уровня соматотропного гормона в крови. Уровень IGF-1 в крови зависит от действия на печень не только соматотропного гормона, но и половых стероидов и тиреоидных гормонов, глюкокортикоидов, инсулина. При этом инсулин, андрогены, эстрогены повышают секрецию IGF-1 печенью, а глюкокортикоиды её снижают. Это является одной из причин синергизма инсулина, соматотропина, половых и тиреоидных гормонов в отношении процессов роста и развития организма, роста и дифференцировки тканей.

На молекулярном уровне биологический эффект IGF-1 заключается в том, что он регулирует экспрессию примерно тридцати генов на уровне транскрипции [211]. Это гены, кодирующие некоторые важные функциональные протеины, такие как рецепторы, транспортные белки и ферменты. Биохимический внутриклеточный эффект IGF-1 заключается в стимуляции транспорта глюкозы и аминокислот через клеточную мембрану, окисление глюкозы и синтез липидов, гликогена, белка, РНК и ДНК [212-215]. На тканевом уровне, IGF-1 стимулирует митоз (клеточную пролиферацию) и дифференциацию клеток, в том числе и клеток молочной железы [216-218]. На тканево-организменном уровне, IGF-1 стимулирует рост костной ткани [223], развитие мышц [218], а также регулирует функции почек [220], развитие и регенерацию нервной системы [221], синтез половых гормонов, оогенез и сперматогенез, а также процесс лактации [221].

Контрольные вопросы:

1. Структура белка инсулиноподобного фактора роста.
2. Биологическая роль IGF-1?
3. Какой биологический эффект оказывает инсулиноподобный фактор роста на молекулярном уровне?

2.4.2 Полиморфизм гена IGF-1 и его ассоциация с признаками мясной и молочной продуктивности

Работ по изучению влияния генотипа на молочные признаки довольно мало. У крупного рогатого скота и овец был обнаружен полиморфизм динуклеотидных [CA] повторов в области 5'-фланкирующего региона первого экзона на расстоянии примерно 1 кб от первого кодона [222, 223]. Moody et al. (1994) показали значительный эффект полиморфизма CA повторов в 5'-регионе на вес и вес годовалых телят у мясного крупного рогатого скота [224].

У гена *bIGF-1* были обнаружены и описаны три полиморфных сайта в промоторной области. Первый (CA) полиморфизм обусловлен динуклеотидными повторами, локализован в промоторе P1 [225], внутри которого идентифицируется А→С трансверсия в позиции -977 (GenBankAcc. No. DQ975234) [223]. Второй полиморфизм обусловлен Т→С переходом в положении -512, также он известен как одиночный нуклеотидный полиморфизм (SNP) *bIGF-1-SnaBI* (GenBankAcc. No. AF017143) [226, 227]. Lien S. et al. (2000) обнаружили делецию в четвертом положении (TTTG) в пределах четвертого интрона и один однонуклеотидный полиморфизм в пятом интроне (*bIGF-1-DpnII*) (GenBank Acc. No. AF210383-387) [228]. Девять новых SNP внутри интронов и 3'- областей были генотипированы Mullen M.P. et al. (2011).

Наиболее изученной формой полиморфизма *bIGF-1* является однонуклеотидный полиморфизм, распознаваемый SnaBI-рестриктазой, который находится в 5' фланкирующей области первого экзона. Данный полиморфизм обуславливается Т→С нуклеотидной заменой. Различные исследователи проанализировали ассоциации этого полиморфизма с молочной продуктивностью крупного рогатого скота [229-232].

Ge et al. была идентифицирована Т (аллель А)→С (аллель В) транзигция у телят ангусского скота [226, 233]. Транзигция расположена в первом кодоне (ATG) первого экзона и распознается с помощью SnaBI рестриктазы. Мутантный *bIGF-1-SnaBI^B* аллель показан как предпочтительный по некоторым признакам мясной продуктивности, в частности, прирост веса за первые двадцать дней постнатального развития. Jae-Но Kim (1998) исследовала этот однонуклеотидный полиморфизм на предмет ассоциации с мясными и молочными признаками у представителей ангусского, симментальского Charolais и герефордов. Она обнаружила, что коровы с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{AA}* обладали большей продуктивностью молока в сутки. Такие коровы так же приносили телят с более высоким весом при рождении [234]. С. Li et al. (2004) так же исследовала эту мутацию у ангусского скота. Однако значительной ассоциации этого полиморфизма с признаками мясной продуктивности выявлено не было [235]. Siadkowska E (2006) исследовала SnaBI -полиморфизм на польской популяции голштино-фризской породы. Ею было отмечено, что обладатели генотипа *bIGF-1-SnaBI^{AB}* характеризуются более высокой продуктивностью молочного жира и белка по сравнению с *bIGF-1-SnaBI^{AA}* и *bIGF-1-SnaBI^{BB}* генотипами [232].

Исследования ассоциации полиморфизма *bIGF-1-SnaBI* с признаками молочной продуктивности проводились различными учеными на разных породах крупного рогатого скота. Так, Mehmannaavaz Y. et al. [236], Bonakdar E. et al. [237] показали, что животные иранской популяции голштинского скота с генотипом *bIGF-1-SnaBI^{AB}* отличались от особей с гомозиготными генотипами более высоким содержанием жира и белка в молоке. Кроме того, Siadkowska E. et al. [232] также выявила положительную ассоциацию генотипа *bIGF-1-SnaBI^{AB}*

с высоким процентом молочного жира и белка у польских популяции коров голштинской породы.

Помимо связи полиморфизма гена *bIGF1-SnaBI* с молочной продуктивностью, имеются данные о его влиянии и на признаки мясной продуктивности. Ge W. et al. при исследовании семьсот шестидесяти особей ангусской породы обнаружил, что животные с генотипом *bIGF1-SnaBI^{BB}* отличаются от животных с другими генотипами более высоким среднесуточным приростом в первые двадцать дней после отъема [226]. Szewczuk M. et al. выявил связь генотипа *bIGF1-SnaBI^{BB}* с более высокой массой тела у 2-месячных телят голштино-фризской породы, а также с последующим выходом молока, жира и белка [238]. X. Dela Rosa Reyna et al. отметил положительную ассоциацию генотипа *bIGF1-SnaBI^{BB}* с такими чертами мясной продуктивности, как масса туши и суточный привес у мексиканского скота [239]. Curi R.A et al. обнаружил, что у зебу с генотипом *bIGF1-SnaBI^{BB}* наблюдались большие подкожные жировые отложения и масса тела, чем у особей с другими генотипами [240]. Li C. et al. отметил, что генотип *bIGF1-SnaBI^{BB}* у крупного рогатого скота породы Bos Taurus связан с высокими показателями массы тела при отъеме [235].

Некоторыми исследователями отмечается положительная ассоциация генотипа *bIGF1-SnaBI^{AB}* с чертами мясной продуктивности у крупного рогатого скота. Так, Othman E. et al. обнаружил положительные ассоциации генотипа *bIGF1-SnaBI^{AB}* с живым и убойным весом, а также с весом жира и мяса ценных отрубов египетских буйволов [241]. Siadkowska E. et al. также подтвердила ассоциацию полиморфизма *bIGF1-SnaBI* с признаками мясной продуктивности польской популяции голштино-фризского скота. Так, особи с генотипом *bIGF1-SnaBI^{AB}* характеризовались высокой живой массой тела при забое и высоким весом жира и мяса ценных отрубов [232].

Приведенные литературные данные подтверждают связь полиморфизма *bIGF1-SnaBI* с признаками мясной продуктивности крупного рогатого скота, причем наиболее благоприятным является аллель *bIGF1-SnaBI^B*.

Новый полиморфизм, *bIGF1-TasI* был выявлен в 2007 г. S. Zych et.al у представителей голштино-фризской породы. Полиморфизм депонирован под номером DQ975234 GenBank. А→С трансверсия наблюдается в положении -193 внутри сигнальной ААТА последовательности, расположенной в пределах микросателлита гена бычьего инсулин-подобного фактора-1. Ген *bIGF1* экспрессируется в разных тканях (включая мышечную и ткань молочной железы) [242] в виде двух классов мРНК, производимых с P1 и P2 промоторов соответственно. Данный полиморфизм области динуклеотидных повторов [CA]_n, локализованный в 5'-регионе, предположительно может быть связанным с регуляторными элементами P1 промотора. К настоящему времени данных о его ассоциации с признаками молочной или мясной продуктивности нет.

Таким образом, является несомненным интерес, который представляет исследование гена IGF-1 в роли гена кандидата с учетом его участия в процессе лактации. С точки зрения поиска полиморфных сайтов, ассоциированных с концентрацией IGF-I в крови и влияющих на проявление признаков продуктивности, наибольший интерес представляют два промоторных региона, чувствительная к гормону роста область внутри второго интрона и экзоны, кодирующие белок.

Контрольные вопросы:

1. Какие обнаружены полиморфные варианты гена инсулиноподобного фактора роста-1?
2. Какой полиморфизм IGF-1 является наиболее изученным?
3. Какая аллель полиморфизма *bIGF1-SnaBI* является наиболее благоприятной для мясной продуктивности?

3 Исследование полиморфных генов соматотропного каскада крупного рогатого скота (*bPit-1*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*) методом ПЦР-ПДРФ



Рисунок 3 – Схема исследования полиморфизма генов соматотропного каскада

3.1 Пробоподготовка и выделение ДНК из образца

Тактика мероприятий по отбору проб на ПЦР заключается в исключении контаминации пробы, инструментов и посуды посторонними нуклеиновыми кислотами. Трудность заключается в том, что инаktivированные микроорганизмы остаются источниками нуклеиновых кислот, поэтому обработка, например, рук, инструментов спиртом не предотвратит контаминации проб посторонней ДНК.

Один из основных принципов предотвращения контаминации - аккуратность. Необходимо следить за тем, чтобы инструменты, руки и прочие поверхности, соприкасающиеся с биоматериалом, пробой, не контактировали с другой пробой либо чистой посудой, инструментами, руками.

Другой принцип - использование одноразовой, пластиковой посуды, контейнеров и перчаток.

Третий принцип - разрушение нуклеиновых кислот на поверхностях инструментов, мебели. Инструменты, перед отбором очередной пробы

необходимо очищать и обжигать над пламенем спиртовки. Помещение перед началом работы желательно обрабатывать ультрафиолетовым излучением в течение часа. После работы помещение, мебель и инструменты желательно очистить от остатков биоматериала. Инструменты, стеклянную посуду, кюветы можно залить 5% раствором хлорамина, после чего удалить хлорамин стерильной дистиллированной водой. Для мытья кювет можно использовать автоклавируемую тряпку.

Четвертый принцип - сохранение нуклеиновых кислот в пробе от разрушающего действия нуклеаз (ферментов, разрушающих нуклеиновые кислоты). На стадии отбора биоматериала, его хранения и транспортировки, данный принцип реализуется путем создания неблагоприятных для работы нуклеаз условий - замораживание, либо высушивание проб [243].

Взятие биологического материала. У крупного рогатого скота кровь отбирают из вены в объёме не менее 5 мл. одноразовой иглой (диаметр 0,8 - 1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа "Vacuett" (сиреневые крышки - 6% ЭДТА) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 1:9). Перед взятием крови иглы необходимо простерилизовать кипячением. Кровь от каждого животного берут индивидуальной иглой. Место взятия крови тщательно дезинфицируют спиртом или 5% раствором йода. После взятия крови пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется, и выделение ДНК/РНК станет невозможным). Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя, так как он является мощным ингибитором ПЦР.

Следует строго соблюдать температурные режимы хранения и транспортирования отобранного материала. Транспортирование осуществляют в термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом. При хранении материала более суток его необходимо заморозить при температуре минус 20°C

Выделение ДНК из исследуемого объекта и его оценка. Самым первым и важным этапом ПЦР-ПДРФ является выделение ДНК из различного материала, которое предопределяет качество пробоподготовки и успех дальнейших исследований. Имеется множество методов выделения нуклеиновых кислот, такие как детергентный, фенольный, фенольно-детергентный, а также сорбционные способы экстракции, которые получили широкое распространение благодаря эффективному получению препаратов ДНК приемлемой чистоты и концентрации из биоматериала [244].

Этапы выделения ДНК включают быстрый лизис клеток, удаление фрагментов клеточных органелл и мембран с помощью центрифугирования, ферментативное разрушение белков протеиназами и экстрагирование ДНК из раствора с помощью фенола и хлороформа. Затем ДНК осаждают, как правило,

этанолом и после удаления надосадочной жидкости растворяют в буферном растворе [245].

В нашей работе для выделения ДНК ручным методом из крови крупного рогатого скота мы использовали набор Diatom TM Prep200 согласно инструкции фирмы изготовителя (Лаборатория Изоген, Москва), и «Pure Link Genomic DNA Kits» также согласно инструкции, прилагаемой к набору (Рисунок 4).



Рисунок 4 – Набор для ручного выделения ДНК «Pure Link Genomic DNA Kits»

Также можно выделить ДНК из другого биологического материала, например, волос или пятен крови с помощью автоматизированной системы для выделения нуклеиновых кислот из клеток Automate Express DNA extraction system (Рисунок 5), используя набор реагентов Charge Switch Forensic DNA Purification Kit (Life technologies, Invitrogen (Рисунок 6)).



Рисунок 5 – Автоматизированная система для выделения нуклеиновых кислот из клеток Automate Express DNA extraction system



Рисунок 6 – Набор для автоматического выделения нуклеиновых кислот Charge Switch Forensic DNA Purification Kit

Концентрацию выделенной ДНК проверяли на Qubit® 3.0 Fluorometer (Рисунок 7).



Рисунок 7 – Прибор для определения концентрации ДНК Qubit® 3.0 Fluorometer

Контрольные вопросы:

1. Основные принципы предотвращения контаминации при работе с биологическим материалом.
2. Какие существуют методы выделения ДНК?
3. Какие этапы включает в себя процедура выделения ДНК?

3.2 Амплификация полиморфных фрагментов генов соматотропинового каскада (*bPit-1*, *bGH*, *bGHR*, *bIGF-1*)

Полимеразная цепная реакция - экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе) [246]. Метод ПЦР основан на многократном

избирательном копировании (амплификации) определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах, с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК [247].

Для выполнения нескольких параллельных реакций готовят реакционную смесь, содержащий воду, буфер с хлоридом магния, полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты и праймеры в одной пробирке, который затем аликвотируется по индивидуальным пробиркам. Затем добавляется раствор, содержащий ДНК-матрицу [247].

Состав реакционной смеси:

- вода – 10 мкл;
- буфер – 2 мкл;
- dNTP – 2 мкл;
- хлорид магния – 2 мкл;
- прямой праймер – 2 мкл;
- обратный праймер – 2 мкл;
- полимеразы – 2;
- ДНК – 2 мкл.

Последовательности праймеров и условия ПЦР для анализа каждого полиморфизма приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Индивидуальные характеристики условий ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов соматотропинового каскада

Полиморфизм	Условия амплификации	Последовательности праймеров	Ссылки
<i>bPit-1</i> -HinfI	95° – 5 мин; (95 °C – 45 сек; 55,3 °C – 45 сек; 72 °C – 45 сек) x 34 цикла; 72 °C – 10 мин; 12 °C – 10 мин	HinfI-F: 5'-aaaccatcatctcccttctt-3' HinfI-R: 5'-aatgtacaatgtcttctgag-3'	[62]
<i>bPit-1</i> -StuI	95° – 5 мин; (95 °C – 45 сек; 55°С – 45 сек; 72 °C – 45 сек) x 34 цикла; 72 °C – 10 мин; 4 °C – ∞	StuI-F: 5'-caaatggctcctttctgttcag-3' StuI-R: 5'-ctttaaactcatggcaaatttc-3'	[108]
<i>bGH</i> -AluI	95 °C – 5 мин; (95 °C – 30 сек; 64 °C – 30 сек; 72 °C – 60 сек) x 35° циклов; 72 °C – 10 мин	AluI –F: 5'-ccgtgtctatgagaagc-3' AluI-R: 5"-gttcttgagcagcgct-3'	[148]
<i>bGHR</i> -SspI	95 °C – 3 мин; (95 °C – 30 сек; 62 °C – 30 сек; 72 °C – 30 сек) x 30° циклов; 72 °C – 10 мин; 12 °C – 5 мин	SspI-F: 5'-aatatgtagcagtgcacaatat-3' SspI-R: 5'-acgtttcactgggtgatga-3'	[196]
<i>bIGF-1</i> -SnaBI	95 °C – 5 мин; (95 °C – 30 сек; 64 °C – 30 сек; 72 °C – 30 сек) x 35 циклов; 72 °C – 10 мин	SnaBI-F: 5'-attcaaagctgcctgcccc-3' SnaBI-R: 5'-acacgtatgaaaggaact-3'	[248]

Контрольные вопросы:

1. Понятие полимеразной цепной реакции.
2. На чем основан метод ПЦР?

3. Из каких компонентов состоит реакционная смесь для амплификации ДНК?

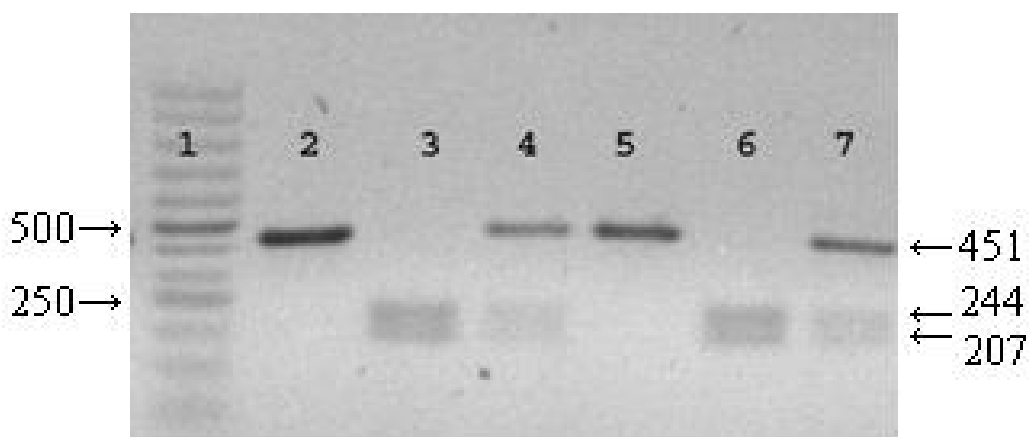
3.3 Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов включал обработку амплификата сайт-специфической рестриктазой и последующее разделение полученных фрагментов с помощью гель-электрофореза.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bPit-1* в шестом экзоне

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bPit-1* в шестом экзоне проводился с помощью рестриктазы *HinFI*. Полиморфизм обусловлен А→Г нуклеотидной заменой, не приводящей к изменению аминокислотной последовательности. Сайтом узнавания для рестриктазы *HinFI* является последовательность G↓ANTC. Разрезаемый в ходе ферментации фрагмент содержит нуклеотид А соответствующий аллелю *bPit-1-HinFI^B*. В случае присутствия Г нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bPit-1-HinFI^A*.

Длина амплифицируемого фрагмента гена *bPit-1* составляет 451 п.н. Длина фрагментов после рестрикции составляет 244 и 207 п.н. На электрофореграмме визуализируются варианты полос определенной длины, характерные для генотипов: одна полоса 451 п.н. (генотип *bPit-1-HinFI^{AA}*); две полосы 244 и 207 п.н. (генотип *bPit-1-HinFI^{BB}*); три полосы – 451, 244 и 207 п.н. (генотип *bPit-1-HinFI^{AB}*) (рисунок 8).



Дорожка 1 – маркер молекулярных масс O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва;

Дорожка 2 – ПЦР-продукт 451 п.н. фрагмента гена *bPit-1*-HinfI;

Дорожка 3, 6 – фрагмент рестрикции 244, 207 п.н., соответствующий генотипу *bPit-1*-HinfI^{BB};

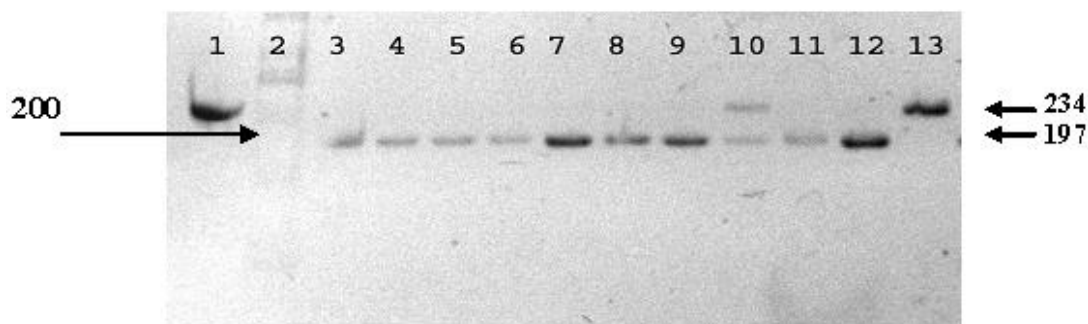
Дорожки 4, 7 – фрагменты рестрикции 451, 244, 207 п.н., соответствующие генотипу *bPit-1*-HinfI^{AB};

Дорожка 5 – фрагмент рестрикции 451 п.н., соответствующий генотипу *bPit-1*-HinfI^{AA}. Положение на геле специфических полос показано стрелками. Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле (SeaKem LE Agarose, Lonza, США)

Рисунок 8 - Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bPit-1*-HinfI

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bPit-1* в третьем экзоне

Исследование полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bPit-1* в третьем экзоне, обусловленного трансверсией С→А, вызывающей замену аминокислоты пролин на гистидин в белковой последовательности, проводился с помощью рестриктазы *StuI*. Сайтом узнавания для рестриктазы *StuI* является последовательность AGG↓CCT. В ходе ферментации разрезается фрагмент, содержащий нуклеотид С, соответствующий аллелю *bPit-1*-*StuI*^C [93]. В случае присутствия А нуклеотида сайт рестрикции исчезает, а такой аллель обозначен как аллель *bPit-1*-*StuI*^A. Длина амплифицируемого фрагмента гена *bPit-1* в третьем экзоне составляет 234 п.н. Длина фрагментов после рестрикции составляет 197 и 37 п.н. На электрофореграмме могут быть видны варианты полос определенной длины, характерные для генотипов: одна полоса 234 п.н. (генотип *bPit-1*-*StuI*^{AA}); две полосы 197 и 37 п.н. (генотип *bPit-1*-*StuI*^{CC}), три полосы 234, 197, 37 п.н. (генотип *bPit-1*-*StuI*^{AC}). Фрагмент рестрикции 37 п.н. на агарозном геле не визуализируется (рисунок 9).



Дорожка 1 – ПЦР-продукт 234 п.н. фрагмента гена *bPit-1-StuI*;

Дорожка 2 – маркер молекулярных масс O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва;

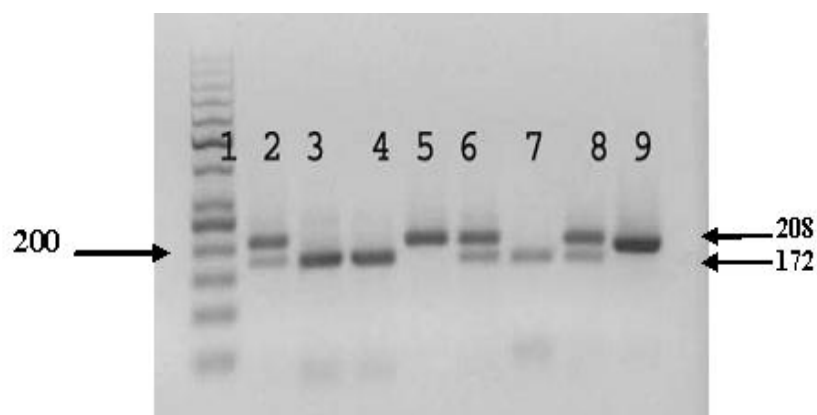
Дорожки 3 – 9, 11, 12 – фрагмент рестрикции 197 п.н., соответствующий генотипу *bPit-1-StuI^{CC}*; дорожка 10 – фрагменты рестрикции 234 и 197 п.н., соответствующие генотипу *bPit-1-StuI^{AC}*;

Дорожка 13 – фрагмент рестрикции 234 п.н., соответствующие генотипу *bPit-1-StuI^{AA}*. Фрагмент рестрикции 37 п.н. не визуализируется. Положение на геле специфических полос показано стрелками. Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле (SeaKem LE Agarose, Lonza, США)

Рисунок 9 — Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bPit-1-StuI*

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bGH* в пятом экзоне

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bGH* в пятом экзоне проводится с помощью рестриктазы *AluI*. Полиморфизм обусловлен транзицией С→G, приводящей к замене аминокислоты лейцин на валин в последовательности белка. Сайтом узнавания для рестриктазы *AluI* является последовательность AG↓CT. Распознаваемый ферментом аллель содержит нуклеотид С и обозначен как *bGH-AluI^L* [73]. В случае присутствия G нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bGH-AluI^V* (рисунок 10).



Дорожка 1 – маркер молекулярных масс O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва;

Дорожки 2, 6 – фрагменты рестрикции 208, 172, 35 п.н., соответствующие генотипу *bGH-AluI^{LV}*;

Дорожки 3, 4, 7 – фрагмент рестрикции 172 п.н., соответствующий генотипу *bGH-AluI^{LL}*;

Дорожка 5 – фрагмент рестрикции 208 п.н., соответствующий генотипу *bGH-AluI^{VV}*;

Дорожка 9 – ПЦР-продукт 208 п.н. фрагмента гена *bGH-AluI*. Фрагмент рестрикции 35 п.н. не визуализируется. Положение на геле специфических полос показано стрелками. Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле (SeaKem LE Agarose, Lonza, США)

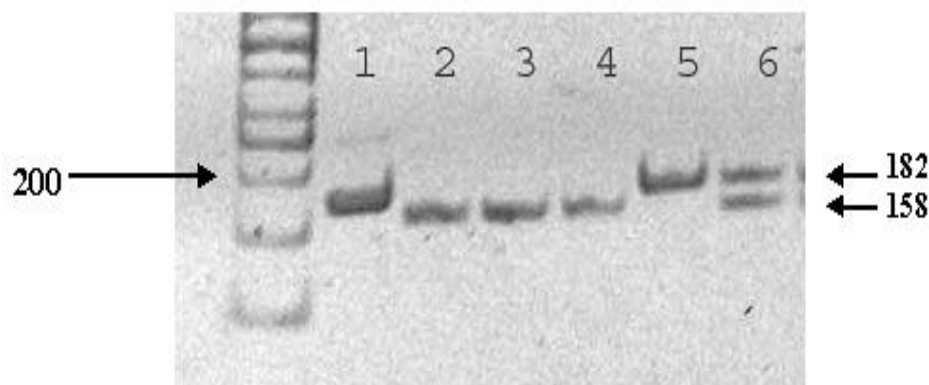
Рисунок 10 — Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bGH-AluI*

Длина амплифицируемого фрагмента гена *bGH* составляет 208 п.н. Длина фрагментов после рестрикции составляет 172 и 35 п.н. На электрофореграмме могут быть видны варианты полос определенной длины, характерные для генотипов: одна полоса 208 п.н. (генотип *bGH-AluI^{VV}*); две полосы 172 и 35 п.н. (генотип *bGH-AluI^{LL}*); три полосы 208, 172 и 35 п.н. (генотип *bGH-AluI^{LV}*). Фрагмент рестрикции 35 п.н. на агарозном геле не визуализируется.

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bGHR* в восьмом экзоне

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *bGHR* в восьмом экзоне проводился с помощью рестриктазы *SspI*. Рестриктаза *SspI* распознает Т→А транзицию в восьмом экзоне. Данная SNP вызывает подстановку полярного, хотя и незаряженного остатка тирозина вместо нейтрального фенилаланина в положении -279 белка. Сайтом узнавания для рестриктазы является последовательность ААТ↓АТТ. Разрезаемый ферментом

амплификат содержит нуклеотид Т соответствующий аллелю *bGHR-SspI^F* [170]. В случае присутствия А-нуклеотида сайт рестрикции исчезает, такой аллель обозначен как *bGHR-SspI^Y*. Длина амплифицируемого фрагмента гена *bGHR* составляет 182 п.н. Длина фрагментов после рестрикции 158 и 24 п.н. На электрофореграмме могут быть видны варианты полос определенной длины, характерные для генотипов: одна полоса 182 п.н. (генотип *bGHR-SspI^{YY}*), две полосы 158 и 24 п.н. (генотип *bGHR-SspI^{FF}*); три полосы – 182, 158 и 24 п.н. (генотип *bGHR-SspI^{FY}*). Фрагмент 24 п.н. на агарозном геле не визуализируется (рисунок 11).



Дорожка 1 – ПЦР-продукт 182 п.н. фрагмента гена *bGHR-SspI*;

Дорожки 2, 3, 4 – фрагмент рестрикции 158 п.н., соответствующий генотипу *bGHR-SspI^{FF}*;

Дорожка 5 – фрагмент рестрикции 182 п.н., соответствующий генотипу *bGHR-SspI^{YY}*;

Дорожка 6 – фрагменты рестрикции 182 и 158 п.н., соответствующие генотипу *bGHR-SspI^{FY}*. Фрагмент 24 п.н. не визуализируется. Использован маркер молекулярных масс O'Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва. Положение на геле специфических полос показано стрелками. Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле (SeaKem LE Agarose, Lonza, США)

Рисунок 11 – Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bGHR-SspI*

Анализ полиморфизма нуклеотидной последовательности гена инсулиноподобного фактора роста-1 *bIGF-1* в области P1 промоторного региона

Полиморфизм нуклеотидной последовательности гена инсулиноподобного фактора роста-1 *bIGF-1* в области P1 промоторного региона идентифицирован как Т→С трансверсия. Эта замена распознается рестриктазой *SnaBI*. Было выявлено два аллеля: аллель *bIGF-1-SnaBI^A* (с нуклеотидом Т), разрезаемый ферментом, и аллель *bIGF-1-SnaBI^B* с

нуклеотидом С, характеризующийся отсутствием сайта рестрикции [249]. Амплифицируется фрагмент гена *bIGF-1* длиной 249 п.н. Длина фрагментов после рестрикции составляет 223 и 26 п.н. На электрофореграмме могут быть видны варианты полос определенной длины, характерные для генотипов: одна полоса 249 п.н. (генотип *bIGF-1*-SnaBI^{BB}); две полосы 223 и 26 п.н. (генотип *bIGF-1*-SnaBI^{AA}); три полосы 249, 223 и 26 п.н. (генотип *bIGF-1*-SnaBI^{AB}). Фрагмент 26 п.н. на агарозном геле не визуализируется (рисунок 12).



Дорожка 1 – маркер молекулярных масс O’Range Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Литва;

Дорожка 2 – ПЦР-продукт 249 п.н. фрагмента гена *bIGF-1*-SnaBI;

Дорожки 3, 4 – фрагменты рестрикции 249 и 223 п.н., соответствующие генотипу *bIGF-1*-SnaBI^{AB};

Дорожки 5, 6 – фрагмент рестрикции 223 п.н., соответствующий генотипу *bIGF-1*-SnaBI^{AA};

Дорожка 7 – фрагмент рестрикции 249 п.н., соответствующий генотипу *bIGF-1*-SnaBI^{BB}. Фрагмент 26 п.н. не визуализируется. Положение на геле специфических полос показано стрелками. Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле (SeaKem LE Agarose, Lonza, США)

Рисунок 12 – Электрофореграмма ДНК-типирования полиморфизма *bIGF-1*-SnaBI

Генотип животных по исследуемым генам заносится в общую базу данных.

Контрольные вопросы:

1. Какова длина амплифицируемого фрагмента гена *bPit-1*?
2. Какая рестриктаза распознает Т→А транзицию в восьмом экзоне гена рецептора гормона роста?

3. Какой рестриктазой распознается полиморфизм гена инсулиноподобного фактора роста-1 *bIGF-1* в области P1 промоторного региона, идентифицированным как Т→С трансверсия?

3.4 Статистическая обработка данных для оценки эффективности маркеров

Результаты, полученные в экспериментальных исследованиях и данные зоотехнического и племенного учета, обрабатываются методами популяционно-генетического и биометрического анализа (П.Ф. Рокицкий, 1961; Н.А. Плохинский, 1970; Е.К. Меркурьева, 1977) с использованием программных возможностей «Microsoft Excel 2010» и «Statistica 6.0» (StatSoft, Inc. 1994 – 2001). При этом необходимы модули Basic Statistic / tables, Nonparametric Statistics [250].

Исследование генетической структуры анализируемых популяций КРС включает сравнение выборок по распределению частот аллельных вариантов генов соматотропинового каскада, а также оценку соответствия распределения частот генотипов теоретически ожидаемому в соответствии с законом Харди-Вайнберга.

Частоты генотипов определяются методом прямого подсчета

Относительные частоты аллелей исследуемых генов по формуле (1):

$$Q_{(A)} = (2N_1 + N_2) / 2n \quad (1)$$

где N_1 – число гомозигот по исследуемому аллелю;

N_2 – число гетерозигот;

n – объем выборки [251].

Статистическую ошибку относительных частот аллелей вычисляют по формуле (2):

$$S_Q = \sqrt{(Q(1-Q)/2n)} \quad (2)$$

где Q – относительная частота исследуемого аллеля;

n – объем выборки [252].

Сравнение выборок по распределению частот аллельных вариантов исследуемых генов проводят с помощью критерия χ^2 , формула (3). Число степеней свободы = 1:

$$\chi^2 = \sum (H_o - H_e) / H_e \quad (3)$$

где H_o – наблюдаемые частоты аллелей;

H_e – ожидаемые частоты аллелей [252].

В случае, если ожидаемые значения численности хотя бы в одном из классов оказывается меньше пяти, то расчет χ^2 осуществлялся с поправкой Йетса, формула (4):

$$\chi^2 = \sum ((H_o - H_e) - 0,5)^2 / H_e \quad (4)$$

Соответствие фактического распределения генотипов теоретически ожидаемому в соответствии с законом Харди-Вайнберга оценивается с помощью критерия χ^2 , формула (5). Число степеней свободы равняется одному (число генотипов минус число аллелей).

$$\chi^2 = \sum (H_o - H_e)^2 / H_e \quad (5)$$

где H_o – наблюдаемые частоты генотипов,

H_e – ожидаемые частоты генотипов: (6)

$$AA = p^2;$$

$$AB = 2pq;$$

$$BB = q^2 \text{ [252].}$$

В случае, если **ожидаемые** значения численности хотя бы в одном из классов оказывается меньше пяти, то расчет χ^2 осуществляется с поправкой Йетса:

$$\chi^2 = \sum ((H_o - H_e) - 0,5)^2 / H_e \quad (7)$$

Допустимое значение χ^2 для одной степени свободы и 5% уровня значимости составляет 3,84 [252].

При проведении статистического анализа для количественных данных первоначально необходимо определить характер распределения (Shapiro-Wilk` W test).

Если в одной из групп количественные признаки не имеют приближенно нормального распределения, или в одной из групп число выявленных животных с редкими генотипами меньше двадцати, то данные представляются в виде M_e (25%; 75%), где M_e медиана признака; 25% и 75% – интерквартильный размах характеризующий разброс распределения признака.

Оценку количественных признаков в таких случаях проводят с помощью методов непараметрической статистики [252, 253].

Статистическая оценка однородности выборок, а также оценка различий между группами с тремя возможными генотипами проводится методом рангового анализа вариаций для трех и более независимых групп по Краскелу-Уоллису (Kruskel-Wallis ANOVA) либо с помощью медианного теста.

Эти два теста являются непараметрическими альтернативами однофакторного дисперсионного анализа. Мы применяем t-критерий, чтобы

сравнить средние значения двух переменных. Если переменных больше двух, то применяется дисперсионный анализ. Английское сокращение дисперсионного анализа - ANOVA (analysis of variation).

Критерий Краскела-Уоллиса основан на рангах (а не на исходных наблюдениях) и предполагает, что рассматриваемая переменная непрерывна и измерена как минимум в порядковой шкале. Критерий проверяет гипотезу: имеют ли сравниваемые выборки одно и то же распределение или же распределения с одной и той же медианой. Таким образом, интерпретация критерия схожа с интерпретацией параметрической однофакторной ANOVA за исключением того, что этот критерий основан на рангах, а не на средних значениях.

Медианный тест - это «грубая» версия критерия Краскела-Уоллиса. При нулевой гипотезе (все выборки извлечены из популяций с равными медианами) ожидается, что примерно 50% всех наблюдений в каждой выборке попадают выше (или ниже) общей медианы. Медианный тест особенно полезен, когда шкала содержит искусственные границы, и многие наблюдения попадают в ту или иную крайнюю точку (оказываются «вне шкалы»).

В случаях, когда число животных в группе с редким генотипом было менее шести, такая группа исключалась из статистической обработки и сравнение проводилось с помощью U-критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test) для двух независимых групп. Достоверность отличия уровня продуктивности в группах с разными генотипами и парными сочетаниями генотипов от общей выборки определяли методом интервального оценивания, путем построения 95% доверительно интервала для медианы анализируемой группы и последующего сопоставления его с медианой общей выборки. Различия во всех случаях рассматриваются как статистически достоверные при уровне значимости $P < 0,05$.

Контрольные вопросы:

1. Что включает в себя исследование генетической структуры анализируемой популяции скота?
2. Как определяют относительные частоты аллелей?
3. Что первоначально необходимо определить при проведении статистического анализа для количественных данных?

Список использованных источников

- 1 Султангалиева Л.С. Развитие конкурентоспособности отрасли мясного животноводства Республики Казахстан // Вестник КазНУ-2013 г. – 2013. - № 4. - С. 93-101
- 2 Есполов Т.И. АПК Казахстана: глобализация и инновация. - Алматы: КазНАУ, 2012. - 436 с.
- 3 Программа развития экспортного потенциала мяса КРС РК на 2011-2020 гг.
- 4 Послание Президента Республики Казахстан - Лидера нации Нурсултана Назарбаева народу Казахстана «Стратегия «Казахстан-2050» - новый политический курс состоявшегося государства» // «Казахстанская правда». - 2012. - № 437-438 (27256-27257).
- 5 Еремеева Н.В., Калачев С.Л. Конкурентоспособность товаров и услуг. - М.: КолосС, 2006. - 192 с.
- 6 Послание Президента Республики Казахстан Н. Назарбаева народу Казахстана «Социально-экономическая модернизация - главный вектор развития Казахстана» // «Казахстанская правда». - 2011. - № 401 (27220).
- 7 Зиновьева Н.А., Попов А.П., Эрнст А.П., Марзанов Н.С., Бочкарев В.В., Стрекозов Н.И. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве. - Дубровицы: ВИЖ, 1998. – 47 с.
- 8 Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Проблемы биотехнологии и селекции сельскохозяйственных животных. - Дубровицы: ВИЖ, 2004. - 316 с.
- 9 Гетманцева Л.В., Святогорова А.Е., Леонова М.А., Усатов А.В. Влияние полиморфизма гена MUC4 на репродуктивные качества свиней // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014". - 2014г. - С. 504–505.
- 10 Костюнина О.В., Зиновьева Н.А., Сизарева Е.И., Калугина А.И., Гладырь Е.А., Гетманцева Л.В., Форнара М.С., Харзинова В.Р. Полиморфизм гена рецептора меланокортина MC4R и его влияние на мясные и откормочные качества свиней // Достижения науки и техники АПК. - 2012. - № 8. - С.49-51.
- 11 Никитин В.Я., Миролюбов М.Г. Ветеринарное акушерство и биотехника размножения. - М.: Колос, 2000. – 210 с.
- 12 Хейн Ван Дер Стинг. Генетика кому она нужна? // Свиноводство. - 1998. - №3. - С.28-29.
- 13 Серебровский А. С. Генетический анализ: Монография. - М.: Наука, 1970. - 344 с.

- 14 Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т.17, №4. – С.1044- 1054.
- 15 Селионова М.И., Айбазов М.М. Геномные технологии в селекции сельскохозяйственных животных // Сборник научных трудов всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. - 2014. - С.140-145
- 16 Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи современной биологии. - 2004. - Т.124. - С.260–271.
- 17 Biochard D. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds // Genet Sel Evol. – 2003. – V.35. – № 1. – P.77–101.
- 18 Cheung V.G., Spielman R.S. The genetics of variation in gene expression // Nature Genet. – 2002. – V.32. – P. 522–525.
- 19 Coronini R. Decoding the literature on genetic variation // Nature Biotechnol. – 2003. – V.21. – № 1. – P.21–29.
- 20 Fries R., Durstewitz G. Digital DNA signatures: SNPs for animal tagging // Nature Biotechnology. – 2001. – V.19. – P. 508-516.
- 21 Gilmour A.R. An efficient computing strategy for prediction in mixed linear models // Computational Statistics and Data Analysis. – 2004. – V.44. – №4. – P.571–586.
- 22 Heaton M. P. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U. S. beef cattle // Mamm. Genome. – 2002. – V.13. – P.272–281.
- 23 Калашникова Л.А., Дунин И.М., Глазко В.И. Селекция XXI века: использование ДНК- технологий. – Московская обл., Лесные Поляны: ВНИИплем, 2000. – 31 с.
- 24 Heine W.E., Klein P.D., Reeds P.J. The importance of alpha-lactalbumin in infant nutrition // J. Nutr. – 1991. - V.121 (3). - P.277–283.
- 25 Voelker G.R., Bleck G.T., Wheeler M.B. Single-base polymorphisms within the 5' flanking region of the bovine α -lactalbumin gene // J. Dairy Sci. - 1997. – V. 80. - P.194-197.
- 26 Колчев А., Симонович О. Влияние концентрации соматических клеток на качественные и технологические свойства молока // Главный зоотехник. – 2010. – №3. – С.27-30.
- 27 Bojarójc-nosowicz B., Kaczmarczyk E., Bongarc E., Małolepszy J. Natural BLV infection and polymorphism within the 5' flanking region of the α -lactalbumin gene in black-and-white breed cattle // Bull Vet. Inst. Pulawy. - 2005. - V.49. - P.439-442.
- 28 Lundén A., Lindersson M. α -Lactalbumin polymorphism in relation to milk lactose // "Proc. VIth World Congr. on Gen. Appl. to Livestock Prod., Armidale, NSW, Australia, 11-16 January". - 1998. - V.25. - P.47-50.

- 29 Braunschweig M., Stranzinger G., Puhan Z. A PvuII PCR-RFLP test for the bovine β -lactoglobulin D allele // *Animal Genetics*. – 1999. – V.30. – P.76-84.
- 30 Лазебная И.В., Лазебный О.Е., Сулимова Г.Е. Исследование генетической изменчивости якутской породы (*Bos taurus* L.) крупного рогатого скота с использованием генов пролактина bPRL, гормона роста bGH и транскрипционного фактора bPitI // *Генетика*. - 2010. - Т.46, № 3. - С.425-428.
- 31 Лазебная И.В., Лазебный О.Е., Рузина М.Н., Бадин Г.А., Сулимова Г.Е. Полиморфизм генов гормона роста bGH и пролактина bPRL и изучение его связи с процентным содержанием жира в молоке у коров костромской породы // *Сельскохозяйственная биология*. - 2011. - №4. - С.46-51.
- 32 Сулимова Г. Е., Лазебная И. В., Лазебный О.Е. Патент на изобретение «Способ определения генетического потенциала крупного рогатого скота по качеству молока», регистрационный № 2317704 от 27.02.2008.
- 33 Сулимова Г.Е., Лазебная И.В., Штыфурко Т.А., Рябинина О.М., Уханов С.В., Бадин Г.А. Анализ генофонда костромской породы крупного рогатого скота с использованием ДНК-маркеров для генов каппа-казеина, пролактина, гормона роста и BOLA-DRB3 // *Материал 59-ой международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе»*. – 2008. - Т.3. - С.183-185.
- 34 Dybus A., Grzesiak W., Kamieniecki H., Szatkowska I., Sobek Z., Blaszczyk P., Czerniawska-Piątkowska E., Zych S., Muszynska M. Association of genetic variants of bovine prolactin with milk production traits of Black-and White and Jersey cattle // *Arch. Tierz., Dummerstorf*. – 2005. – V.48. - № 2. – P.149-156.
- 35 Smas C. M., Sul H. S. Control of adipocyte differentiation // *Biochem. J.* - 1995. - №309. - P. 697- 710.
- 36 Barendse W. World Intellectual Property Organization; Geneva: 1999. Assessing Lipid Metabolism, International Patent Publication WO 99/23248.
- 37 Thaller G., Kühn C., Winter A., Ewald G., Bellmann O., Wegner J., Zühlke H., Fries R. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle // *Anim Genet*. – 2003. - V.34(5) . – P.354-357.
- 38 Sorensen B.M., Furukawa-Stoffer T.L., Marshall K.S., Page E.K., Mir Z., Forster R.J., Weselake R. Storage lipid accumulation and acyltransferase action in developing flaxseed // *Lipids*. - 2005 V.40. - P.1043-1049
- 39 Moore S, Li C., Basarab J, Snelling W., Kneeland J., Murdoch B., Hansen C., Benkel B. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a

- commercial line of Bos Taurus // J Anim Sci. – 2004. - V. 81. - P. 1919-1925.
- 40 Friedman M., Halaas J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals // Nature. – 1998. – V.395. – № 6704. – P.763-770.
- 41 Hossner K.L. Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: Potential application in animal production // Can. J. Anim. Sci. 1998. - V.78. - P. 463-472.
- 42 Buchanan F.C., Fitzsimmons C.J., Van Kessel Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels // Genetics Selection Evolution. - 2002. - V.34 (1). - P.105-110.Э
- 43 Белая Е.В. Ассоциация полиморфных генов соматотропинового каскада с признаками молочной продуктивности у крупного рогатого скота: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.02.07. - М.: Государственное научное учреждение "Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси", 2012. – 110 с
- 44 Белая Е.В., Михайлова М.Е., Батин Н.В. Комбинированные фенотипические эффекты полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада (bPit-1, bPRL, bGH, bGHR и bIGF-1) на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы // Молекулярная и прикладная генетика: сб.науч.тр. – 2012. – Т. 13. – С. 36–43.
- 45 Михайлова М.Е., Белая Е.В. Влияние полиморфных вариантов генов соматотропинового каскада bGH, bGHR и bIGF-1 на признаки молочной продуктивности у крупного рогатого скота голштинской породы // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2011. – Т. 55, № 2. – С.63–69.
- 46 Holt R.I.G., Simpson H.L., Sonksen P.H. The role of the growth hormone-insulin-like growth factor axis in glucose homeostasis // Diabet Med. - 2003. - V.20. – P.3–15.
- 47 Le Roith D., Bondy K., Yakar S., Liu J.-L., Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001 // Endocr Rev. - 2001. - V.22(1) . - P.53-74.
- 48 Rodriguez S., Gaunt T.R., Day I.N. Molecular genetics of human growth hormone, insulin-like growth factors and their pathways in common disease // Hum. Genet. – 2007. - V.122. - P.1–21.
- 49 Holt R.I., Sönksen P.H. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport // Br. J. Pharmacology. – 2008. - V.154. – P.542–556.
- 50 Phillips J.A. III Inherited defects in growth hormone synthesis and action. In: The metabolic and molecular basis of inherited disease. Ed. by C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. 7-th Edition // McGraw-Hill Health Professions Division. - 1995. - V.2. - P.3023-3044.
- 51 Léger J., Mercat I., Alberti C., Chevenne D., Armoogum P., Tichet J., Czernichow P. The relationship between the GH/IGF-I axis and serum

- markers of bone turnover metabolism in healthy children // *Eur J Endocrinol.* - 2007 - V.157(5). – P.685-692.
- 52 Li G., Del Rincon J.P., Jahn L.A., Wu Y., Gaylinn B., Thorner M.O., Liu Z. Growth hormone exerts acute vascular effects independent of systemic or muscle insulin-like growth factor I. // *J. Clin. Endocrinol Metab.* - 2008. - V. 93. – P.1379–1385.
 - 53 Velloso C.P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I // *Br. J. Pharmacol.* - V. 154. – P. 557–568.
 - 54 Chen E.Y., Liao Y.C., Smith D.H., Barrera-Saldana H.A., Gelinas R.E., Seeburg P.H. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution // *Genomics.* – 1989. - V.4(4). - P.479-497.
 - 55 Fisker S., Kristensen K., Rosenfalck A.M., Pedersen S.B., Ebdrup L., Richelsen B., Hilsted J., Christiansen J.S., Jorgensen J.O. Gene expression of a truncated and the full-length growth hormone (GH) receptor in subcutaneous fat and skeletal muscle in GH-deficient adults: impact of GH treatment // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2001. - V.86. – P.792–796.
 - 56 Leung D.W., Spencer S.A., Cachianes G., Hammonds R.G., Collins C., Henzel W.J., Barnard R., Waters M.J., Wood W.I. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression // *Nature.* - 1987. - V. 330. – P.537–543.
 - 57 Baumann G.P. Growth hormone isoforms // *Growth Hormone and IGF Research.* -2009. - V.19. –P.333-340.
 - 58 Creighton C.J., Casa A., Lazard Z., Huang S., Tsimelzon A., Hilsenbeck S.G., Osborne C.K., Lee A.V. Insulin-like growth factor-I activates gene transcription programs strongly associated with poor breast cancer prognosis // *J Clin Oncol.* – 2008. - V.26(25). - P.4078-4085.
 - 59 Anderson B., Rosenfeld M.G. Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland // *J. Biol. Chem.* - 1994. - V.269. - P.29335-29338.
 - 60 De Mattos K.K., Del Lama S.N., Martinez M.L., Freitas A.F., 2004. Association of bGH and Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls // *Braz. J. Agric. Res.* – 2004. - V.39. - P.147–150.
 - 61 Ingraham H.A., Chen R., Mangalam H.J., Elsholtz H.P., Flynn S.E., Lin C.R, Simmons D.M., Swanson L., Rosenfeld M.G. A tissue specific transcription factor containing a homeo domain specifies a pituitary phenotype // *Cell.* - 1988. - V.55. - P.519-529.
 - 62 Renaville R., Gengler N., Vrech A., Prandi A., Massart S., Corradini C., Bertozzi C., Mortiaux F., Burny A., Portetelle D. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein–Friesian bulls // *J. Dairy Sci.* -1997b. - V.80. – P. 3431–3438.
 - 63 Mangalam H.J., Albert V.R., Ingraham H.A., Kapiloff M. L., Wilson C., Nelson H., Elsholtz M.G., Rosenfeld A pituitary POU-domain protein, Pit-1

- activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally // *Genes Dev.* - 1989. - V.3. - P.946-958.
- 64 Sturm R.A., Das G., Herr W. The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain // *Genes & Dev.* - 1988. - V.2. - P. 1582-1599.
 - 65 Klemm J.D., Pabo C.O. POU domain-DNA interactions: Cooperative binding of isolated subdomains and effects of covalent linkage // *Genes & Dev.* - 1996. - V.10. - P.27-36.
 - 66 Nelson C., Albert V.R., Elsholtz H.P., Lu L.I.-W., Rosenfeld M.G. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor // *Science.* -1988. - V. 239. - P. 1400-1405.
 - 67 Ohta K., Nobukuni Y., Mitsubuchi H., Ohta T., Tohma T., Jinno Y., Endo F., Matsuda I. Characterization of the gene encoding human pituitary-specific transcription factor, Pit-1 // *Gene.* - 1992. – V. 122. - P. 387-388.
 - 68 Li S., Crenshaw III E.B., Rawson E.J., Simmons D.M., Swanson L.W., Rosenfeld M.G. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene Pit-1 // *Nature.* - 1990. - V.347. - P.528-534.
 - 69 Moody D.E., Pomp D., Barendse W. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine Pit-1 gene and assignment of Pit-1 to bovine chromosome 1 // *Animal Genetics.* - 1995. - V. 26. - P. 45-47.
 - 70 Bodner M., Castrillo J.-L., Theill L.E., Deerinck T., Karin M. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox – containing protein // *Cell.* - 1988. - V.55. - P.505-518.
 - 71 Miyai S., Yoshimura S., Iwasaki Y., Takekoshi S., Lloyd R.V., Osamura R.Y. Introduction of GH, PRL, and TSH beta mRNA by transcription Pit-1 in a human pituitary adenoma-derived cell line // *Cell Tissue Res.* - 2005. - V.322. - P. 269-277.
 - 72 Konzak K.E., Moore D. Functional isoforms of Pit-1 generated by alternative messenger RNA splicing // *Mol. Endocrinol.* - 1992. - V.6. - P.241-247.
 - 73 Theill L.E., Hattori K.D., Lazzaro J.L., Castrillo, M. Karin Differential splicing of the GHF1 primary transcript gives rise to two functionally distinct homeodomain proteins // *Embo. J.* - 1992. - V. 11. - P. 2261-2269.
 - 74 Haugen B.R., Wood W.M., Gordon D.F., Ridgway E.C. A thyrotrope-specific variant of Pit-1 transactivates the thyrotropin beta promoter // *J. Biol. J. Biol. Chem.* - 1993. - V.268. - P.20818-20824.
 - 75 Haugen B.R., Gordon D.F., Nelson A.R., Wood W.M., Ridgway E.C. The combination of Pit-1 and Pit-1T have a synergistic stimulatory effect on the thyrotropin β -subunit promoter but not the growth hormone or prolactin promoters // *Mol. Endocrinol.* -1994. - V.8. - P.1574-1582.

- 76 Woollard, J., C. B. Schmitz, A. E. Freeman, and C. K. Tuggle. 1994. Rapid communication: HinfI polymorphism at the bovine Pit1 locus. *J. Anim. Sci.* 72:3267
- 77 Morris S.L., Nair J., Rouse D.A. The catalase-peroxidase of *Mycobacterium intracellulare*: nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli* // *J Gen Microbiol.* - 1992. - V.138(11). - P.2363–2370.
- 78 Tanaka M., Yamamoto I., Ohkubo T., Wakita M., Hoshino S., Nakashima K. cDNA cloning and developmental alterations in gene expression of the two Pit-1/ GHF-1 transcription factors in the chicken pituitary // *General and Comparative Endocrinology.* - 1999. - V.114. - P.441-448.
- 79 Voss J.W., Yao T-P., Rosenfeld M.G. Alternative translation initiation site usage results in two structurally distinct forms of Pit-1 // *Journal of Biological Chemistry.* - 1991. - V. 266. - P.12832–12835.
- 80 Delhase M., Vila V., Hooghe-Peters E.L., Castrillo J.L. A novel pituitary transcription factor is produced by alternative splicing of the human GHF-1/PIT-1 gene // *Gene.* - 1995. - V.155 (2). - P.273-275.
- 81 Crenshaw E.B., Kalla K., Simmons D.M., Swanson L.W., Rosenfeld M.G. Cell-specific expression of the prolactin gene in transgenic mice is controlled by synergistic interactions between promoter and enhancer elements // *Genes Dev.* - 1989. - V.3(7). - P.959-972.
- 82 Lira S.A., Crenshaw E.B., 3rd, Glass C.K., Swanson L.W., Rosenfeld M.G. Identification of rat growth hormone genomic sequences targeting pituitary expression in transgenic mice // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1988. - V.85. - P.4755–4759.
- 83 Bunt J.C., Boileau R.A., Bahr J.M., Nelson R.A. Sex and training differences in human growth hormone levels during prolonged exercise // *J Appl Physiol.* - 1986. - V.61. - P. 1796–1801.
- 84 Gordon D.F., Quick D.P., Ewin C.P., Donelson J.E., Maurer R.A. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene // *Molecular and Cellular Endocrinology.* - 1983. - V.33. - P.81-95.
- 85 Lingappa V.R., Devillers-Thierry A., Blobel G. Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin // *Proc Natl AcadSci USA.* - 1977. - V. 74. - P. 2432-2436.
- 86 Simmons D.M., Voss J.W., Ingraham H.A., Holloway J.M., Broide R.S., Rosenfeld M.G., Swanson L.W. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors // *Genes Dev.* - 1990. - V.4. -P.695-711.
- 87 Steinfelder H.J., Hauser P., Nakayama Y., Radovick S., McClaskey J.H., Taylor T., Weintraub B.D., Wondisford F.E. Thyrotropin-releasing hormone regulation of human TSH β expression: role of a pituitary specific transcription factor (Pit-1/GHF-1) and potential interaction with a thyroid

- hormone-inhibitory element // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. - V.88. - P.3130-3134.
- 88 Lin C., Lin S.C., Chang C.P., Rosenfeld M.G. Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone-releasing factor mediates pituitary cell growth // *Nature.* – 1992. - V.360. - P.765–768.
 - 89 Dollé P., Castrillo J.L., Theill L.E., Deerinck T., Ellisman M., Karin M. Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of growth hormone gene activity // *Cell.* – 1990. - V.60(5). – P.809-820.
 - 90 Bartke A. Histology of the anterior hypophysis, thyroid and gonads of two types of dwarf mice // *Anatomical Record.* – 1964. - V.149. – P.225-236.
 - 91 Chen R., Ingraham H.A., Treacy M.N., Albert V.R., Wilson L., Rosenfeld M.G. Autoregulation of Pit-1 gene expression is mediated by two cis-active elements // *Nature.* – 1990. - V.346. –P.583–586.
 - 92 Sinha Y.N., Salocks C.B., Vanderlaan W.P. Pituitary and serum concentrations of prolactin and GH in Snell dwarf mice // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1975. - V.150. - P.207–210.
 - 93 Cohen L.E., Wondisford F.E., Salvatoni A., Maghnie M., Brucker-Davis F., Weintraub B.D., Radovick S. A "hot spot" in the Pit-1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency: clinical and molecular correlates // *J. Clin Endocrinol Metab.* – 1995. - V.80(2). – P.679-684.
 - 94 Stancekova K., Vasicek D., Peskovicova D., Bulla J., Kubek A. Effect of genetic variability of the porcine pituitary-specific transcription factor (Pit-1) on carcass traits in pigs // *Anim. Genet.* – 1999. - V.30. – P.313-315.
 - 95 Yu T.P., Tuggle C.K., Schmitz C.B., Rothschild M.F. Association of Pit-1 polymorphism with growth and carcass traits in pigs // *J. Anim. Sci.* – 1995. - V.73. - P.1282-1288.
 - 96 Zhao Q., Davis M. E., Hines H. C. Associations of polymorphisms in the Pit-1 gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle // *J. Anim. Sci.* - 2004. - V.82. - P. 2229-2233.
 - 97 Dierkes B., Kriegesmann B.B. Baumgartner B.G., Brenig B. Partial genomic structure of bovine Pit1 gene and characterization of a *HinfI* transition polymorphism in exon 6 // *Anim. Genet.* - 1998. - V.29. - P.398-413.
 - 98 Тюлькин С.В., Хатыпов И.И., Муратова А.В., Ахметов Т. М., Равилов Р.Х., Вафин Р. Р. Полиморфизм гена гипофизарного фактора транскрипции у быков-производителей Республики Татарстан // *Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана.* - 2015. - №222 . - С.218-220.
 - 99 Dybus A., Szatkowska I., Czerniawska-Piátkowska E., Grzesiak W., Wojcik J., Rzewucka E., Zych S. PIT1-*HinfI* gene polymorphism and its associations with milk production traits in polish Black-and-White cattle // *Archives of Animal Breeding.* – 2004. – V.47. – P.557-564.
 - 100 Klauzinska M. Polymorphism in 5' flanking region of prolactin gene in cattle // *European Journal of Biochemistry.* - 2001. – V.1. - P.189-193.

- 101 Moravčíková N., Trakovická A., Miluchová M., Bujko J., Navrátilová A. HinfI polymorphism of Pit-1 gene in Slovak spotted cattle // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – 2013. – V.1. – P.1883-1890.
- 102 Oprzadek J., Flisikowski K., Zwierzchowski L., Dymnicki E. Polymorphism at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black-and-White bulls // Animal Science Papers and Reports. – 2003. – V.21. – P.135-145.
- 103 Hori-Oshima S., Barreras-Serrano A. Relationships between DGAT1 and PIT-1 genes polymorphism and milk yield in Holstein cattle // Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science. - 2003. - V.54. - P.56–63.
- 104 Jakaria, Noor R.R. Identification of a Single Nucleotide Polymorphism at Hinf-1 Enzyme Restriction Site of Pit-1 Gene on Indonesian Bali Cattle Population // Media Peternakan. – 2015. – V.38 (2). – P.104-109.
- 105 Михайлова М.Е., Белая Е.В., Волчок Н.М., Камыш Н.А. Генотипирование полиморфных вариантов генов гомона роста (GH) и рилизинг-фактора (PIT-1) ассоциированных с молочной продуктивностью крупного рогатого скота // Материалы 7-й международной научной конференции школы «Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: роль нанотехнологий в реализации приоритетных задач биотехнологии». - Дубровицы, 2008. - С. 185-189.
- 106 Mohammad Ali Edriss, Vahid Edriss and Hamid Reza Rahmani. Association of PIT-1 gene polymorphism with birth weight, milk and reproduction traits in Isfahan Holstein cows // Archiv Tierzucht. - 2009. - V.52. –P.445-447.
- 107 Pan C., Lan X., Chen H., Guo Y., Wang X. A TaqI PCR-RFLP Detecting a novel SNP in exon 2 of the Bovine POU1F1 gene // Biochemical Genetics. – 2008. – V.46. - №7-8. –P.424-432.
- 108 Huang W., Maltecca C. and Khatib H. A proline-to-histidine mutation in POU1F1 is associated with production traits in dairy cattle // Animal Genetics. – 2008. - V.39. – P.554–557.
- 109 Zwierzchowski L., Oprzadek J., Dymnicki E., Dzierzbicki P. An association of growth hormone, α -casein, β -lactoglobulin, leptin and Pit-1 loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle // Animal Science Papers and Reports. - 2001. - V.19. - P. 65-77.
- 110 Di Stasio L., Sartore S., Alberta A. Lack of association of GH1 and POU1F1 gene variants with meat production traits in Piedmontese cattle // Anim. Genet. – 2002. - V.33. - P.61–64.
- 111 Rogério A.C., Darío A.P., Liliane S., Henrique N., de Oliveira Antonio C.S., Catalina R.L. Growth and carcass traits associated with GH1/AluI and POU1F1/Hinf I gene polymorphisms in Zebu and crossbred beef cattle // Genet. Mol. Biol. – 2006. - V.29 (1). - P.56–61.

- 112 Davis M.E., Simmen R.C.M Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor I concentration and performance traits in Angus beef cattle // J. Anim. Sci. -1997. - V.75. - P.317-324.
- 113 Zhao Q., Davis M.E., Hines H.C. Association of two Pit-1 polymorphisms with growth rate in beef cattle // J. Anim. Sci. - 2000. - V.78 (1). - P. 77-84.
- 114 Zhao Q., Davis M.E., Hines H.C. Relationships of polymorphisms in the Pit-1 gene with growth traits in beef cattle // Research and Reviews. – 2001. - V.181. - P.35-40.
- 115 Zhao Q., Davis M.E., Hines H.C. Two Pit-1 RFLPs and their association with growth traits in beef cattle // J. Anim. Sci. – 1992. - V.80(2) . - P.44-50.
- 116 Xue K., Chen H., Wang S., Cai AI X., Liu B., Zhang C-F., Lei C-Z., Wang X-Z, Wang Y-M., Niu H. Effect of Genetic Variations of the POU1F1 Gene on Growth Traits of Nanyang Cattle //Acta Genetica Sinica. - 2006. - V.33 (10). - P.901-907.
- 117 Dybus A. Associations of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish black and white cattle // Anim Sci Pap Rep. - 2002. - V.20. - P.203-212.
- 118 Parmentier I., Portetelle D., Gengler N., Pradi A., Bertozzi C., Vleurick L., Gilson R., Renaville R. Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection // Domest. Anim. Endocrinol. -1999. – V.17. –P. 139–148.
- 119 Zwierzchowski L., Krzyzewski J., Strzalkowska N., Siadkowska E., Ryniewicz A. Effect of polymorphisms of growth hormone(GH), Pit-1, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black-and-White cows // Anim. Sci. Pap. Rep. – 2002. –V.20. – P.213–227.
- 120 Edriss V., Edriss A., Rahmani H. R. Pit1 Gene polymorphism of Holstein Cows in Isfahan Province // Biotechnology. – 2008. - V.7 (2). - P.209-212.
- 121 Hediger R., Johnson S.E., Barendse W., Drinkwater R.D., Moore S.S., Hetzel J. Assignment of the growth hormone gene locus to19q26-qter in cattle and to 11q25-qter in sheep by in situ hybridization // Genomics. - 1990. - V.8 (1). - P.171-174.
- 122 Parks J.S. Molecular biology of growth hormone // Acta Paediatr Scand. – 1989. – V.349. –P.127-135.
- 123 Struthers R. S., Gaddy-Kurten D., Vale W.W. Activin inhibits binding of transcription factor Pit-1 to the growth hormone promoter // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. - V.89. – P.11451-11460.
- 124 Frohman L.A., Down T.R., Chomezynski P. Regulation of growth hormone secretion // Front Neuroendocrinology. - 1992. – V.13 (4). – P. 344-405.
- 125 Nickel B. E., Nachtigal M.W., Bock M. E., Cattini P.A. Differential binding of rat pituitary-specific nuclear factors to the 5'-flanking region of pituitary and placental members of the human growth hormone gene family // Mol Cell Biol. – 1991. - V.106. - P.181-190.

- 126 Lipkin S. M., Naar A.M., Kalla K.A., Sack P.A., Rosenfeld M.G. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent hormone gene expression // *Genes Dev.* – 1993. – V.7. – P.1674-1680.
- 127 Schaufele F. CCAAT/enhancer-binding protein alpha activation of the rat growth hormone promoter in pituitary progenitor GHRT1-5 cells // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V.271. – P.21484-21489.
- 128 Scanes C.G., Harvey S. Growth hormone action: carbohydrate metabolism, lipid metabolism, protein metabolism // Scanes CG, Daughaday WH, eds. *Growth hormone*. Boca Raton: CRC Press. – 1995. – P.371–391.
- 129 Bauman D.E. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application // *Domest Anim Endocrinol.* – 1999. – V.17. – P.101-116.
- 130 Cooke N.E., Liebhaber S.A. Molecular biology of the growth hormone-prolactin gene system // *Vitam. Horm.* – 1995. – V.50. – P.385-394.
- 131 Rotwein, P., Gronowski A.M., Thomas M. J. Rapid nuclear actions of growth hormone // *Horm. Res.* – 1994. – V.42. – P.170–175.
- 132 Carter-Su C., Schwarts J., Smit L. 1996. Molecular mechanism of growth hormone action // *Aim. Rev. Physiol.* – 1996. – V.58. – P.187-194.
- 133 Gronowski A.M., Zhong Z., Wen Z., Thomas M.J., Darnell J.E., Rotwein P. In vivo growth hormone treatment rapidly stimulates the tyrosine phosphorylation and activation of Stats // *Mol. Endocrinol.* – 1995. – V.9. – P.171-181.
- 134 Nenthe L.A., Violan B.N., Ganguli A., Hintz R.L., Kung L., Krivi G.G., Lanza G.M. Comparison of the galactopoietic response to pituitary-derived variants of bovine growth hormone // *J. Endocrinol.* – 1992. – V.132. – P.47-53.
- 135 Przadek J., Dymnicki E., Zwierzchowski L., Lukaszewicz M. The effect of growth hormone (GH), k-casein (CASK) and b-lactoglobulin (BLG) genotype on carcass traits in Friesian bulls // *Animal Science Papers and Reports.* – 1999. – V.17. – P. 85-92.
- 136 Renek P., Kmet I, Sakowski T., Vasicek T., Huba I, Chrenek I., Relationships of growth hormone genotype with meat production traits of Slovak Pied bulls // *Czech Journal of Animal Science.* – 1998. – V.43. – P. 541-544.
- 137 Sirotkin A.V., Chrenek K P., Makarevich A.V., Huba J. Bula. Interrelationships between breed, growth hormone genotype, plasma IGF-1 level and meat performance in bulls of different ages. // *Archives of Animal Breeding.* – 2000. – V.43. – P.591-596.
- 138 Grochowska R., Lunden A., Zwierzchowski L., Snochowski M., Oprzajek J. Association between gene polymorphism of growth hormone and carcass traits in dairy bulls // *Animal Science.* – 2001. – V.72. – P.441-447.

- 139 Schlee P., Graml R., Rotmann O., Pirchner F. Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls // *Journal of Animal Breeding and Genetics*. – 1994. - V.111. – P.253-256.
- 140 Switonski M. Molecular genetics in beef cattle breeding // *Animal Science Papers and Reports*. – 2002. - V.207. – P.18-24.
- 141 Pawar R.S., Joshi C.G., Rank D.N. Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle. // *Indian journal of animal science*. – 2007. – V.9. – P.884-888
- 142 Van der Velf J.J., Verburg F., Garssen G.J. 1996. Evidence for a strong effect of the AluI polymorphism in the growth hormone gene on yield characteristics in dairy cattle // *Proceedings of the 47th Annual Meeting of the EAAP*. – 1996. – V.2. – P.310-316.
- 143 Ильясов А.Г. Полиморфизм гена гормона роста крупного рогатого скота в связи с продуктивностью в Республике Башкортостан: автореф. канд. с.-х. наук: 06.02.01 - М.: Уфа, 2008. – 120 с.
- 144 Хатами С.Р. ДНК-полиморфизм генов пролактина и гормона роста у ярославской и черно-пестрой породы крупного рогатого скота: автореф. канд. биол. наук: 03.00.15. - Москва, 2004. – 91 с.
- 145 Хабибрахманова Я.А. Полиморфизм генов молочных белков и гормонов крупного рогатого скота: диссертация канд. с.-х. наук: 06.02.01. - М.: ВНИИплем. Лесные Поляны Московской обл., 2009. - 123с.
- 146 Dario C., Carnicella D., Ciotola F., Peretti V., Bufano G. Polymorphism of growth hormone GH1-AluI in Jersey cows and its effect on milk yield and, composition. // *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. - 2008. - V.21. - P.1-5.
- 147 Chung E.R., Rahim T.J., Han S.K. Associations between PCR–RFLP markers of growth hormone and prolactin genes and production traits in dairy cattle // *Korean Journal of Animal Sciences*. - 1996. -V. 38. - P.321–336.
- 148 Lucy M.C., Hauser S.D., Eppard P.J., Krivi G.G., Clark J.H., Bauman D.E., Collier R.J. Variants of somatotropin in cattle: Gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production // *Domestic Animal Endocrinology*. - 1993. - V.10. - P. 325-333.
- 149 Zhang H.M., Brown D.R., DeNise S.K., Ax R.L. 1993. A novel allele of the bovine somatotropin gene detected by PCR-RFLP analysis // *J. Anim.Sci*. - 1996. – V.71. – P.2276-2285.
- 150 Hoj S., Fredholm M., Larsen N.J., Nielsen V.H. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle // *Anim. Genet*. – 1993. - V.24. – P.91-106.
- 151 Lee B.K., Lin G.F., Crooker B.A., Murtaugh M.P., Hansen L.B., Chester-Jones H. Association of somatotropin (bST) gene polymorphism with

- selection for milk yield in Holstein cows // J Dairy Sci. – 1993. - V.76 (1). - P.149-154.
- 152 Lee B.K, Crooker B.A., Hansen L.B., Chester-Jones H. Polymorphism in die third intron of somatropin (bST) gene and its association with selection for milk yield in Holstein cows // J Anim Sci. - 1994. - V.72. - P.316-324.
 - 153 Lagziel A., Soller M. DNA sequence of SSCP haplotypes at the bovine growth hormone (bGH) gene // Animal Genetics. - 1999. - V.30. - P.362-365.
 - 154 Yao J., Aggrey E., Zadworny D., Hayes J., Kuhnlein U. Sequence Variations in the Bovine Growth Hormone Gene Characterized by Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis and Their Association with Milk Production Traits in Holsteins // Genetics. – 1996. – V.144. – P.1809-1816.
 - 155 Furu L.M., Kazmer G.W., Zinn S.A., Rycroft H. Somatotropin MspI and AluI polymorphism relative to indicators of the genetic merit of Holstein sires // J Anim Sci. - 1998. – V.76. – P.75-73.
 - 156 Dubus A., Grzesiak W., Statkowska I. Association between the growth hormone combined genotypes and dairy traits in Polish Black-and-White cows // Animal Science and Reports. 2004. - V.22/ - №2. - P.185-194.
 - 157 Falaki M., Sneyers M., Prandi A., Massart S., Corradini C., Formigoni A., Biuny A., Portetelle D., Renaville R. TaqI growth hormone gene polymorphism and milk production traits in Holstein-Friesian cattle // Arum. Sci. -1996b. - V.63. - P.175-182.
 - 158 Falaki M., Gengler N., Sneyers M., Prandi A., Massart S., Formigoni A., Bumy A., Portetelle D., Renaville R. Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls // J. Dairy Sci. -1996a. - V.79. - P.1446-1453.
 - 159 Hallerman E.M., Nave A., Kashi Y., Holzer Z., Soller M., Beckmann J.S. Restriction fragment length polymorphisms in dairy and beef cattle at the growth hormone and prolactin loci // Anim. Genet. – 1983. - V.18. – P.213-221.
 - 160 Hecht C., Geldermann H. Variants widien die 5'-flanking region and die intron 1 of the bovine growth hormone gene // Anim. Genet. – 1996. – V.27. – P.329-337.
 - 161 Rodrigues C. V., Guimaraes S. E. F., Neto E. D., Pinheiro L. F. L. Identification of a novel polymorphism in the promoter region of the bovine growth hormone gene // Anim. Genet. – 1998. - V.29. - P.65-74.
 - 162 Parsons Y.M., Webb G.C., Bottema C.D. 198. Assignment of the growth hormone receptor gene to band q17 of the homeologous sheep 16 and cattle 20 chromosomes // Mamm. Genome. – 1998. - V.9. –P. 599-600.
 - 163 Skinkytė R., Zwierzchowski L., Riaubaitė L., Baltrėnaitė L., Miceikienė I. Distribution of allele frequencies important to milk production traits in

- lithuanian black & white and lithuanian red cattle // veterinarija ir zootechnika. – 2005. - T. 31 (53). - P.93-97.
- 164 Kopchick J.J., Andry J.M., Growth hormone (GH). GH receptor and signal transduction // Mol. Genet. Metab. – 2000. - V.71. - P.293–314.
 - 165 Godowski P.J., Leung D.W., Meacham L.R., Galgani J.P., Hellmiss R., Keret R., Rotwein P.S., Parks J.S., Laron Z., Wood W.I. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron type dwarfs // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1989. - V.86. – P.8083-8087.
 - 166 Jiang H., Okamura C.S., Lucy M.C. Isolation and characterization of a novel promoter for the bovine growth hormone receptor gene // J.Biol. Chem. – 1999. - V.274. – P.7893-7900.
 - 167 Moffat J.G., Edens A., Talamantes F. Structure and expression of the mouse growth hormone receptor/growth hormone binding protein gene // J. Mol. Endocrinol. – 1999. - V.23. - P. 33-44.
 - 168 Jiang H.L., Lucy M.C. Involvement of hepatocyte nuclear factor-4 in the expression of the growth hormone receptor 1A messenger ribonucleic acid in bovine liver // Mol. Cell. Endocrinol. – 2001 a. - V.15. – P.1023–1034.
 - 169 Cooper D. N. 1992. Regulatory mutations and human disease // Ann Med. – 1992. - V.24. - P.427-437.
 - 170 Blott S., Kim J.J., Moio S., Schmidt-Kuntzel A., Cornet A., Berzi P., Cambisano N., Ford C., Grisart B., Johnson D., Karim L., Simon P., Snell R., Spelman R., Wong J., Vilkkii J., Georges M., Farnir F., Coppieters W. Molecular Dissection of a Quantitative Trait Locus. A phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition // Genetics. – 2003. - V.163. - P.253-266.
 - 171 Edens A., Talamantes F. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts // Endocr. Rev. – 1998. - V.19. - P.559-582.
 - 172 Goodyer C.G., Zogopoulos G., Schwartzbauer G., Zheng H., Hendy G.N., Menon R.K. Organization and evolution of the human growth hormone receptor gene 5'-flanking region // Endocrinology. - 2001. - V.15. – P.1923–1934.
 - 173 Jiang H.L., Lucy M.C., Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency // Gene. – 2001b. - V.265. – P.45–53.
 - 174 Menon R.K., Shaufl A., Yu J.H., Stephan D.A., Friday R.P., Identification and characterization of a novel transcript of the murine growth hormone receptor gene exhibiting development and tissue-specific expression // Mol. Cell. Endocrinol. – 2001. - V.172. - P.135–146.
 - 175 Bazan J.F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1990. - V.87. – P.6934-6941.

- 176 Cosman D., Lyman S., Idzerda R.L., Beckman M.P., Goodwin R.G., March C.J. A new cytokine receptor superfamily // Trends Biochem. Sci. – 1990. - V.15. – P.265-273.
- 177 Kelly P.A., Alic S., Rozakis M., Goujon L., Nagano M., Pellegrini I., Gould D., Dijane J., Edery M., Finidori J., Postel-Vinay M.C. The growth hormone/prolactin receptor family // Recent Prog. Horm. Res. – 1993. - V.48. –P.123-130.
- 178 De Vos A.M., Ultsch M., Kossiakoff A.A. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of die complex // Science. – 1992. - V.255. - P.306-312.
- 179 Argetsinger L.S., Carter-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor // Physiol. Rev. - 1996. - V.76. - P.1089–1107.
- 180 Kelly P.A., Goujon L., Sotiropoulos A., Dinerstein H., Esposito N., Edery M., Finidori J., Postel-Vinay M.C. The GH receptor and signal transduction // Horm. Res. – 1994. - V.42. – P.133-140.
- 181 Hill. D.J., Riley S.C., Bassett N.S., Waters M.J. Localization of die growth hormone receptor identified by immunocytochemistry in second trimester human fetal tissues and in placenta diroughtout gestation // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1992. - V.75. - P.646-671.
- 182 Aggrey S.E., Yao, J., Sabour M.P., Lin C.Y., Zadworny D., Hayes J.F., Kuhnlein U. Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holstein // J. Hered. - 1999. - V.90. – P.148-151.
- 183 Maj A., Oprzadek J., Oprzadek A., Dymnicki E., Zwierzchowski L. Polymorphism in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene and its association with meat production traits in cattle // Anim. Res. – 2004a. - V.53. – P.503-514.
- 184 Maj A., Oprzadek J., Dymnicki E., Zwierzchowski L. Association of the polymorphism in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene with meat production traits in polish black-and-white cattle // Meat Sci. - 2006a. - V.72. – P.539-544.
- 185 Maj A., Zwierzchowski L. Molecular evolution of coding and non-coding sequences of the growth hormone receptor (GHR) gene in the family bovidae // Folia Biol. (Krakow). - 2006b. - V. 54. – P.31-36.
- 186 Maj A., Strzalkowska N., Słoniewski K., Krzyzewski J., Oprzadek J., Zwierzchowski L. Single nucleotide polymorphism SNP) in the 50-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene and its association with dairy production traits in Polish Black-and-White cattle. // Czech Journal of Animal Science. - 2004b). V.49. – P.419–429.
- 187 Ge. W., Davis M.E., Hines H.C, Irvin K.M. Two-allelic DGGE polymorphism detected in the promoter region of the bovine GHR gene // Anim. Genet. - 1999. - V.30. – P.71-84.

- 188 Ge. W., Davis M.E., Hines H.C, Irvin K.M. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle // J. Anim. Sci. - 2003. - V.81. – P.641–648.
- 189 Ge W., Davis M.E., Hines H.C, Irvin K.M. Rapid Communication: Single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene // J. Anim. Sci. - 2000. - V.78. – P.2229–2230.
- 190 Zhou Y., Jiang H. Short Communication: A milk trait-associated polymorphism in the bovine growth hormone receptor gene does not affect receptor signaling // J. Dairy Sci. – 2006. – V.89. – P.1761-1764.
- 191 Fontanesy L., Scotti E., Tazzoli M., Davoli R. Investigation of allele frequencies of the growth hormone receptor (GHR) F279Y mutation in dairy and dual purpose cattle breeds // Ital. J. Anim. Sci. – 2007. - V.6. - P.415-420.
- 192 Khatkar M.S., Thomson P.C., Tammen I., Raadsma H. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis // Genet. Sel. Evol. – 2004. - V.36. –P.163–190.
- 193 Mosig, M. O., Lipkin E., Khutoreskaya G., Tchourzyna E., Soller M. A whole genome scan for quantitative trait loci affecting milk protein percentage in Israeli-Holstein cattle, by means of selective milk DNA pooling in a daughter design, using an adjusted false discovery rate criterion // Genetics. - 2001. – V.157. – P.1683–1698.
- 194 Viitala S., Szyda J., Blott S., Schulmann N., Lidauer M., Mäki-Tanila A., Georges M., Vilkki J.H. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire cattle // Genetics. – 2006. – V.173. – P.2151-2164.
- 195 Rahmatalla S.A., Müller U., Strucken E. M., Reissmann M., Brockmann G. A. The F279Y polymorphism of the GHR gene and its relation to milk production and somatic cell score in German Holstein dairy cattle // Animal genetics. – 2011. - V. 52. – P.459–465
- 196 Komisarek J., Michalak A., Walendowska A. The effects of polymorphisms in DGAT1, GH and GHR genes on reproduction and production traits in Jersey cows // Animal Science Papers and Reports. - 2011 - V.29. – P.29-36.
- 197 Viitala S.M., Schulmann N.F., de Koning D.J., Elo K., Kinoshita R., Virta A., Virta J., Mäki-Tanila A., Vilkki J.H. Quantitative trait loci affecting milk production traits in Finnish Ayrshire dairy cattle // J. Dairy Sci. – 2003. - V.86. – P.1828-1836.
- 198 Shimatsu A., Rotwein P. Sequence of two rat insulin-like growth factor I mRNAs differing within the 5' untranslated region // Nucleic Acids Res. – 1987. - V.15. – P.7196-7205.
- 199 Shemer J., Adamo M. L., Roberts C.T., D. LeRoith. Tissue-specific transcription start site usage in the leader exons of the rat IGF-I gene:

- evidence for differential regulation in the developing kidney // *Endocrinol.* – 1992. – V.13. – P.2793-2807.
- 200 Simmons J.G., Van Wyk J.J., Hoyt E.C., Lund P.K. Multiple transcription start sites in the rat insulin-like growth factor-I gene give rise to IGF-I mRNAs that encode different IGF-I precursors and are processed differently in vitro // *Growth Factors.* – 1993. – V.9. – P.205-211.
 - 201 Adamo M.L., Ben-Hur H., Roberts C.T., LeRoith D. Regulation of start site usage in the two leader exons of the rat insulin-like growth factor 1 gene by development, fasting and diabetes // *Mol. Endocrinol.* – 1991. – V.5. – P.1677-1685.
 - 202 Foyi H.L., Lanau F., Woloschak M., Roberts C.T. 1992. Effects of growth hormone on levels of differentially processed insulin-like growth factor 1 mRNAs in total and polysomal mRNA populations // *Mol. Endocrinol.* – 1992. – V.6. – P.1881-1887.
 - 203 Bishop M.D., Simmen R.C.M., Simmen F.A., Davis M.E. The relationship of insulin-like growth factor 1 with postweaning performance in Angus beef cattle // *J. Anim. Sci.* – 1989. – V.67. – P.2872-2879.
 - 204 Davis M.E., Bishop M.D., Park N.H., Simmen R.C.M. Divergent selection for blood serum insulin-like growth factor I concentration in beef cattle: I. Nongenetic effects // *J. Anim. Sci.* – 1995. – V.73. – P.1927-1934.
 - 205 Park N.H. Evaluation of Serum Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) as a Physiological Predictor of Genetic Merit in Beef Cattle: Repeatability, Heritability and Relationship with Performance Traits. Ph.D. Dissertation // The Ohio State University, Columbus. – 1993. – 110 p.
 - 206 Glimm D.R., Baracos V.E., Kennelly J.J. Northern and in situ hybridization analyses of the effects of somatotropin on bovine mammary gene expression // *J. Dairy Sci.* – 1992. – V.75. – P.2687-2705.
 - 207 Ronge H., Blum J. W., Clement C., Jans F., Leuenberger H., Binder H. Somatomedin C in dairy cows related to energy and protein supply and to milk production // *Anim. Prod.* – 1988. – V.47. – P.165-183.
 - 208 Sharma B. K., Vandehaar M. J., Ames N. K. Expression of insulin-like growth factor-I in cows at different stages of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin // *J. Dairy Sci.* – 1994. – V.77. – P.2232-2241.
 - 209 Werner H., Adamo M., Roberts C.T., LeRoith D. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action // *Vitamins and hormones.* – 1994. – V.48. – P.1-58.
 - 210 Tseng L.Y.H., Schwartz G.P., Seikh M., Chen Z.Z., Joshi S., Wang J.F., Nissley S.P. Hybrid molecules containing the A domain of insulin-like growth factor-1 and the B chain of insulin have increased mitogenic activity relative to insulin. *Biochem Biophys. Res. Commun.* – 1987. – V.149. – P.672-680.

- 211 Zumetsein P., Stiles D. Molecular cloning of gene sequences that are regulated by insulin-like growth factor I. // J. Biol. Chem. – 1987. – V.262. – P.11252-11260.
- 212 Canalis E. Effect of insulin-like growth factor 1 on DNA and protein syndiesis in cultured rat cavaria // J. Clin, hivest. – 1980. - V.66. – P.709-715.
- 213 Florini J.R., D'Ercole J., Clemmous D.R., Van Wyk J.J. Paracrine functions of somatomedins // J. Clin. Endocrinol. Metab. -1986. - V.15. – P.59-65.
- 214 Merriman H. L., La Tour D., Linkhart T. A., Mohan S. D., Baylink J., Stiong D. D. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II induce c-fos in mouse osteoblastic cells // Calci. Tissue Int. – 1990. - V. 46. - P.258-265.
- 215 Meul C, Froesch E. R. Insulin and no suppressible insulin-like activity (NSILA-S) stimulate die same glucose transport system via two separate receptors in rat heart // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1977. - V. 75. - P.689-695.
- 216 Florini J.R., Ewton D.Z., Magri K.A., Mangiacapra F.J. IGFs and muscle differentiation. In "Current Directions in Insulin-like Growth Factor Research". // D. LeRoidi and M.K. Raizada (ed) Plenum Press, New York. - 1994. - P.319-326.
- 217 Leof E.B., Wherton W., van Wyk J.J., Pledger W.J. Epidermal growth factor (EGF) and somatomedin C regulates G1 progression in competent BALBC/3T3 cells // Exp. Cell Res. – 1982. - V.141. – P.107-111.
- 218 Sadler S. E., Mailer J. L. In vivo regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in Xenopus oocytes: stimulation by insulin and insulin-like growth factor 1 // J. Biol. Chem. – 1987. - V.262. – P.10644-10655.
- 219 Mohan. S., D. J. Baylink. Characterization of the IGF regulatory system in bone, hi "Current Directions in Insulin-Like Growth Factor Research" // D. LeRoidi and M. K. Raizada (ed). Plenum Press. New York. - 1994. - P.397-406.
- 220 Hirschberg R. The physiology and padiology of IGF-I in die kidney. In "Current Directions in hisulin-Like Growth Factor Research" // D. LeRoidi and MK Raizada (ed). Plenum Press, New York. - 1994. – P.345-366.
- 221 Raizada M. K., LeRoidi D. The Role of Insulin-Like Growdi Factors in die Nervous System // Annals New York Acad. Sci. – 1993. - V. 692. – P.49–56.
- 222 Adams L.J., Madox J.F. A dinucleotide repeat polymorphism in die ovine insulin-like growth factor-I gene 5' flanking region // Anim. Genet. - 1994. - V.25. – P.61-70.
- 223 Kirkpatrick B.W. Identification of a conserved microsatellite site in the porcine and bovine insulin-like growth factor-I gene 5' flank // Animal Genetics. – 1992. – V.23. - P.543-548.

- 224 Moody D.E., Pomp D., Newman S., MacNeil M.D. Characterization of DNA polymorphisms and their associations with growth and maternal traits in line 1 Hereford cattle // Proc. 5th World Congress Genet. Appl. Livest. Prod. – 1994. - V.21. - P.221-230.
- 225 Shen W.H., Wisniewski P., Ahmed L., Boyle D.W., Denne S.C., Liechty E.A. Protein anabolic effects of insulin and IGF-I in the ovine fetus. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2003. – V.284. –P.748-756.
- 226 Ge W., Davis M.E., Hines H.C Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF I gene // Anim. Genet. -1997. - V.28. – P.155-162.
- 227 Zych S., Szewczyk M., Czerniawska-Piątkowska E., Szatkowska I. A new ACRS-SNP in the 5' flanking region of the bovine insulin-like growth factor 1 (IGF1) gene (Brief report) // Arch. Tierz., Dummerstorf. – 2007. – V.50. – P.531-532.
- 228 Ge W., Davis M.E., Hines H.C., Irvin K.M., Simmen R.C.M. Association of genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle // Journal of Animals Science. - 2001. - V.79. – P.1757-1762.
- 229 Hines H.C., Ge W., Zhao Q., Davis M.E. Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor I loci with lactation traits in Holsteins // Animal Genetics. – 1998. – V.29. – P.69-74.
- 230 Lien S., Karlsen A., Klemetsdal G., Vage D.I., Olsaker I., Klungland H., Aasland M., Heringstad B., Ruane J., Gomez-Raya L. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting twinning rate // Mammalian Genome. – 2000. - V.11. - P.877–882.
- 231 Rupprechter G., Carriquiry M., Ramos J.M., Pereira I., Meikle A. Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotrophic axis genes. // Acta Veterinaria Scandinavica. - 2011. –V.53. – P.35–44.
- 232 Siadkowska E., Zwierzchowski L., Oprządek J., Strzalkowska N., Bagnicka E., Krzyżewski E. Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle // Animal Science Papers and Reports. - 2006. - V.24. – P.225-237.
- 233 Ge W., Davis M.E., Hines H.C. A genetic marker associated with blood serum insulin like growth factor-I (IGF-I) concentration and growth traits in Angus cattle // J. Anim. Sci. - 1997. - V.75. – P.32-40.
- 234 Kim S.-W., Lajara R., Rotwein P. Structure and function of a human insulin-like growth factor I gene promoter // Mol. Endocrinol. - 1991. - V.5. – P.1964-1970.
- 235 Li C., Basarab J., Snelling W.M., Benkel B., Murdock B., Hansen C., Moore SS. Assessment of positional candidate genes myf5 and IGF1 for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of Bos taurus // Animal Science. – 2001. - V.82(1). – P.1-7.

- 236 Mehmannaavaz Y., Amirinia C., Bonyadi M., Vaez Torshizi R. Association of IGF-1 gene polymorphism with milk production traits and paternal genetic trends in Iranian Holstein bulls // *African Journal of Microbiology Research*. – 2010. - V.4. - P.110–114.
- 237 Mullen M.P., Lynch C.O., Waters S.M., Howard D.J., Boyle P.O., Kenny D.A., Buckley F., Horan B., Diskin M.G. Single nucleotide polymorphism in the growth hormone and insulin-like growth factor-I genes are associated with milk production, body condition score and fertility traits in dairy cows // *Genetics and Molecular Research*. - 2011. –V.10. – P.1819-1830.
- 238 Szewczuk M., Bajurna M., Zych S., Kruszyński W. Association of insulin-like growth factor I gene polymorphisms (IGF1/TasI and IGF1/SnaBI) with the growth and subsequent milk yield of Polish Holstein-Friesian heifers // *Czech Journal of Animal Science*. – 2013. - V.58. – P.401-411.
- 239 Reyna X.F.D., Montoya H.M., Castrellón V.V., Rincón A.M.S., Bracamonte M.P., Vera W.A. Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle // *Genetics and Molecular Research*. – 2010. - V.9(2). - P.875-883.
- 240 Curi R.A., Oliveira H.N.D., Silveira A.C., Lopes C.R. Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. // *Livestock Science*. – 2005. – V.94. - P.159-167.
- 241 Othman E., Mohamed F., Nadia A., Karima M. Genetic Characterization of Insulin Growth Factor-1 and Its Receptor Genes in Egyptian Buffalo (*Bubalus bubalis* L.) // *British Biotechnology Journal*. – 2013. - V.3 (4). – P.592-604.
- 242 Wang Y., Price S.E., Jiang H. Cloning and characterization of the bovine class 1 and class 2 insulin-like growth factor-I mRNAs // *Domest. Anim. Endocrin.* – 2003. –V.25. – P.315-328.
- 243 Покровский В.В., Федоров Н.А., Шипулин Г.А., Безруков В.М. «Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения» – Утверждены Государственным комитетом санэпиднадзора Российской Федерации 22 июня 1995г.
- 244 Ахметов Т.М., Тюлькин С.В., Нургалиев Ф.М. Оптимизация выделения ДНК из крови и спермы // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана*. - 2011. – Т.205. – С.18-23.
- 245 Северин Е.С. Биохимия: Учеб. для вузов. - ГЭОТАР Медиа, 2003. - 779 с.
- 246 http://ru.rfwiki.org/wiki/Полимеразная_цепная_реакция
- 247 Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР "в реальном времени". - М: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. - 223 с.

- 248 Kim J.H. Associations between molecular markers and cattle production traits (Ph.D. Thesis) – South Dakota State. – 1998. – 219 P.
- 249 Keady S.M., Kenny D.A., Keane M., Waters S.M. Effect of sire breed and genetic merit for carcass weight on the transcriptional regulation of the somatotrophic axis in longissimus dorsi of crossbred steers // Journal of Animal Science. - 2011. - V.89. –P.4007-4016
- 250 Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – Москва: «МедиаСфера», 2002. – 312 с.
- 251 Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов. - Минск: БГУ, 1961. – 220 с.
- 252 Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. - М.: Мир, 1988. - 335с.
- 253 Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных. – Минск: Институт подготовки научных кадров Нац. акад. наук Беларуси, 2008. – 160 с.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

bCSN3 – ген каппа-казеина;
α-LA – ген альфа-лактальбумина;
βLG - ген β-лактоглобулина;
bPRL - ген пролактина;
bTG - ген тиреоглобулина;
bDGAT - ген диацилглицерол О-ацилтрансферазы;
bLep - ген лептина;
Pit-1 – гипофизарный фактор транскрипции
bPit-1 – ген гипофизарного фактора транскрипции;
GH (ГР) – гормон роста;
bGH – ген гормон роста;
GH R (ГРР) - Рецептор гормона роста;
IGF-1 (ИФР-1) - инсулиноподобный фактор роста-1;
bIGF-1 – ген инсулиноподобного фактора роста-1;
ПЦР - полимеразная цепная реакция;
ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов;
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;
РНК - рибонуклеиновая кислота;
мРНК - матричная РНК;
КРС – крупный рогатый скот;
ЛПХ - личное подсобное хозяйство;
СХТП - сельхозтоваропроизводители;
QTL (Quantitative Trait Loci), локусы количественных признаков;
MAS (Marker Assisted Selection) - "маркер-зависимая селекция";
ОПМ – отбор с помощью маркеров;
SNP - Single Nucleotide Polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм;
А – аденин;
Т – тимин;
С – цитозин;
G - гуанин;
сМ - сантиморган;
т.п.о. – тысяча пар оснований;
Д - дальтон;
кД - килодальтон;
п.о. – пар оснований;
IMF (intramuscular fat) - сумма внутриклеточных, межклеточных и межволоконных жировых компонентов;
bp (base pair) - пар оснований;
а.о. – аминокислотный остаток;
POU-домен - высококонсервативный элемент семейства ДНК-взаимодействующих регуляторных белков, связывающийся с

октамерным мотивом АТГЦАААТ, обнаруженным в составе промоторов и энхансеров многих эукариотических генов;

TSH- β – β -субъединица тиреоид-стимулирующего гормона;

et al. (et alii) - и другие (в библиографии "с соавторами");

in vitro — это технология выполнения экспериментов, когда опыты проводятся «в пробирке» — вне живого организма;

in vivo - «внутри живого организма» или «внутри клетки»;

мкл - микролитр;

dNTP - дезокситрифосфаты;

MgCl₂ – хлорид магния

кб – килобит.