

Н. В. Дементьева, О. В. Митрофанова, Е. С. Федорова, М. В., Позовникова, А. И. Азовцева

Взаимосвязь полиморфных вариантов в промоторе гена *PRL* эмбрионов и характеристик яйца для биопромышленности

Аннотация. Развивающиеся эмбрионы кур (РЭК) используются при культивировании и выделении вирусов в программах по производству вакцин. На титр культивируемого вируса влияет выход экстраэмбриональной жидкости (ВЭЭЖ). Актуальными являются исследования, направленные на выявление генетического полиморфизма в генах, напрямую связанных с формированием эмбриона кур. Одним из перспективных генов-кандидатов можно рассматривать ген пролактина. Проведено генотипирование 420 эмбрионов кур русской белой породы на наличие *indel*-полиморфизма (инсерции в 24 п.н.) в положении 358 промоторной области пролактина. Выявлены 3 генотипа по локусу пролактина: *Del/Del* — гомозиготы по делеции (0,062); *In/Del* — гетерозиготы (0,400); *In/In* — гомозиготы по инсерции (0,538). Обнаружены достоверные отличия между генотипами по массе эмбриона и показателю усушки инкубируемых яиц ($p < 0,01$). Носители генотипа *Del/Del* отличались более высокими показателями массы эмбриона при этом показатели усушки были минимальными. Генотип *In/In* характеризовался наименьшими показателями по массе эмбриона. Эмбрионы с генотипами *Del/Del* находились в яйцах, которые обладали пониженной усушкой в сравнении с особями *In/In* ($p < 0,01$), что указывает на их преимущественную пригодность для получения более высокого выхода амниотической жидкости.

Ключевые слова: русская белая порода, куриный эмбрион, экстраэмбриональная жидкость, полиморфизм, ген *PRL*.

Авторы:

Наталья Викторовна Дементьева — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики; e-mail: dementevan@mail.ru;

Ольга Викторовна Митрофанова — кандидат биологических наук; e-mail: mo1969@mail.ru;

Елена Сергеевна Федорова — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц; e-mail: osot2005@ya.ru;

Марина Владимировна Позовникова — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики; e-mail: pozovnikova@gmail.com;

Анастасия Ивановна Азовцева — студент-практикант; e-mail: ase4ica15@mail.ru.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал ФГБНУ «ФНЦ животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», 196601, Россия, Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское шоссе, 55а.

Введение. Развивающиеся эмбрионы кур (РЭК) являются оптимальной моделью при выделении и культивировании вирусов в программах по производству вакцин. Так как титр вируса напрямую зависит от выхода экстраэмбриональной жидкости (ВЭЭЖ), необходимы селекционные решения, направленных на получение яиц, обладающих оптимальными характеристиками для производства биологических препаратов.

Биоресурсная коллекция ВНИИГРЖ («Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур») является уникальным генофондным предприятием, которое сохраняет 40 пород и популяций кур. Фенотипическое разнообразие, высокая адаптационная способность и генетические особен-

ности позволяют рассматривать генофондных кур как исключительный объект для проведения различных исследований и интродукции полученных результатов в практические программы селекции [1]. Одной из наиболее перспективных пород для получения яиц с высоким ВЭЭЖ является русская белая порода кур. Порода была получена в 1953 году путём скрещивания местных кур с петухами породы белый леггорн с последующим разведением «в себе». Популяция русских белых кур разводится во ВНИИГРЖ с использованием индивидуального отбора и подбора. Характерной особенностью данной популяции является белый цвет пуха у суточных цыплят, а также устойчивость их к низким температурам. Селекция этой птицы проводилась

на повышенную устойчивость к лейкозу, болезни Марека и карциномам внутренних органов. На основе этой популяции создается специализированная линия кур для производства вакцин в биопромышленности [2, 3].

В вопросах изучения экстраэмбриональной жидкости куриных эмбрионов большое внимание уделяется ее физико-химическим свойствам [4], анализу белковых компонентов [5] и иммунологическим особенностям [6]. Современные достижения молекулярной генетики позволяют на уровне генома определять полиморфные участки ДНК, которые можно рассматривать в качестве генов-кандидатов хозяйственно-ценных признаков сельскохозяйственных животных и птиц. К одним из наиболее перспективных генов, аллельные варианты которых связаны с продуктивными качествами птицы, относятся пролактин. У птиц ген PRL картирован на 2 хромосоме и структурно состоит из 4 интронов и 5 экзонов [7]. На сегодняшний день известно о его значимом влиянии на яйценоскость и проявление инстинкта насиживания яиц [8, 9]. Секвенирование промоторной области гена пролактина позволило выявить вставку (insertion) размером 24 п.н. в промежутке от 377 до 354 нуклеотида (GenBank AB011438). В работах различных авторов, было обнаружено, что присутствие вставки размером 24 п.н. в промоторной области гена птичьего пролактина (-358 PRL, Chr2) положительно коррелирует с интенсивностью яйцекладки у птиц и отрицательно с инстинктом насиживания [10]. В результате было обнаружено, что особи с гетерозиготным генотипом In/Del имеют самый высокий процент выводимости и самый высокий уровень мРНК пролактина. Это позволяет предположить, что данный полиморфный локус связан с характеристиками выводимости у кур через модуляции гена пролактина на транскрипционном уровне. Так же проводились исследования с целью выявления связи между этой мутацией и яйценоскостью. Значительная связь ($p < 0,05$) была обнаружена между локусом In/Del и яйценоскостью [11].

Целью нашей работы было поиск ассоциации In/Del — полиморфизма в гене PRL эмбрионов кур русской белой породы и характеристик яйца повышающих эффективность их использования для производства вакцин в биопромышленности.

Материалы и методы. Материалом исследования была ДНК, полученная из печени 12,5-суточных эмбрионов Gallus gallus породы русская белая ($n=420$), содержащихся в биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (г. Санкт-Петербург — Пушкин). Учитывались показатели яйценоскости кур-матерей: масса яйца (г) при снесении, масса

яйца (г) на 12,5 сутки инкубации, а также фенотипические признаки эмбрионов: усушка (%), выход экстраэмбриональной жидкости (мл), масса эмбриона (г).

Взвешивание яйца и эмбрионов проводили на весах марки «Госметр» с точностью до 0,1 г. Объем выхода экстраэмбриональной жидкости измеряли с помощью мерного цилиндра (точность 0,1 мл). Процент усушки рассчитывали по формуле: (Масса снесенного яйца — Масса яйца на 12,5 суток инкубации) / Масса снесенного яйца * 100%

ДНК выделяли по стандартной методике фенольным методом с использованием протеиназы К («Сибэнзим», Россия), применяя для растворения TE-буфер. Концентрацию и степень чистоты образцов определяли с помощью прибора NanoDrop 2000.

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Thermal Cycler T1000 (Bio-Rad, США) по следующей схеме: первоначальная денатурация — 5 мин при 95°C, затем 40 циклов, включающих в себя следующие этапы: денатурация в течение 30 с при 95°C, отжиг праймеров — 30 с при температуре 60°C, синтез цепи ДНК 30 с при 72°C. Окончательная достройка проходила 5 мин при 95°C. Для выявления In/Del-полиморфизма в гене PRL использовали следующие праймеры: прямой — 5'-gggtgggtgaagagacaagga-3', обратный — 5'-tgctgagtatggctggatgt-3'. Продукты амплификации разделяли в 2% агарозном геле. В случае инсерции амплифицировался фрагмент размером 154 п.н., при отсутствии — 130 п.н. (размер вставки-делеции 24 п.н.).

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программ AtteStat и Microsoft Office Excel 2010. На основании полученных данных были рассчитаны частоты генотипов и аллелей, отклонение ее от равновесия Харди-Вайнберга с применением критерия χ^2 . Для анализа данных по фенотипическим признакам рассчитывали среднее значение признаков (M), среднеквадратическую ошибку ($\pm m$) и уровень статистических различий (p). Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждения. Анализ частот генотипов и аллелей In/Del-полиморфизма в гене PRL у эмбрионов русских белых кур проводили, основываясь на данных электрофореграмм (табл. 1). Определен высокий уровень In/In гомозиготности (53,8%) и частота аллеля In (73,8%). По данным Крутиковой А. А. (2017) варианты мутации In/Del в гене PRL обусловлены селекционным давлением при узконаправленном отборе по конкретным показателям продуктивности. Куры русской белой породы относятся к специализирован-

ной породе яичного направления, для которой характерны высокая яйценоскость и практически отсутствующий инстинкт насиживания, что многие исследователи, как было сказано ранее, связывают как раз с действием инсерции в промоторе гена PRL.

Согласно закону распределения Харди-Вайнберга, в исследуемой выборке эмбрионов русских белых кур не наблюдается значимого отклонения фактического распределения частот генотипов от теоретически ожидаемого ($H_e=0,386$, $\chi^2=0,381$).

Следующим этапом исследования был сравнительный анализ показателей яйценоскости кур-матерей и фенотипических признаков у эмбрионов кур русской белой породы по мутации In/Del в гене PRL (табл. 2). Эмбрионы, гомозиготные по

мутации Del, отличались высокой массой и имели меньший процент усушки яйца в сравнении с эмбрионами гомозиготными по мутации In ($p \leq 0,01$). В программах производства вакцин приоритетным является объем ВЭЭЖ на 12,5 сутки инкубации, а также размер эмбриона. Сохранность ВЭЭЖ позволяет получить максимальный титр вируса и тем самым снизить себестоимость вакцины. Масса эмбриона не менее важна, так как, например, при производстве вакцины против бурсальной болезни птиц используется гомогенат тушек куриных эмбрионов [13].

Как известно эффективность отбора при проведении селекции в значительной степени определяется корреляционной связью между признаками (табл. 3). Можно отметить, что, как в целом по всей

Таблица 1. Частоты аллелей и генотипов In/Del-полиморфизма в гене PRL у эмбрионов русских белых кур

Частота генотипов			Частота аллелей	
Del/Del (n=26)	In/Del (n=168)	In/In (n=226)	In	Del
0,062	0,400	0,538	0,738	0,262

Таблица 2. Показатели яйценоскости кур-матерей и фенотипических признаков у эмбрионов русской белой породы

Показатель	M±m		
	Del/Del(n=26)	In/Del(n=168)	In/In(n=226)
Яйценоскость на 330 день жизни, шт	157,81±4,03	161,24±1,68	161,0±1,30
Масса яйца при снесении на 300 день жизни, г	59,56±0,94	58,6±0,36	58,64±0,35
Масса яйца через 12,5 суток инкубации, г	55,43±0,83	54,28±0,36	54,32±0,34
Усушка, %	7,01±0,17c	7,47±0,13	7,47±0,09d
Масса эмбриона, г	5,79±0,03a	5,71±0,05	5,69±0,03b
Объем ВЭЭЖ, мл	12,12±0,38	11,61±0,16	11,78±0,13

Уровень достоверности различий между группами ^{a,b,c,d} $p < 0,01$

Таблица 3. Взаимосвязь между показателями яйценоскости кур-матерей и фенотипическими признаками у эмбрионов русской белой породы кур

Взаимосвязь	Коэффициент корреляции, r			
	По всей выборке	Del/Del (n=26)	In/Del (n=168)	In/In (n=226)
Масса яйца (г) при снесении — яйценоскость	-0,301*	-0,293*	-0,278*	-0,321*
Масса яйца (г) при снесении — усушка (%)	-0,183*	0,189	-0,210*	-0,192*
Масса яйца (г) при снесении — масса эмбриона (г)	0,163*	0,053	0,318*	0,068
Масса яйца (г) при снесении — объем ВЭЭЖ, (мл)	0,595*	0,479*	0,551*	0,628*
Масса яйца на 12,5 сутки инкубации — объем ВЭЭЖ (мл)	0,637*	0,543*	0,608*	0,657*
Масса яйца (г) на 12,5 сутки инкубации — масса эмбриона (г)	0,171*	0,085	0,306*	0,088
Масса яйца (г) на 12,5 сутки инкубации — усушка (%)	-0,332*	0,089	-0,389*	-0,327*
Объем ВЭЭЖ (мл) — усушка %	-0,323	0,093	-0,381	-0,309
Объем ВЭЭЖ (мл) — масса эмбриона (г)	0,186	0,105	0,253	0,145

Примечание: * $p \leq 0,05$

анализируемой выборке, так и группах с генотипами In/Del и In/In наблюдается положительная связь между показателями массой яйца и массой эмбриона и выходом ВЭЭЖ и отрицательная связь с процентом усушки. В группе с генотипом Del/Del значимые положительные корреляции получены только по массе яйца и выходу ВЭЭЖ.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что русская белая порода кур является перспективной для создания популяций птиц, яйцо которых обладает оптимальными характеристиками для целей биопромышленности, что подтверждают и данные других исследователей [14].

Выводы. Как показывают результаты, яйцо, получаемое от кур русской белой породы, можно рассматривать как оптимальный объект для получения вирусных вакцин. Эмбрионы с генотипом Del/Del имели высокую живую массу, а также яйца отличались меньшим процентом усушки в сравнении с другими анализируемыми группами. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования мутации In/Del в гене пролактина в рамках маркер-сопутствующей селекции для получения яиц с более крупным эмбрионом и низким процентом усушки ВЭЭЖ.

*Настоящая работа была выполнена в рамках выполнения государственного задания
ААА-А18-118021590132-9. № темы: 0445-2019-0026*

Литература

1. Станишевская О. И. Организационные аспекты сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных животных: мировой опыт / О. И. Станишевская, С. В. Черепанов, Ю. Л. Силукова // Генетика и разведение животных. — 2017. — № 3. — С. 3–11
2. Лапа М. А. Влияние генотипа матерей, отцов и возраста развивающихся эмбрионов кур на объем и качество аллантоисно-амниотической жидкости / М. А. Лапа // Генетика и разведение животных. — 2015. — № 1. — С. 14–20.
3. Дементьева Н. В. Изучение структуры генофондной популяции русской белой породы кур методом геномного snp-сканирования / Н. В. Дементьева, М. Н. Романов, А. А. Кудинов, О. В. Митрофанова, О. И. Станишевская, В. П. Терлецкий, Е. С. Федорова, Е. В. Никиткина, К. В. Племяшов // Сельскохозяйственная биология. — 2017. — Т. 52. — № 6. — С. 1166–1174
4. Omede A. A. Physico-chemical properties of late-incubation egg amniotic fluid and a potential in ovo feed supplement / A. A. Omede, M. M. Bhuiyan, A. F. Islam, P. A. Iji // Asian-Australasian Journal Animal Sciences. — 2017. — Vol. 30. — № 8. — P. 1124–1134.
5. Da Silva M. The unique features of proteins depicting the chicken amniotic fluid / M. Da Silva, C. Dombre, A. Brionne, P. Monget, M. Chessé, M. De Pauw, M. Mills, L. Combes-Soia, V. Labas, N. Guyot, Y. Nys, S. Réhault-Godbert // Molecular & Cellular Proteomics. — 2019. — Vol. 15. — № 18. — P. 174–190.
6. Hinckea M. T. Dynamics of Structural Barriers and Innate Immune Components during Incubation of the Avian Egg: Critical Interplay between Autonomous Embryonic Development and Maternal Anticipation / M. T. Hinckea, M. Da Silvad, N. Guyotd, J. Gautrond, M. D. McKee, R. Guabiraba-Britof, S. Réhault-Godbertd // Journal of Innate Immunity. — 2019. — Vol. 11. — № 2. — P. 111–124.
7. Miao Y.-W. Mapping of the prolactin gene to chicken chromosome / Y.-W. Miao, D. W. Burt, I. R. Paton, P. J. Sharp, I. C. Dunn // Animal Genetics. — 1999. — Vol. 30. — P. 470–473.
8. Shimada K. I. H. Expression of prolactin gene in incubating hens / K. I. H. Shimada, K. Sato, H. Seo, N. Matsui // Reprod.Fertil. — 1991. — № 2. — P. 147–154.
9. Dunn I. C. Genetic mapping of the chicken prolactin receptor gene: a candidate gene for the control of broodiness / I. C. Dunn, G. McEwan, T. Ohkubo, P. J. Sharp // British Poultry Science. — 1998. — № 39. — P. 23–24.
10. Kulibaba R. A. Prolactin and growth hormone gene polymorphisms in chicken lines of ukrainian selection / R. A. Kulibaba, A. P. Podstreshnyi // Cytology and Genetics. — 2012. — № 46. — P. 390–395.
11. Cui J. X. Association of Polymorphisms in the Promoter Region of Chicken Prolactin with Egg Production / J. X. Cui, H. L. Du, Y. Liang, X. M. Deng, N. Li, X. Q. Zhang // Poultry Science. — 2006. — № 85. — P. 26–31.
12. Крутикова А. А. Полиморфизм генов миостатина *mstn*, пролактина *prl* и рецептора d2 дофамина *drd2* у кур разного направления продуктивности. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Санкт-Петербург — 2017, С. 124.

13. Алиева А. К. Разработка инактивированной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / А. К. Алиева, О. И. Киселев, М. Г. Алиев, Г. Р. Юсупова // Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана. — 2011. — № 3. — С. 20–28.
14. Лапа М. А. Влияние различных факторов на объем аллантоисно-амниотической жидкости РЭК / М. А. Лапа // Известия СПбГАУ. — 2014. — № 37. — С. 65–68.

Dementeva N., Mitrofanova O., Fedorova E., Pozovnikova M., Azovceva A.

Interrelation of polymorphic variants in the promoter of the *PRL* gene of embryos and egg characteristics for biotechnology

Abstract. *Developing chicken embryos (RECs) are used in the cultivation and isolation of viruses in vaccine production programs. The titer of the cultured virus directly depends on the yield of extraembryonic fluid (YEF). Relevant are studies aimed at identifying genetic polymorphism in genes directly related to the formation of chicken embryos. One of the promising candidate genes can be considered the prolactin gene. 420 Russian white breed chicken embryos were genotyped for indel polymorphism (insertion at 24 bp) at position 358 of the prolactin promoter region. 3 genotypes were identified for the prolactin locus: Del / Del – homozygotes for deletion (0.062); In / Del – heterozygotes (0.400); In / In – insertion homozygotes (0.538). Significant differences were found between the genotypes in terms of embryo mass and the incubation rate of incubated eggs ($p < 0.01$). Carriers of the Del / Del genotype were distinguished by higher embryo mass and lowest shrinkage rates. The In / In genotype was characterized by the smallest indicators on the weight of the embryo. Embryos of the Del / Del genotype had reduced shrinkage in comparison with In / In individuals ($p < 0.01$), which indicates their advantageous suitability for obtaining a higher yield of amniotic fluid.*

Key words: Russian white breed, chicken embryo, yield of extraembryonic fluid, polymorphism, PRL gene.

Authors:

Dementeva N. — PhD (Biol. Sci.), leading researcher, laboratory of molecular genetics; e-mail: dementevan@mail.ru;

Mitrofanova O. — PhD (Biol. Sci.); e-mail: mo1969@mail.ru;

Fedorova E. — PhD (Biol. Sci.), senior researcher of department of genetics, breeding and conservation of genetic resources of agricultural birds; e-mail: osot2005@ya.ru;

Pozovnikova M. — PhD (Biol. Sci.), senior researcher, laboratory of molecular genetics, e-mail: pozovnikova@gmail.com;

Azovceva A. — student, e-mail: ase4ica15@mail.ru.

Russian research institute of farm animal genetics and breeding — branch of the L.K. Ernst Federal science center for animal husbandry; Russia, St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601.

References

1. Stanishvskaya O. I. Organizational aspects of the conservation of genetic resources of farm animals: world experience / O. I. Stanishvskaya, S. V. Cherepanov, Yu. L. Silyukova // Genetics and animal breeding. — 2017. — № 3. — P. 3–11.
2. Lapa M. A. Influence of the genotype of mothers, fathers and the age of developing chicken embryos on the volume and quality of allantoic-amniotic fluid / M. A. Lapa // Genetics and animal breeding. — 2015. — № 1. — P. 14–20.

3. Dementieva N. V. Study of the structure of the gene pool of the Russian white breed of chickens by the method of genomic SNP-scanning / N. V. Dementieva, M. N. Romanov, A. A. Kudinov, O. V. Mitrofanova, O. I. Stanishevskaya, V. P. Terletsky, E. S. Fedorova, E. V. Nikitkina, K. V. Plemiyashov // *Agricultural Biology*. — 2017. — V. 52. — № 6. — P. 1166–1174.
4. Omede A. A. Physico-chemical properties of late-incubation egg amniotic fluid and a potential in ovo feed supplement / A. A. Omede, M.M. Bhuiyan, A.F. Islam, P. A. Iji // *Asian-Australasian Journal Animal Sciences*. — 2017. — Vol. 30. — №8. — P. 1124–1134
5. Da Silva M. The unique features of proteins depicting the chicken amniotic fluid / M. Da Silva, C. Dombre, A. Brionne, P. Monget, M. Chessé, M. De Pauw, M. Mills, L. Combes-Soia, V. Labas, N. Guyot, Y. Nys, S. Réhault-Godbert // *Molecular & Cellular Proteomics*. — 2019. — Vol. 15. — № 18. — P. 174–190.
6. Hinckea M. T. Dynamics of Structural Barriers and Innate Immune Components during Incubation of the Avian Egg: Critical Interplay between Autonomous Embryonic Development and Maternal Anticipation / M. T. Hinckea, M. Da Silvad, N. Guyotd, J. Gautrond, M. D. McKee, R. Guabiraba-Britof, S. Réhault-Godbertd // *Journal of Innate Immunity*. — 2019. — Vol. 11. — № 2. — P. 111–124.
7. Miao Y.-W. Mapping of the prolactin gene to chicken chromosome / Y.-W. Miao, D. W. Burt, I. R. Paton, P. J. Sharp, I. C. Dunn // *Animal Genetics*. — 1999. — Vol. 30. — P. 470–473.
8. Shimada K. I. H. Expression of prolactin gene in incubating hens / K. I. H. Shimada, K. Sato, H. Seo, N. Matsui // *Reprod.Fertil.* — 1991. — № 2. — P.147–154.
9. Dunn I. C. Genetic mapping of the chicken prolactin receptor gene: a candidate gene for the control of broodiness / I. C. Dunn, G. McEwan, T. Ohkubo, P.J. Sharp // *British Poultry Science*. — 1998. — № 39. — P. 23–24.
10. Kulibaba R. A. Prolactin and growth hormone gene polymorphisms in chicken lines of ukrainian selection / R. A Kulibaba, A. P Podstreshnyi // *Cytology and Genetics*. — 2012. — № 46. — P. 390–395.
11. Cui J. X. Association of Polymorphisms in the Promoter Region of Chicken Prolactin with Egg Production / J. X. Cui, H. L. Du, Y. Liang, X. M. Deng, N. Li, X. Q. Zhang // *Poultry Science*. — 2006. — № 85. — P. 26–31.
12. Krutikova A. A. Gene polymorphism of the *mstn* myostatin, prolactin *prl*, and dopamine dd2 receptor *dd2 drd2* genes in chickens of different directions of productivity. The dissertation for the degree of candidate of biological sciences, St. Petersburg. — 2017, P. 124.
13. Aliev A. K. Development of an inactivated vaccine against infectious bursal disease / A. K. Aliev, O. I. Kiselev, M. G. Aliev, G. R. Yusupova // *Uchenye zapiski KGAVM im. N. E. Bauman*. — 2011. — № 3. — P. 20–28.
14. Lapa M. A. Influence of various factors on the volume of allantoic-amniotic fluid REC / M. A. Lapa // *Proceedings of St. Petersburg State University of Economics*. — 2014. — № 37. — P. 65–68.