УДК 575.174.015.3+636.034

ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ОДНОНУКЛЕОТИДНОЙ ЗАМЕНЫ RS41256848 В ГЕНЕ *LHCGR* В ПОПУЛЯЦИИ ЧЕРНО-ПЕСТРОГО ГОЛШТИНИЗИРОВАННОГО СКОТА

ТАГМАЗЯН Арина Андраниковна, *ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»*

АРХИПОВА Анна Леонидовна, ФГБНУ *«Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»*

БРИГИДА Артем Владимирович, ФГБНУ*«Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»*

КЛИМОВ Евгений Александрович, *ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»; ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»*

КОВАЛЬЧУК Светлана Николаевна, *ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»*

Технология трансплантации эмбрионов является ключевой в ускоренном воспроизводстве крупного рогатого скота (КРС). Одним из ее важнейших этапов является отбор коров-доноров, наиболее чувствительных к процедуре гормональной стимуляции овуляции. Одним из перспективных генетических маркеров репродуктивного статуса крупного рогатого скота в настоящее время является ген, кодирующий рецептор лютеинизирующего гормона / хориогонадотропина (LHCGR). Одна из однонуклеотидных замен в гене LHCGR КРС уже описана в литературе как ассоциированная с количеством ооцитов и качеством эмбрионов – rs41256848 (c.1401G>T, p.Trp467Cys). В статье дана оценка частот генотипов и аллелей данной замены в популяции черно-пестрого голштинизированного скота (190 коров). Генотипирование проводили методом ПЦР-ПДРФ. В исследованной популяции КРС частота аллеля G, ассоциированного с более высокими показателями по общему количеству яйцеклеток и количеству выживших при трансплантации эмбрионов, а также с наименьшим количеством неоплодотворенных яйцеклеток, составляет 63,2 %.

Введение. Изучение процесса трансплантации эмбрионов началось примерно сто лет назад и уже в 1970-х годах перешло в коммерческую сферу деятельности на международном уровне. Так, в 2016 г. от 93 815 коров-доноров было получено 632 638 эмбрионов, из которых 196 тысяч были пересажены сразу, а оставшаяся часть была криоконсервирована [2, 10]. Лидером в области трансплантации эмбрионов на протяжении многих лет остается Северная Америка – в США и Канаде получено 52,5 % от всего числа эмбрионов (получены *in vivo*), в то время как в Европе только 20,4 % [2, 10]. В связи с таким широким распространением технологии трансплантации эмбрионов появилась необходимость отбора коров-доноров по генетическим показателям чувствительности к процедуре стимуляции овуляции гонадотропными гормонами для дальнейшей оценки по количеству полученных зрелых ооцитов [3]. В основе процесса суперовуляции лежит введение животным гонадотропных препаратов, одним из которых является лютеинизирующий гормон [1].

Рецептор лютеинизирующего гормона / хориогонадотропина (luteinizing hormone/ choriogonadotropin receptor, LHCGR) принадлежит к классу мембранных рецепторов, связанных с G-белкам [9]. У крупного рогатого скота ген *LHCGR* локализован в 11 хромосоме и состоит из 11 экзонов [6]. Полиморфизм данного гена может быть тесно связан с процессом суперовуляции [7, 12]. Ген *LHCGR* рассматривается как ген-кандидат для прогнозирования ответа на индукцию супер-овуляции. Выявленные в гене полиморфные варианты рассматриваются в связи с фертильностью крупного рогатого скота [4, 8, 11, 13]. Наиболее значимыми однонуклеотидными заменами (SNP) являются несинонимичные мутации, расположенные в экзонах гена, так как они ведут к замене аминокислоты, что в свою очередь изменяет первичную структуру белка и может повлиять на его функции.

Из всех найденных к настоящему времени SNP наибольший интерес представляет замена c.1401G>T (rs41256848), так как было выявлено, что особи, несущие генотипы GG или GT, характеризуются более высокими показателями по общему количеству яйцеклеток, а по количеству выживших при трансплантации эмбрионов наилучшие показатели у животных с генотипом GG. Животные с генотипом GG также имеют наименьшее количество неоплодотворенных яйцеклеток по сравнению с носителями двух других генотипов [13].

Целью данной работы была оценка распространенности генотипов замены rs41256848 (c.1401G>T, p.Trp467Cys) в гене *LHCGR* в популяции черно-пестрого голштинизированного скота методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

Методика исследований. В исследование были включены 195 черно-пестрых голштинизированных коров животноводческого хозяйства Калужской области. ДНК выделяли из образцов цельной крови коров с использованием набора М-Сорб (Синтол, Россия).

Специфичные праймеры подбирались с помощью программы GeneRunner на основе последовательности гена *LHCGR* КРС с учетом локализации однонуклеотидной замены в 11 экзоне, последовательности праймеров прямой 5'-ACAGTCCCCCGCTTTCTCAT-3' и обратной 5'-TGACACCCACAAGAGGCAAC-3', длины продукта ПЦР – 343 п.н.

Реакцию амплификации проводили в 20 мкл смеси для ПЦР, содержащей 1×буфер для амплификации, 3 мМ MgCl2, 0,2 мМ dNTP, 1 активную единицу HS Taq ДНК-полимеразы (ЗАО «Евроген», Россия), 0,2 мкМ прямого и обратного праймера. Амплификация проводилась при следующих условиях: денатурация при 95 °С в течение 15 с, отжиг праймеров при 62 °С в течение 15 с, элонгация при 72 °С в течение 15 с, 40 циклов.

Рестрикционный анализ проводили в 20 мкл смеси, содержащей 2 мкл 10×буфера G и 1,5 мкл эндонуклеазы NmuCI (Thermo Scientific, США) в течение 16 ч при 37 °С. Результаты рестрикции оценивали методом электрофореза в 1,2 %-м агарозном геле.

Расчет частот встречаемости выявленных генотипов проводили методом прямого подсчета. Частоты алеллей рассчитывали, используя формулу:

$$P(A) = \frac{(2N_1 + N_2)}{2n},$$

где N_1 – число гомозигот по исследуемому аллелю; N_2 – число гетерозигот; n – объем выборки.

Статистическую ошибку частот аллелей генов вычисляли по формуле:

$$S(p) = \sqrt{\frac{pq}{n}},$$

где p – частота исследуемого аллеля; $q = 1 - p$; n – объем выборки.

Для оценки отклонения наблюдаемых генотипов от равновесия Харди – Вайнберга (избыток гетерозигот) использовалось значение χ^2:

$$\chi^2 = \sum \frac{(H_o - H_e)^2}{H_e},$$

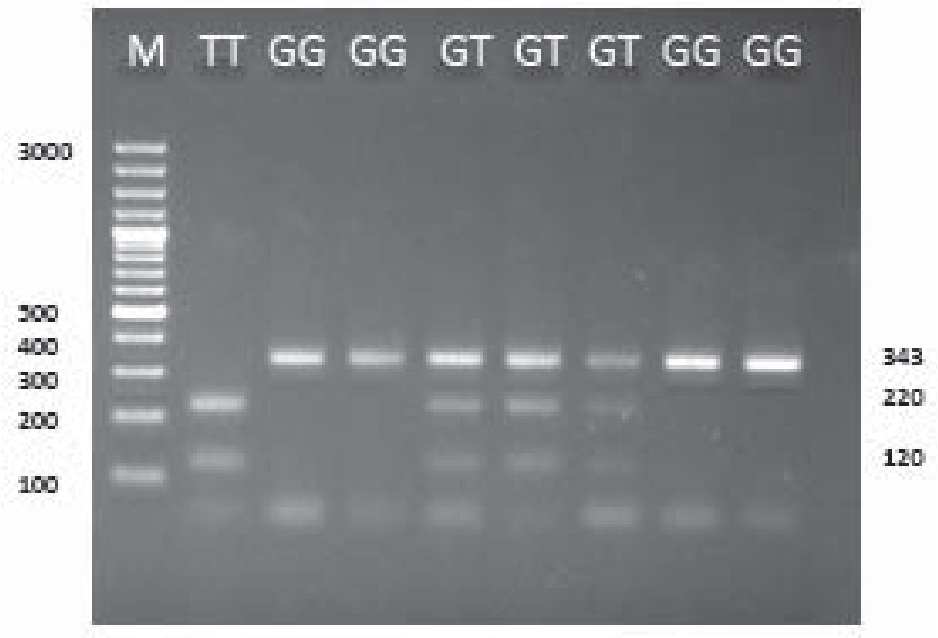
где H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность.

Оценку влияния аминокислотной замены Trp467Cys на функцию LHCGR проводили с использованием сервисов SIFT (http://sift.bii.a-star.edu.sg/) [14] и PROVEAN (http://provean.jcvi.org) [5].

Результаты исследований. Была проведена оценка частот генотипов и аллелей замены rs41256848 (c.1401G>T, p.Trp467Cys) в гене *LHCGR* у российского черно-пестрого голштинизированного скота с использованием метода ПЦР-ПДРФ. Для идентификации генотипа каждого животного продукты ПЦР длиной 343 п.н. обрабатывались эндонуклеазной рестрикцией NmuCI с последующим электрофоретическим анализом в агарозном геле (см. рисунок). Наличие аллеля T приводит к появлению сайта рестрикции эндонуклеазы NmuCI. Продукты рестрикционного анализа имели следующие размеры: для генотипа GG – 343 п.н., для генотипа TT – 220+120 п.н., для гетерозигот GT – 343+220+120 п.н.

По результатам молекулярно-генетических исследований вычислены значения частот генотипов и аллелей для замены rs41256848 в гене *LHCGR* (см. таблицу).

В исследованной выборке преобладают животные с генотипами G1401G (P = 0,416) и G1401T (P = 0,432). Частота аллеля G, ассоциированного согласно литературным данным с более высокими показателями по общему количеству яйцеклеток и количеству выживших при трансплантации эмбрионов, а также с



Пример электрофоретического разделения продуктов рестрикции. М – маркер молекул ярных весов ДНК (100–3000 п.н., GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus, Thermo Scientific, США)

Частоты генотипов и аллелей замены rs41256848 в гене *LHCGR* в исследованной выборке КРС

Генотип	Количество	*P*
TT	28	0,151
TG	80	0,432
GG	77	0,416
Аллель	Количество	*P*±*S(p)*
T	266	0,368±0,035
G	114	0,632±0,035

Примечание: *P* – частоты генотипов и аллелей; *S(p)* – стандартная ошибка для частот аллелей.

наименьшим количеством неоплодотворенных яйцеклеток [13], составляет 63,2 %.

Распределение генотипов соответствует равновесию Харди – Вайнберга (χ^2 = 0,143), что свидетельствует об отсутствии отбора в исследованной популяции.

Исследуемая мутация 1401G>T в гене *LHCGR* приводит к замене аминокислотного остатка триптофана на цистеин в позиции 467 белка. Согласно полученным с помощью сервисов SIFT (http://sift.bii.a-star.edu.sg/) [13] и PROVEAN (http://provean.jcvi.org) [5] результатам, данная замена может влиять на функцию белка: SIFT = = 0,01 (пороговое значение = 0,05) и PROVEAN score = –11,005 (порог = –2,5). Данные изменения способны влиять на эффективность активации сигнальных путей, инициируемых *LHCGR* и регулирующих процесс овуляции.

Заключение. В данной работе впервые описаны частоты встречаемости аллелей 1401G>T гена *LHCGR* и генотипов в популяции российского черно-пестрого голштинизированного скота методом ПЦР-ПДРФ. В связи с описанной связью полиморфизма rs41256848 (c.1401G>T, p.Trp467Cys) гена *LHCGR* с эффективностью индукции суперовуляции у коров [13] генотипирование животных по данным аллельным вариантам может быть перспективным подходом при отборе соответствующих коров-доноров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Факторы, влияющие на реакционный ответ яичников коров-доноров эмбрионов при введении экзогенных гонадотропинов (обзор) / А.В. Бригида [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32 – № 6. – С. 56–63.

2. *Bo G.A., Mapletoft R.J.* Embryo Transfer Technology in Cattle // Animal Biotechnology 1. – Springer, Cham, 2018, P. 107–133.

3. *Bo G.A., Mapletoft R.J.* Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle // Theriogenology, 2014, Vol. 81, No. 1, P. 38–48.

4. *Cochran S.D., Cole J.B., Null D.J., Hansen P.J.* Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle // BMC genetics, 2013, 14: 49.

5. *Choi Y., Chan A.P.* PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels // Bioinformatics, 2015, Vol. 31, P. 2745–2747.

6. *Dufau M.L., Tsai-Morris C.H., Hu Z.Z., Buczko E.* Structure and regulation of the luteinizing hormone receptor gene // The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 1995, Vol. 53, No. 1-6, P. 283–291.

7. *Ginther O.J., Bergfelt D.R., Beg M.A., Kot K.* Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone // Biology of reproduction, 2001, Vol. 64, No. 1, P. 197–205.

8. *Hastings N., Donn S., Derecka K., Flint A.P., Woolliams J.A.* Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits // Animal genetics, 2006, Vol. 37, No. 6, P. 583–585.

9. *Kroeze W.K., Sheffler D.J., Roth B.L.* G-protein-coupled receptors at a glance // Journal of cell science, 2003, Vol. 116, No. 24, P. 4867–4869.

10. *Perry G.* Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals // Embryo Transfer Newsletter, 2014, Vol. 32, P. 14–26.

11. *Santos-Biase W.K., Biase F.H., Buratini J.Jr., Balieiro J., Watanabe Y.F., Accorsi M.F., Ferreira C.R., Stranieri P., Caetano A.R., Meirelles F.V.* Single nucleotide polymorphisms in the bovine genome are associated with the number of oocytes collected during ovum pick up // Animal reproduction science, 2012, Vol. 134, No. 3–4, P. 141–149.

12. *Yang W.C., Tang K.Q., Li S.J., Chao L.M., Yang L.G.* Polymorphisms of the bovine luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR) gene and its association with superovulation traits // Molecular biology reports, 2012, Vol. 39, No. 3, P. 2481–2487.

13 *Yu Y., Pang Y., Zhao H., Xu X., Wu Z., An L., Tian J.* Association of a missense mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) with superovulation traits in Chinese Holstein heifers // Journal of animal science and biotechnology, 2012, 3:35.

14. *Zerbino D.R., Achuthan P., Akanni W. et al.* Ensembl 2018 //Nucleic acids research, 2017, Vol. 46, No. D1, P. D754–D761.

Тагмазян Арина Андраниковна, *младший научный сотрудник, ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий». Россия.*

Архипова Анна Леонидовна, *младший научный сотрудник, ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий». Россия.*

Бригида Артем Владимирович, *ведущий научный сотрудник, «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий». Россия.*

Климов Евгений Александрович, *д-р биол. наук, зам. директора по научной работе, ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий»; доцент кафедры «Генетика», ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». Россия.*

Ковальчук Светлана Николаевна, *канд. биол. наук, врио директора, ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий». Россия.*

127422, г. Москва, ул. Костякова, 12, стр. 4.
Тел.: (495) 610-21-31.

Ключевые слова: *LHCGR; rs41256848; крупный рогатый скот; ПЦР-ПДРФ.*

FREQUENCIES OF GENOTYPES AND ALLELES OF RS41256848 IN THE LHCGR GENE IN THE POPULATION OF BLACK-AND-WHITE HOLSTEINIZED CATTLE

Tagmazian Arina Andranikovna, *Junior Researcher, Federal State Budget Scientific Institution Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies. Russia.*

Arkhipova Anna Leonidovna, *Junior Researcher, Federal State Budget Scientific Institution Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies. Russia.*

Brigida Artyom Vladimirovich, *Researcher, Federal State Budget Scientific Institution Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies. Russia.*

Klimov Eugene Aleksandrovich, *Doctor of Biological Sciences, Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies. Russia.*

Kovalchuk Svetlana Nikolaevna, *Candidate of Biological Sciences, Federal State Budget Scientific Institution Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies. Russia.*

Keywords: *LHCGR; rs41256848; cattle; PCR-RFLP.*

Embryo transfer technique is one of the key in accelerated reproduction of cattle. One of the most important stages is the selection of donor cows that are most sensitive to the procedure of hormonal stimulation of ovulation. One of the promising genetic markers of the reproductive status of cattle is currently the gene encoding the luteinizing hormone / choriogonadotropin receptor (LHCGR). One of the SNP in the LHCGR gene of cattle has already been described in the literature as associated with the number of oocytes and the quality of embryos - rs41256848 (c.1401G> T, p.Trp467Cys). The purpose of this work was to estimate the frequencies of genotypes and alleles of this substitution in the population of Black-and-White holsteinized cattle (190 cows). Genotyping was performed by PCR-RFLP method. In the studied population of cattle, the frequency of the G allele associated with higher rates in the total number of oocytes and the number of embryos survived after transplantation, as well as with the least number of unfertilized oocytes, is 63.2%.