

Е. Л. Романишко, М. Е. Михайлова

Разработка систем генотипирования для определения SNP *in7-G162C* и *in3-G3072A* в гене *IGF2*, которые используются в качестве маркеров мясной продуктивности в свиноводстве

Аннотация. Ген *pIGF-2* является важным QTL локусом, значимым в селекции свиней, используемый для улучшения мясных и откормочных качеств животных. Для выявления двух важных однонуклеотидных замен в 7-м интроне (*in7-G162C*) и в 3-м интроне (*in3-G3072A*) применяемых в качестве маркеров мясной продуктивности в свиноводстве, разработаны системы генотипирования свиней с помощью методов ПЦР-ПДРФ и секвенирования.

Ключевые слова: полиморфизм, ген инсулиноподобного фактора роста 2, импринтинг, секвенирование, дикий аллель, мутантный аллель.

Авторы:

Романишко Елена Леонидовна — магистр биологических наук, м.н.с. лаборатории генетики животных; ГНУ «Институт генетики и цитологии» НАН Беларуси, г. Минск ул. Академическая; 27, e-mail: LenaRamanishko@mail.ru;

Михайлова Мария Егоровна — кандидат биологических наук, доцент, зав. лабораторией генетики животных ГНУ «Институт генетики и цитологии» НАН Беларуси, г. Минск ул. Академическая; 27, e-mail: m.mikhailova@igc.by.

Введение. Ген *pIGF-2* — один из QTL локусов, значимый для селекционной работы в свиноводстве. Гормон инсулиноподобного фактора роста (*IGF2*) играет важную роль в росте и развитии организма, способствует росту и пролиферации клеток в различных тканях.

Для *IGF-2* характерна моноаллельная отцовская экспрессия гена. Такое различие в активности аллелей гена *pIGF2* вызвано геномным импринтингом. Импринт — форма эпигенетического наследования, которое характеризуется дифференциальной экспрессией гена в зависимости от его родительского происхождения. В участках генома, подверженных импринтингу, экспрессируется только один из двух аллелей отцовский или материнский. Второй аллель, вследствие наличия на нем отпечатка, импринтирован (выключен или подавлен) и не экспрессируется. В основе геномного импринтинга, лежит специфическое для особей разного пола метилирование цитозиновых оснований ДНК, которое устанавливается во время гаметогенеза и выключает транскрипцию одного из родительских аллелей [1].

Для двух SNP *in7-G162C* и *in3-G3072A* в гене *pIGF-2* найдена взаимосвязь с хозяйственно-полезными признаками свиней.

Дикий аллель G в локусе *in3-G3072A* ассоциирован с пониженной мышечной массой и повышенным отложением жира, а мутантный аллель

A вызывает интенсивный мышечный рост и увеличение соотношения мышечной массы к жировой [2, 3]. Также выявлено влияние аллеля В в локусе *in7-G162C* у хряков на откормочные и мясные качества полученного от них потомства. Потомки хряков породы немецкий ландрас с генотипом ВВ превосходили по показателям абсолютного, среднесуточного приростов и по возрасту достижения живой массы 100 кг не только потомков хряков с генотипом АА, но и хряков с генотипом АВ, соответственно, на 2,7 и 1,9%, на 2,8 и 2,0% и на 2,0 и 1,5%. [4].

Поэтому, целью работы стала разработка и оптимизация систем генотипирования для определения SNP *in7-G162C* и *in3-G3072A* в гене *pIGF-2* для дальнейшего генотипирования хряков-производителей белорусских пород свиней.

Условия, материалы и методы исследований. В работе в качестве объекта исследования были использованы свиньи белорусской крупной белой породы и йоркшир (n=53). Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из биологического материала — проб ткани (ушной выщип). Для выделения ДНК использовали набор реагентов «Нуклеосорб» («Праймтех», Беларусь). Количество выделенной ДНК определяли с помощью Qubit® 2.0 Fluorometer с использованием набора Molecular probes Qubit® ds DNA BR Assay kit («Life technologies», США).

Для выявления SNP (in7-G162C) в гене *pIGF-2* (GenBank: EU074060.1) была использована реакционная смесь объемом 20 мкл, содержащая, 1×ПЦР буфер, 1.5 mM MgCl₂, 200 мкМ смеси dNTP, 300 нМ каждого праймера, 1.5 U Taq-полимеразы («Thermo scientific», Литва), miliQ воду и 20 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили на приборе С1000™ Thermal Cycler («Bio-Rad», США) при следующих условиях: 94 °С — 3 мин; 35 циклов: 94 °С — 30 с, 68 °С — 40 с, 72 °С — 2 мин; 72 °С — 5 мин. с использованием праймеров:

F: 5'- AGACTCTGTGC
GGCGGGGAGCT-3' и
R: 5'- CGAGTGCGGT
CCCCAATGGAT -3' [5]

Анализ полиморфизма (*in7-G162C*) гена *pIGF-2* проводился с помощью рестриктазы NciI («Thermo scientific», Литва) в течение ночи при 37 °С. Полиморфизм обусловлен трансверсией 162 G→C. Идентификацию фрагментов после рестрикционного анализа проводили в 2% агарозном геле (SeaKem® LE Agarose, «Lonsa») с использованием интеркалирующего красителя ZUBR Green-1 («Праймтех», Беларусь) относительно маркера молекулярных масс DNA Ladder («Thermo scientific», Литва). Результаты ПЦР-ПДРФ анализа фрагмента гена *pIGF-2*/NciI получены с помощью системы гель-документирования Quantum ST4 («Vilber lourman», Франция) представлены на рисунке 1.

Реакционная смесь для анализа SNP in3-G3072A в гене *pIGF-2* (GenBank: AY242112.1) объемом 25 мкл содержала деионизированную воду, 1×ПЦР буфер, MgCl₂, 200 мкМ смеси dNTP, 300 нМ каждого праймера, 1.5 U Phusion Hot Start DNA-полимеразы («Thermo scientific», Литва) и 20 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили на приборе С1000™ Thermal Cycler («Bio-Rad», США) при следующих условиях: 94 °С — 4 мин; 35 циклов: 94 °С — 30 с, 68 °С — 30 с, 72 °С — 30 с; 72 °С — 5 мин. с использованием праймеров [6].

Специфичные ПЦР-продукты исследуемого локуса (*inA3072G*) гена *pIGF-2* вырезали из геля и очищали с помощью набора реагентов Silica

Bead DNA Gel Extraction Kit («Thermo scientific», Литва) согласно инструкции. Для постановки секвенирующей ПЦР использовали Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Секвенирующую ПЦР проводить согласно следующим условиям: 96 °С 1 мин; 25 циклов: 96 °С 10 сек, 50 °С 5 сек, 60 °С 4 мин; 16 °С 5 мин. ПЦР-продукты после секвенирующей ПЦР очищали от непрореагировавших флуоресцентно меченых терминаторных нуклеотидов переосаждением этанолом/Na₂ЭДТА. Определение нуклеотидной последовательности проводили на 3500 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) с помощью программного обеспечения GeneMapper Software V4.0.

Анализ и обсуждение результатов. Цитозинные основания ДНК метилируются в основном в симметричных CpG-динуклеотидах. Однонуклеотидная замена 3072A→G в 3 интроне гена *pIGF-2* находится в районе, богатом CpG, так называемом CpG островке [2] (рисунок 2). Данное расположение усложняет подбор праймеров.

Нами были подобраны 7 пар праймеров, с одной из которых получены специфичные фрагменты гена *pIGF-2*. После очистки специфичных ПЦР-продуктов, исследуемые образцы были секвенированы. Оценка и обработка данных проводились

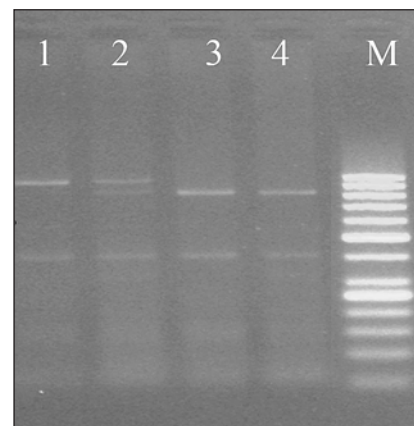


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР-ПДРФ анализа полиморфизма G162C гена *pIGF-2*.

Условные обозначения: М — маркер FastRulerUltra Low Range DNA Ladder, дорожка 1 — гомозиготный генотип AA (900, 450 п.н.); дорожка 2 — гетерозиготный генотип AB (900, 800, 450 п.н.); дорожки 3, 4 — гомозиготный генотип BB (800, 450 п.н.)

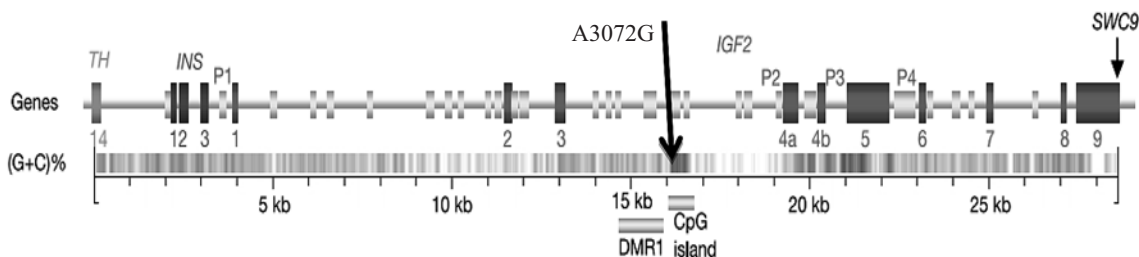


Рис. 2. Локализация SNP A3072G в гене *pIGF-2* (Van Laere, A. S., 2003)

с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis версия 5.4 (рисунок 3).

Апробация методики выявления SNP in3-G3072A в гене *pIGF2* проведена на выборке животных (n=53) пород белорусская крупная белая и заводского типа породы йоркшир для генотипирования племенных хряков. По результатам генотипирования получены данные, представленные в таблице 1.

Данные по частотам встречаемости аллелей и генотипов у двух изученных пород свиней соотносятся с литературными данными. Так свиньи заводского типа породы йоркшир характеризуются более высокой частотой встречаемости (46,2%) желательного генотипа QQ, в отличие от свиней породы белорусская крупная белая (10%). У исследованных хряков и их потомков измерены откормочные и мясные показатели. Работа выполнялась в рамках проекта ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий».

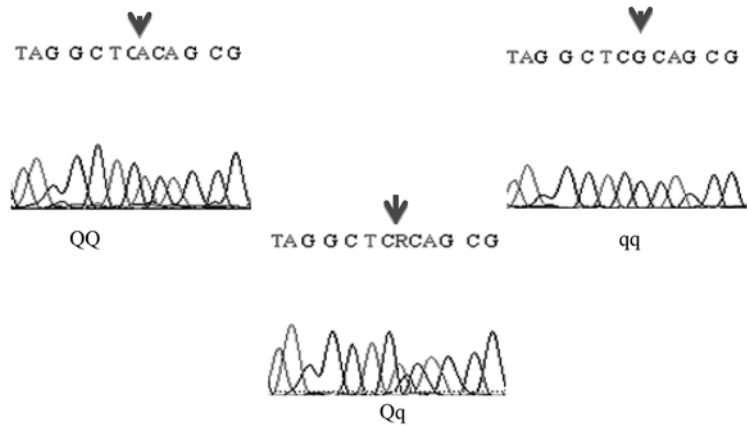


Рис. 3. Секвенирование образцов для выявления полиморфизма in3-G3072A в гене *pIGF-2*

Выводы. Разработанные системы по выявлению однонуклеотидных замен в 7-м интроне (in7-G162C) и в 3-м интроне (in3-G3072A) гена *pIGF2* могут быть использована для массового скрининга хряков в селекционно-племенной работе в свиноводстве с целью улучшения мясных качеств их потомков.

Таблица 1. Частоты встречаемости аллелей и генотипов *pIGF2* (in3-G3072A)

Порода	Кол-во особей	Всего генотипов			Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
		QQ	Qq	qq	QQ	Qq	qq	Q	q
Белорусская крупная белая	40	4	23	13	10,0	57,5	32,5	0,388	0,612
Йоркшир	13	6	7	—	46,2	53,8	—	0,731	0,269

Литература

1. Назаренко С. А. Геномный импринтинг и его роль в этиологии наследственных болезней человека / С. А. Назаренко // Бюллетень сибирской медицины. — № 3. — 2004. — С. 8–17.
2. Van Laere A. S. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig / A. S. Van Laere et all. // Nature. — 2003. — Vol. 23. — № 425 (6960). — P. 832–836.
3. Дойлидов В. А. Морфологический состав туш молодняка свиней в зависимости от генотипа хряков пород йоркшир, ландрас и дюрок по гену IGF-2 (IN2) / В. А. Дойлидов, М. Е. Михайлова, Д. А. Каспирович // Современные тенденции и технологические инновации в свиноводстве. — Горки, 4–6 октября 2012 г. — С. 41–45.
4. Дойлидов В. А. Откормочные и мясные качества молодняка свиней в зависимости от генотипа хряков пород йоркшир, ландрас и дюрок по гену IGF-2 / В. А. Дойлидов и др. // Актуальные проблемы сельскохозяйственной биотехнологии. — Пинск, 2012. — С. 28–34.
5. LIU Xiao-chun Genetic Effect of three Loci related with Growth and Carcass Traits in Swine / LIU Xiao-chun, et. all. // Scientia Agricultura Sinica/ — 2009. — 42 (2). — P. 742–747.
6. Fontanesi L. The insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene intron3-g.3072G>A polymorphism is not the only Sus scrofa chromosome 2p mutation affecting meat production and carcass traits in pigs: Evidence from the effects of a cathepsin D (CTSD) gene polymorphism L. Fontanesi, et. all. // Journal Animal Science. — 2010. — V. 88. — P. 2235–2245.

Romanishko A. L., Mikhailova M. E.

Development systems for determining genotyping SNP in7-G162C and in3-G3072A gene IGF2, which is used as a marker in pig meat productivity

Abstract. *The pIGF-2 gene is an important QTL locus significant in breeding pigs to be used to improve the quality of meat and fattening animals. For identify two important single nucleotide polymorphism in the 7th intron (in7-G162C) and in the 3rd intron (in3-G3072A) used as markers in pig meat productivity, have been developed the pigs genotyping systems using PCR-RFLP method and the sequencing.*

Keywords: polymorphism, gene IGF-2 imprinting, sequencing, wild allele, mutant allele.

Authors:

Romanishko Elena Leonidovna — master of Biological Sciences, junior researcher Laboratory Animal Genetics State Scientific Institution «Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Street Academic, 27; e-mail: LenaRamanishko@mail.ru;

Mikhailova Mariya Egorovna — Ph.D., Associate Professor, Head of Laboratory of Animal Genetics State Scientific Institution «Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Street Academic, 27; e-mail: m.mikhailova@igc.by.