

DOI <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-238-8-23>

**OPTIMIZATION OF THE DNA TYPING TECHNIQUE
FOR *TERT* AND *MT2A* CANDIDATE GENES
FOR MARKER-ASSOCIATED SELECTION OF PIGS**

**ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕХНІКИ ДНК-ТИПУВАННЯ
ЗА ГЕНАМИ-КАНДИДАТАМИ *TERT* І *MT2A*
ДЛЯ МАРКЕР-АСОЦІЙОВАНОЇ СЕЛЕКЦІЇ СВИНЕЙ**

Saienko A. M.

*Candidate of Agriculture Science,
Senior Research Associate at the
Genetics Laboratory
Institute of Pig Breeding
and Agroindustrial Production
of the National Academy
of Agrarian Sciences
of Ukraine*

Пека М. Ю.

*Junior research Associate at the
Genetics Laboratory
Institute of Pig Breeding
and Agroindustrial Production
of the National Academy of Agrarian
Sciences of Ukraine*

Balatsky V. N.

*Doctor of Agriculture Science,
Professor,
Head of the Genetics Laboratory
Institute of Pig Breeding
and Agroindustrial Production
of the National Academy of Agrarian
Sciences of Ukraine
Poltava, Ukraine*

Саєнко А. М.

*кандидат сільськогосподарських
наук,
старший науковий співробітник
лабораторії генетики
Інститут свинарства
і агропромислового виробництва
Національної академії аграрних наук
України*

Пека М. Ю.

*молодший науковий співробітник
лабораторії генетики
Інститут свинарства
і агропромислового виробництва
Національної академії аграрних наук
України*

Балацький В. М.

*доктор сільськогосподарських наук,
професор,
завідувач лабораторії генетики
Інститут свинарства
і агропромислового виробництва
Національної академії аграрних наук
України
м. Полтава, Україна*

Селекційний процес в свинарстві може бути значно ефективнішим, якщо для оцінки тварин та їх подальшого відбору крім традиційної оцінки особин за власною продуктивністю та якістю потомства [1] використовувати нові підходи, які базуються на досягненнях молекулярної генетики [2; 3]. Молекулярно-генетичний аналіз дозволяє

виявити локуси геному тварини, які контролюють господарські ознаки і розробити на основі їх поліморфізму достатньо точні та інформативні ДНК-маркери [4]. За їх допомогою можна проводити оцінку якостей тварин на генному рівні, за принципом переходу від гена до ознаки.

На описаному вище підході ґрунтується маркер-асоційована селекція, тобто використання ДНК-маркерів у селекції, що сприяє швидкому введенню в популяцію свиней бажаних алелей генів з метою підвищення плодючості, продуктивності, стійкості проти захворювань і як результат, прискорення селекції та зниження витрат на виробництво свинини [5]. Розроблено досить багато типів ДНК-маркерів [6], серед яких найперспективнішими є ті, що засновані на виявленні одонуклеотидних поліморфізмів (*single nucleotide polymorphism – SNP*) в регуляторних або структурних частинах генів, які відповідають за прояв господарсько важливих продуктивних ознак і належать до локусів кількісних ознак – *QTL (quantitative trait loci)*.

На сьогоднішній день відомий цілий ряд генів, для яких вже доведені суттєві асоціації з конкретними репродуктивними, відгодівельними і м'ясними якостями свиней [7; 8]. Приклади генів-маркерів продуктивності свиней, які наразі є найбільш використовуваними у маркерній селекції [9]:

- маркери плодючості: ген рецептора естрогену – *ESR*, ген фолікулостимулюючого гормону – *FSH*, ген ретинол-зв'язуючий білка 4 – *RBP4*, ген остеопонтіна – *OPN*, ген рецептора мелатоніну 1А – *MTNR1A*, ген рецептора пролактину – *PRLR*;

- маркери генетичних аномалій: ген рецептора ріанодина – *RYR1*, ген субдиниці гама-3 5'-АМФ-активованої протеїнкінази – *PRKAG3*, ген білка джгутика сперми 2 – *SPEF2*;

- маркери відгодівельних і м'ясних якостей свиней: ген інсуліно-подібного фактору росту 2 – *IGF-2*, ген меланокортинового рецептора 4 – *MC4R*, ген гормону росту – *GH*, ген рецептора гормону росту – *GHRH*, ген гіпофізарного фактору транскрипції – *PIT1* та ряд інших.

Перелік генів-маркерів, рекомендованих до використання, постійно розширюється. Крім того, актуальним залишається пошук нових генів, для яких можуть бути встановлені асоціації з господарсько корисними ознаками свиней. У нашій роботі ми розглядаємо SNPs свині за генами теломеразної зворотної транскриптази – *TERT* та металотіонеїну 2А – *MT2A*, які потенційно можуть бути генами-маркерами та використовуватись у маркер-асоційованій селекції.

У ряді досліджень встановлено, що у гені *TERT* різних тварин наявні поліморфізми, які можуть бути використані у якості

молекулярно-генетичних маркерів. Так, показана можливість використання поліморфізмів у гені *TERT* для оцінки ступеня диференціації між кінцями англо-арабської та гуцульської порід [10]. Також встановлено, що можливе успадкування більш довгих теломер завдяки подовженню теломер у сперматозоїдів, що у свою чергу уповільнить процеси старіння [11], а отже може відобразитись на продуктивній придатності тварин. Крім, того зміни у регуляції та у самому гені *TERT* призводять до більшої схильності до захворювань [12], що безпосередньо має впливати на господарсько корисні ознаки тварини.

Металотіонеїн 2A належить до родини висококонсервативних білків, які відіграють важливу роль у метаболізмі есенціальних та захисті від токсичної дії важких металів [13]. Для людини встановлено зв'язок різних фізіологічних та патологічних станів з поліморфізмами генів металотіонеїнів [14]. Також виявлені зв'язки поліморфізмів за генами металотіонеїнів гігантської устриці (*Crassostrea gigas*) [15] та корів Зебу (*Bos taurus indicus*) [16] з групами тварин, які проживали на територіях, забруднених важкими металами, або були стійкими до них, що робить гени металотіонеїнів перспективними маркерами резистентності до важких металів.

Для розробки молекулярно-генетичних маркерів на основі обраних генів та пошуку перспективних SNPs було проаналізовано бази даних первинної структури генів *TERT* (*Ensembl ID*: ENSSSCG00000017118) та *MT2A* (*Ensembl ID*: ENSSSCG00000030300). Для дослідження гена *TERT* обрано фрагмент другого екзону, що містить чотири місенс SNPs (*rs789641834*, *rs698799571*, *rs706045634*, *rs696805316*) та один синонімічний SNP (*rs320317081*). Для дослідження гена *MT2A* було обрано ділянку, що включає 5'-область (промоторну), перший екзон і частину першого інтрону, оскільки велика кількість SNPs, розташованих у промоторній області потенційно можуть впливати на регуляцію експресії гена *MT2A*.

За використання програми Primer3 [17] було здійснено дизайн олігонуклеотидних праймерів для ПЛП-ампліфікації і оптимізовано умови ампліфікації для фрагментів генів *TERT* (271 пн) та *MT2A* (520 пн), як зазначено у табл. 1.

Для розроблення техніки генотипування методом ПЛП-ПДРФ за геном *TERT* свиней було обрано SNP *rs698799571*, а для генотипування за геном *MT2A* свиней – SNP *rs333287340*. Далі було здійснено підбір ендонуклеаз рестрикції, визначено розмір рестрикційних фрагментів для кожного з алейних варіантів (табл. 2), що візуалізуються після розділення в 8 % поліакриламідному гелі.

Таблиця 1

Структура праймерів і програма ампліфікації

Ген	Програма ампліфікації	Фрагмент	Структура праймерів
<i>TERT</i>	94 °C – 3 хв.; 31 цикл: 94 °C – 30 сек.; 60 °C – 26 сек.; 72 °C – 40 сек.; 72 °C – 2 хв.	271 пн	F: 5'- ACGACGTGCTCACCCACCT -3'
			R: 5'- GCCTCTGGCTGGAAGTGG -3'
<i>MT2A</i>	94°C – 3 хв.; 31 цикл: 94 °C – 30 сек.; 58 °C – 26 сек.; 72 °C – 40 сек.; 72 °C – 2 хв.	520 пн	F: 5'- ACCTGCCCTCTAACCTCTAA -3'
			R: 5'- AACGTAAAGTGGGGAGTCAG -3'

Таблиця 2

Ендонуклеаза рестрикції, прогнозовані фрагменти рестрикції і відповідні їм алельні варіанти

Ген/ ендонуклеаза рестрикції	Алелі і відповідні фрагменти рестрикції, в пн	
<i>TERT / RsaI</i>	A :231+39	T: 270
<i>MT2A</i>	G: 169+131+55+53+52+32+23	C: 221+131+55+53+32+23

Розроблена техніка ДНК-типування з використанням методу ПЛР-ПДРФ для генів *TERT* та *MT2A* свині дозволяє проводити аналіз розподілу та співвідношення між алельними варіантами генів за обраними SNPs у популяціях свиней різних порід. Типування свиней за генами *TERT* та *MT2A* може дати корисну інформацію для відбору тварин зі сприятливим для розвитку продуктивних ознак генотипом. У випадку, якщо для досліджуваних SNPs будуть знайдені достовірні асоціації з господарсько корисними ознаками свиней, це стане основою для впровадження генів *TERT* та *MT2A* у практику селекційного процесу, що розширить можливості маркер-асоційованої селекції свиней.

Література:

1. Рибалко В.П., Березовський М. Д., Хатько І. В. Методика оцінки кнурів і свиноматок за якістю потомства в умовах спеціалізованих контрольно-випробувальних станцій. *Сучасні методи досліджень у свинарстві*. Полтава : РВВ Полтавської державної аграрної академії, 2005. С. 26–31.
2. Dekkers J. C. M. Commercial application of markers- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 2004. Vol. 82. P. 313–328.
3. Рубан С. Ю., Гетья А. А., Балацький В.М. Перспективи застосування геномної селекції у свинарстві. *Тваринництво сьогодні*. 2010. № 2. С. 44–47.
4. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавилов. журн. генет. и селекции*. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 1044–1054.
5. Маркин Н. В., Усатов А. В. Методы амплификации нуклеиновых кислот: учеб. пособие по молекулярной генетике. Ростов н/Д : Изд-во ЮФУ, 2010. С. 25–30.
6. Сулимова Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения. *Усп. соврем. биологии*. 2004. Т. 124. С. 260–271.
7. Rothschild M. F., Soller M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. *Probe*. 1997. Vol. 8. P. 13–22.
8. Candidate gene markers for reproductive traits in polish 990 pig line. / A. Korwin-Kossakowska et al. *J. Anim. Breed. Genet.* Berlin. 2003. Vol. 120. P. 181–191.
9. Genetic diversity of pig breeds on ten production quantitative traits loci / V. N. Balatsky et al. *Cytol Genet.* 2015, Vol. 49, no. 5. P. 299–307. DOI: 10.3103/S0095452715050023 (date of access 23.05.2022).
10. Genetic structure of Hucul and Anglo-Arabian horses at the Tert locus / T. Ząbek et al. *Annals of Animal Science*. 2012. Vol. 12, iss. 4. P. 483–494. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10220-012-0040-4> (date of access: 04.11.2021).
11. Eisenberg D. T. A., Kuzawa C. W. The paternal age at conception effect on offspring telomere length: mechanistic, comparative and adaptive perspectives. *Philosophical Transaction of the Royal Society. Series B. Biological Society*. 2018. Vol. 373, iss. 1741. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0442> (date of access: 14.11.2021).

12. McAloney C. A., Silverstein K. A. T., Modiano J. F., Bagchi A. Polymorphisms within the Telomerase Reverse Transcriptase gene (TERT) in four breeds of dogs selected for difference in lifespan and cancer susceptibility. *BMC Veterinary Research*. 2014. Vol. 10. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-20> (date of access: 18.04.2022).
13. Mammalian metallothioneins: properties and functions / P. Babula et al. *Metallomics*. 2012. Vol 4, iss. 8. P. 739–750. DOI: <https://doi.org/10.1039/c2mt20081c> (date of access: 20.03.2022)
14. Metallothionein polymorphisms in pathological processes / M. Raudenska et. al. *Metallomics*. 2014. Volume 6, iss. 1. P. 55–68. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3mt00132f> (date of access: 10.04.2022).
15. Polymorphism of metallothionein genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of response to metal exposure / A. Tanguy. *Biomarkers*. 2002. Vol.7, no 6. P. 439–450. DOI: <https://doi.org/10.1080/13547500210157531> (date of access: 15.04.2022).
16. Screening the partial coding region of metallothionein isoform-2 gene in Zebu cattle / P. N. Gholap et al. *IJVR*. 2016. Vol. 17, no. 3. P. 155–159 (date of access: 15.04.2022)
17. Primer3 – new capabilities and interfaces / A. Untergasser et al. *Nucleic Acids Research*. 2012. Vol. 40, no 15. e115. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks596> (date of access: 20.03.2022).