

Рудоман Г.С., спеціаліст.  
Балацький В.М., кандидат біологічних наук  
Інститут свинарства і АПВ НААН

## АНАЛІЗ НАЯВНОСТІ МУТАНТНОГО АЛЕЛЮ ГЕНА *KPL2*, ЯКИЙ ОБУ- МОВЛЮЄ ВИНИКНЕННЯ ДЕФЕКТУ НЕРУХОМОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ, У СВИНЕЙ РІЗНИХ ПОРІД

*Рецензент – кандидат сільськогосподарських наук В. Ю. Нор*

*Викладено результати генотипування свиней порід велика біла англійської селекції, українська велика біла внутріпородний тип 1 і тип 3, червона білопояса, миргородська, полтавська м'ясна та ландрас за геном *KPL2*, який асоційований з дефектом нерухомості сперматозоїдів із коротким хвостом. Оптимізовано ПЛР техніку визначення генотипів за *KPL2* геном, що дозволило проводити популяційні дослідження на великих вибірках тварин. Встановлено, що даний ген для обраних порід є мономорфним, всі досліджені тварини – гомозиготні і мали генотип ММ, мутантний алель гену *KPL2* не виявлений. Існує доцільність проводити аналіз свиней вітчизняної та зарубіжної селекції з метою недопущення появи і поширення даної мутації в популяціях тварин.*

*Ключові слова: днк-маркер, ген *kpl2*, полімеразна ланцюгова реакція мутація, сперматозоїд, кнур, безпліддя*

Завдяки цілеспрямованій селекції, що проводилася в останні десятиліття, значно підвищився генетичний потенціал свиней за багатьма господарсько корисним ознаками. Разом з тим все частіше виникають проблеми, пов'язані з плодючістю тварин, відтворювальною здатністю самців. Досвід показує, що ці проблеми неможливо вирішити лише за рахунок поліпшення годівлі, технології утримання або засобами ветеринарної терапії. Встановлено, що багато форм патології тварин мають генетичну основу і пов'язані з мутаціями і рекомбінаціями спадкового матеріалу – генів і хромосом. Організація генетичного моніторингу в тваринництві дозволяє виявляти шкідливі генні мутації у популяціях, здійснювати профілактику поширення генетичних патологій. В якості ДНК-маркерів відтворювальної здатності кнурів розглядається ген *KPL2* (альтернативна назва – *SPEF2*, *sperm flagellar 2*).

Ген *KPL2* знаходиться в хромосомі 16. Його експресія відбувається переважно у клітинах війчастого епітелію. Досліджено, що інтронна інсерція у даному гені асоційована із дефектом нерухомості сперматозоїдів з коротким хвостом (ISTS – Immotile short tail sperm). Даний дефект є причиною безпліддя внаслідок нерухомості, укорочення і порушень у будові всіх структур хвоста сперматозоїда [1]. Станом на 2000 рік у Фінляндії 37% свиней породи йоркшир були носіями даної аномалії, що являло собою значну економічну загрозу для ведення свинарства. Використання штучного запліднення і поширення породи фінський йоркшир на територіях інших країн призвело до появи дефекту ISTS в інших популяціях [2, 3].

Геном людини містить такий самий ген, що являється причиною чоловічого безпліддя. *KPL2* еволюційно старий ген і знаходиться в геномі всіх ссавців, включаючи людей [1, 2].

На сьогодні у відомих літературних джерелах немає даних щодо поліморфізму вище згаданого гену серед порід свиней, поширених на території України, як вітчизняних, так і закордонних. Тому аналіз розповсюдження даного дефекту у популяціях свиней є актуальним та має практичний інтерес.

Метою даної роботи було проведення молекулярно-генетичної оцінки розповсюдження дефектного алелю гену *KPL2* серед свиней порід вітчизняної та зарубіжної селекції.

**Матеріали і методи.** У досліджах були використані зразки проб крові та щетини свиней порід: велика біла англійської селекції (ВБА) – ПГ «Степной» Запорізької обл., українська велика біла внутріпородний тип 1 (УВБ1) – ДПДГ «Степне», Полтавський р-н Полтавської обл., українська велика біла внутріпородний тип 3 (УВБ3) – АФ СВК «Оржицька», Оржицький р-н Полтавської обл., червона білопояса – ТОВ «Україна-Т», Тростянецький р-н, Вінницька обл., миргородська – ДПДГ ПЗ ім. Декабристів, Миргородський р-н Полтавської обл., полтавська м'ясна – ПЗ «Біловодський», Луганська обл. та КЗ «Стрілецький» Луганська обл., ландрас – ТОВ «Хлібне», Лозівський р-н, Харківська обл. Виділення ДНК зі зразків проводили сольовим методом [4] та з використанням іонообмінної смоли Chelex-100 [5]. Генотипування здійснювали за допомогою метода полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який передбачав синтез ділянки гену, що аналізується [6]. Для ПЛР використовували праймери наступної структури:

*KPL2* Forward: 5' - GGCAATATCAAGGTCTTTCCA-3' [2].

*KPL2* Reverse: 5' - GCAGGAGAGGAGAATGACCA-3' [2].

Реакцію здійснювали за методикою, оптимізованою в лабораторії генетики Інституту свинарства та агропромислового виробництва НААН. Оптимізація полягала у підборі температури відпалу праймерів, необхідної кількості циклів ампліфікації та умов електрофоретичного визначення розмірів фрагментів ампліфікації.

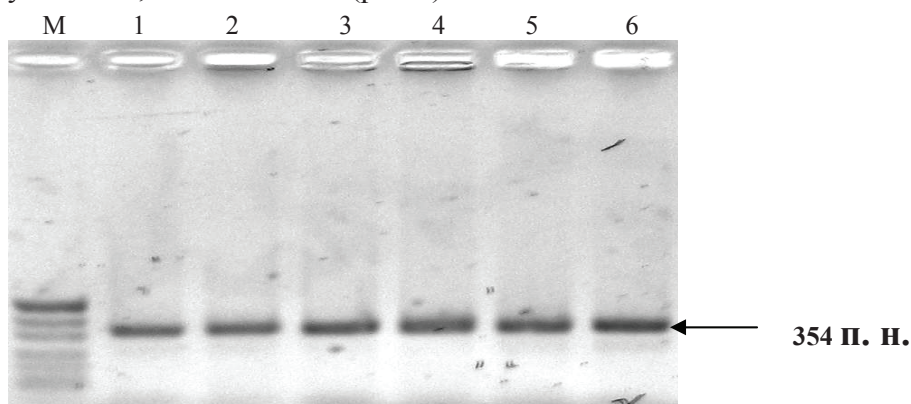
Реакцію проводили в 0,6-мл мікроцентрифужних пробірках на термоциклері «Терцик-2» виробництва «ДНК-технології» (Росія) в 25 мкл ПЛР-суміші: 2,5 мкл 10 кратного буфера (670 мМ Тріс – HCl, рН 8,8 за температури 25°C, 20 мМ БСА, 166 мМ амонію сірчаноокислого (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 мМ 2-β-меркаптоетанол), 1 мкл 2,5 мМ dNTP, по 0,5 мкл (0,1 опт. один.) кожного з праймерів, зразок ДНК свині – до кінцевої концентрації в суміші. 1 мкг/мл, 2-3 од. Тақ ДНК-полімерази (*Thermus aquaticus*), (реактиви – Helicon, Росія).

Програма ампліфікації ПЛР: 94°C – 3хв.; 36 цикл: 94°C – 30сек, 64°C – 45сек, 72°C – 45сек, 72°C – 10хв.

В результаті ПЛР гену *KPL2* при наявності інтронної інсерції синтезується фрагмент розміром 709 пар нуклеотидів (п. н.), при її відсутності – 354 п. н.

Продукти ампліфікації гену розділяли у 2% агарозному гелі згідно з методичними рекомендаціями [7].

**Результати та обговорення.** Генотипування тварин за геном *KPL2* проводили за результатами визначення розмірів фрагментів ампліфікації, молекулярну масу яких аналізували у порівнянні з маркером *pUC19/MspI*. Наявність мутації в гені *KPL2* визначається інсерцією, що детектується при електрофоретичному розділенні продуктів ампліфікації, мутантному алелю *m* відповідає фрагмент ампліфікації розміром 709 пар нуклеотидів (п.н.). Для генотипу *Mm* характерним є наявність на електрофореграмі двох фрагментів ДНК розміром у 709 п. н. та 354 п.н., для генотипу *MM* – наявність лише фрагменту у 354 п.н., *mm* – 709 п.н. (рис 1).



**Рис 1.** Електрофореграма продуктів ампліфікації гену *KPL2* у 2% агарозному гелі, 1-6 – тварини з генотипом *MM*, *M* – маркер молекулярної маси *pUC19/MspI*

В ході генотипування мікропопуляцій свиней за геном *KPL2*, було встановлено, що даний ген є мономорфним, а саме – всі досліджені тварини мали генотип *MM* (табл. 1).

**Генетико – популяційна характеристика досліджуваних порід свиней  
за геном *KPL2***

Породи свиней	Частоти алелів		Частоти генотипів			Гетерозиготність		F
	M	m	MM	Mm	mm	H <sub>0</sub>	H <sub>e</sub>	
УВБ-1 (n=50)	1,000	0,000	1,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 1,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	МОНОМОРФНІС		
УВБ-3 (n=50)	1,000	0,000	1,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 1,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>			
ВБА (n=50)	1,000	0,000	1,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 1,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>			
Полтавська м'ясна (n=80)	1,000	0,000	1,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 1,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>			
Червона білопояса (n=50)	1,000	0,000	1,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 1,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>			
Ландрас (n=50)	1,000	0,000	1,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 1,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>			
Миргородська (n=50)	1,000	0,000	1,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 1,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>	0,000 <sup>F<sub>0</sub></sup> 0,000 <sup>F<sub>e</sub></sup>			

*Примітка:* F – індекс фіксації Райта, F<sub>0</sub> – фактична частота генотипів, F<sub>e</sub> – очікувана частота генотипів, H<sub>0</sub> – фактична гетерозиготність, H<sub>e</sub> – очікувана гетерозиготність, F – індекс фіксації Райта

В результаті відсутності мутантного алелю m, не було виявлено і відповідних частот генотипів Mm та mm, як фактичних, так і очікуваних. Для даних тварин частота генотипу MM становила 1,000. При мономорфності досліджуваного гену також не було можливим встановити такі показники генетичної варіабельності як фактична та очікувана гетерозиготність, індекс фіксації Райта. Отже, всі протиповані тварини не мали дефекту ISTS.

Отримані результати досліджень співпадають з даними зарубіжних вчених, для порід велика біла та ландрас [8]. Аналогічні показники також були встановлені по породі дюрок [8] та синтетичній породі боді [9].

**Висновки.** Проведено генотипування свиней порід велика біла англійської селекції, українська велика біла внутрішньопорідний тип 1 і тип 3, червона білопояса, миргородська, полтавська м'ясна, ландрас за геном *KPL2*, в результаті якого не виявлено носіїв мутантного алелю, всі досліджені тварини мали генотип MM.

**Перспективи подальших досліджень.** У зв'язку з використанням штучного осіменіння постійно скорочується кількість виробників, отже, ступінь впливу кожного з них на генофонд стада значно збільшився, що сприяє поширенню можливих спадкових дефектів. Хоча серед досліджених порід не встановлено наявності дефектного (мутантного) алеля гену *KPL2*, існує доцільність вивчати свиней зарубіжного походження з метою недопущення поширення даного дефекту на вітчизняні популяції тварин. Також є сенс і в подальшому проводити моніторинг вітчизняних порід збільшивши вибірки тварин.

### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Anu Sironen An intronic insertion in KPL2 results in aberrant splicing and causes the immotile short-tail sperm defect in the pig / Anu Sironen, Bo Thomsen, Magnus Andersson, Virpi Ahola, Johanna Vilkki // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. vol. 103, № 13. – P.5006–5011
2. Anu Sironen, Infertile Finnish Yorkshire boars carry a full-length LINE-1 retrotransposon within the *KPL2* gene / Anu Sironen, Johanna Vilkki, Christian Bendixen, Bo Thomsen // *Mol Genet Genomics.* – 2007. – vol. 278. – P. 385–391

3. Исследование встречаемости дефектного аллеля *KPL2*, обуславливающего возникновение ISTS синдрома у свиней в России / Костюнина О.В., Харзинова В.Р., Быкова А.В., Зиновьева Н.А. // *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. – №12. – 2010. – С. 572-574

4. Соколов Б.П., Джемелинский В.В. Выделение высокомолекулярной эукариотической ДНК с использованием ацетата калия / Б.П. Соколов, В.В. Джемелинский // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 1989. – № 6. – С. 45-46.

5. Корінний С.М. Шерсть тварин, як зручний об'єкт виділення ДНК для аналізу за допомогою ПЛР / С.М. Корінний, К.Ф. Почерняев, В.М. Балацький // *Ветеринарна біотехнологія*. – Київ, 2005. – №7. – С. 80-83.

6. Глазко В.И. ДНК – технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих / В.И. Глазко, Е.В. Шульга, Т.Н. Дымань [и др.] / Белая Церковь, 2001. – 488 с.

7. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. / Под ред. Баева А.А.- М.: Мир. – 1984.- 479 с.

8. G.R. Ruan Genetic variation at *RYR1*, *IGF2*, *FUT1*, *MUC13*, and *KPL2* mutations affecting production traits in Chinese commercial pig breeds / G.R. Ruan, Y.Y. Xing, Y. Fan, R.M. Qiao, X.F. He, B. Yang, N.S. Ding, J. Ren, L.S. Huang, S. J. Xaio // *Czech J. Anim. Sci.* – 2013. – vol. 58 (2). – P. 65–70.

9. Сизарева Е. И. Изучение продуктивных особенностей и характеристика аллелофонда свиней породы Боди по ДНК-маркерам: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.02.07 /Сизарева Елена Ивановна. – Дубровицы – 2010. – 18 с.

**Рудоман Г.С., Балацкий В.Н.** Анализ присутствия мутантного аллеля гена *KPL2*, который обуславливает появления дефекта неподвижности сперматозоидов, у свиней разных пород.

*Представлены результаты генотипирования свиней пород крупная белая английской селекции, украинской крупной белой внутривидового типа 1и типа 3, красной белопопоясой, миргородской, полтавской мясной и ландрас по гену *KPL2*, который ассоциирован с дефектом неподвижности сперматозоидов с коротким хвостом. Оптимизована ПЦР технику определения *KPL2* генотипов, что позволило проводить популяционные исследования на больших выборках животных. Установлено, что данный ген в изученных породах мономорфный, все исследованные животные имеют генотип ММ, мутантный аллель гена *KPL2* не выявлен. Целесообразно проводить анализ свиней отечественной и зарубежной селекции с целью исключения появления и распространения данной мутации в популяциях животных.*

**G.S. Rudoman, V.N. Balatsky.** Analysis of the presence of the mutant allele of *KPL2* gene, which causes the defect of immotile sperm, in different pig breeds.

*The results are presented of genotyping pig breeds Large White of English selection, Large White of Ukrainian selection Type 1 and Type 3, Red White-Belt, Mirgorod, Poltava Meat and Landrace for gene *KPL2*, which is associated with the defect of immotile sperm with a short tail. PCR technique for determining the *KPL2* genotypes is optimized that allowed to carry out population studies. It was established that this gene is monomorphic for all tested animals, we found only homozygous genotype MM, the mutant allele of *KPL2* gene not found. There is a need to analyze the pigs of Ukrainian and foreign breeding in order to prevent the emergence and spread of the mutation in populations of animals.*