

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ПРОЛАКТИНОВОГО РЕЦЕПТОРА (*PRLR-AluI*), МАРКЕРА ПЛОДОВИТОСТИ СВИНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ HRM-АНАЛИЗА

***М. Е. Михайлова, кандидат биологических наук
Е. Л. Романишко, младший научный сотрудник
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»***

*Предложена технология HRM-анализа для определения полиморфизма *PRLR-AluI* в гене *PRLR* у свиней. Предлагаемый метод на основе технологии HRM может использоваться как экспресс-метод для массового скрининга животных на повышение многоплодия свиноматок.*

Технология HRM, ПЦР-ПДРФ, полиморфизм *PRLR-AluI*, аллели, свиноводство.

Одним из важнейших показателей эффективности селекционной работы является повышение многоплодия свиноматок. Однако, прямая селекция на плодовитость малоэффективна в силу низких коэффициентов наследования ($h=0,1-0,3$) [1]. В качестве одного из маркеров плодовитости свиней рассматривается ген рецептора пролактина (*PRLR*), который расположен на хромосоме 16 (SSC16). Ген *PRLR* детерминирует специфический рецептор гормона передней доли гипофиза – пролактина, который в организме млекопитающих участвует в регуляции роста, метаболизма и размножения [2].

Полиморфизм *PRLR-AluI* впервые обнаружен Vincent A.L в 1997 г. Также была выявлена взаимосвязь этого полиморфизма с количеством родившихся живыми поросят в трех генетических линиях [3], однако механизм влияния *PRLR* на плодовитость свиней остается неизвестным [4]. В настоящее время для определения полиморфизма *PRLR-AluI* используют традиционный метод анализа ПЦР-ПДРФ, который является достаточно затратным и трудоемким.

Цель исследования – разработка достоверного и недорогого экспресс-метода для определения полиморфизма *PRLR-AluI* с использованием технологии HRM.

Материалы и методы исследования. В работе в качестве объекта исследования были использованы особи свиней следующих пород: белорусской крупной белой, белорусской черно-пестрой, йоркшир, заводской тип породы йоркшир и ландрас. Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из цельной крови. Для выделения ДНК использовали набор реагентов «Нуклеосорб» («Праймтех», Беларусь). Была проанализирована выборка животных (n=158) по полиморфизму *pPRLR-Alul* гена пролактинового рецептора. Количество выделенной ДНК определяли с помощью Qubit® 2.0 Fluorometer. Для постановки ПЦР-РВ и проведения HRM-анализа геномная ДНК образцов была нормализована (концентрация 4 нг/мкл).

ПЦР-ПДРФ метод. Для амплификации фрагмента гена *PRLR* длиной 163 п.н. использованы прямой праймер 5'-CGTGGCTCCGTTTGAAGAACC-3' и обратный праймер 5'-CTGAAAGGAGTGCATAAAGCC-3' (Drogemuller С., 2001) [5]. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала деионизированную воду, 1×ПЦР буфер, 1.5 mM MgCl₂, 200 мкМ смеси dNTP, 300 нМ каждого праймера, 1.5 U Taq-полимеразы («Thermo scientific», Литва) и 50 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили на приборе C1000™ Thermal Cycler («Bio-Rad», США) при следующих условиях: +94 °С – 4 мин; 30 циклов: +95 °С – 30 с, +58 °С – 45с, +72 °С – 40 с; +72 °С – 5 мин. Рестрикция продуктов амплификации длилась в течение 6 часов при +37 °С с использованием рестриктазы *Alul* («Thermo scientific», Литва). Идентификацию полученных фрагментов проводили в 2% агарозном геле (SeaKem® LE) с использованием интеркалирующего красителя ZUBR Green-1 («Праймтех», Беларусь).

Секвенирование ДНК. Специфичные ПЦР-продукты изучаемого локуса гена *PRLR* очищали с помощью набора реагентов Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («Thermo scientific», Литва) согласно инструкции по применению. Для постановки секвенирующей ПЦР использовали Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Секвенирующую ПЦР проводили согласно следующим условиям: +96 °С – 1 мин; 25 циклов: +96 °С – 10 с, +50 °С – 5 с, +60 °С – 4 мин; +16 °С – 5 мин. ПЦР-продукты после секвенирующей ПЦР очищали переосаждением этанолом с Na₂ЭДТА. Определение нуклеотидной последовательности проводили на 3500 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

HRMA (High Resolution Melting Analysis). Образцы геномной ДНК животных (n=36) анализировали с использованием технологии HRM-анализа на приборе CFX96 («BioRad», США). Реакционная смесь в общем объеме 25 мкл содержала 1х ПЦР мастер-микс («Синтол», Россия) с интеркалирующим красителем EvaGreen, 500 нМ каждого праймера и по 20 нг ДНК каждого образца. Условия проведения амплификации: +95 °С – 5 мин.; 35 циклов: +95 °С – 10 с, +58 °С – 30 с, +72 °С – 15 с; +94 °С – 1 мин., +72 °С – 30 с; Melt Curve +72 °С – +95 °С: Increment =0,2 °С – 5 с. Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения для HRM-анализа Precision Melt Analysis™ software.

Пост-HRM секвенирование. После определения генотипов методом HRM были секвенированы по 4 образца из каждого кластера с генотипами AA, BB, AB. Полученные ПЦР-продукты после HRM-анализа очищали с помощью набора реагентов Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («Thermo scientific», Литва). Секвенирующую ПЦР ставили с использованием BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Определение нуклеотидной последовательности проводили на генетическом анализаторе 3500 («Applied Biosystems», США).

Результаты исследования. Выборка свиней исследована для определения полиморфизма *PRLR-AluI* методом ПЦР-ПДРФ. Данные о частотах встречаемости аллелей и генотипов представлены в таблице.

Генетическая структура выборок из популяций разных пород свиней по гену PRLR/AluI

Генотипы	Ландрас			Йоркшир			Белорусская крупная белая			Белорусская черно-пестрая			БЗТПИ		
	Ф	Т	X ²	Ф	Т	X ²	Ф	Т	X ²	Ф	Т	X ²	Ф	Т	X ²
AA	20	20,31	0,03	10	10,25	0,03	12	11,12	0,59	9	8,45	0,29	3	3,80	0,55
AB	25	24,38		20	19,49		10	11,77		8	9,10		11	9,40	
BB	7	7,31		9	9,26		4	3,11		3	2,45		5	5,80	
Аллели	Частоты аллелей ± Sp														
A	0,625±0,07			0,513±0,08			0,654±0,09			0,650±0,11			0,447±0,11		
B	0,375±0,07			0,487±0,08			0,346±0,09			0,350±0,11			0,553±0,11		

Примечание: Ф – фактическое количество особей, Т – теоретическое количество особей, X² – критерий хи квадрат, БЗТПИ – Белорусский заводской тип породы йоркшир.

Как видно из таблицы, не найдено существенных различий распределения частот аллелей по гену *pPRLR/AluI* у изученных пород свиней, что, возможно, связано с особенностями их разведения. Только у свиней белорусского заводского типа йоркшир частота встречаемости аллеля В была выше (0,553), чем частота аллеля А, в отличие от свиней породы йоркшир, ландрас, белорусская черно-пестрая. Все изученные популяции находились в состоянии генетического равновесия по закону Харди-Вайнберга.

Результаты ПЦР-ПДРФ-анализа получены с помощью системы гель-документирования Quantum ST4 («Vilber Lourman», Франция) и представлены на рис. 1.

После ПЦР-ПДРФ-анализа были отобраны 3 образца с различными генотипами: AA, AB и BB. Данные образцы были секвенированы для дальнейшего их использования в качестве контрольных образцов для HRM-анализа. Оценка и обработка данных проводились с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis, версия 5.4 (рис. 2).

По результатам секвенирования было выявлено, что полиморфизм *pPRLR/AluI* обусловлен миссенс мутацией G1789A (rs45435440), которая приводит к аминокислотной замене Gly597Ser (GenBank DQ157757).

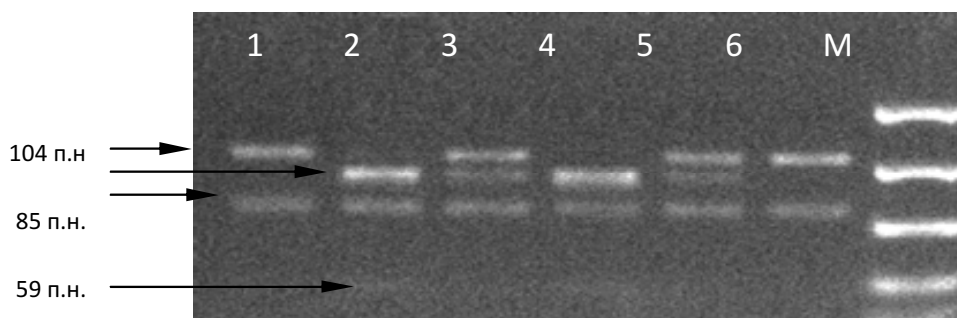


Рис.1. Определение полиморфизма *pPRLR/Alu1* методом ПЦР-ПДРФ
 Обозначения: М – маркер FastRulerUltra Low Range DNA Ladder, дорожки
 2, 4 – гомозиготный генотип AA (85 п.н.; 59 п.н.; 19 п.н); дорожки 3, 5 –
 гетерозиготный генотип АВ (104 п.н.; 85 п.н.; 59 п.н.; 19 п.н); дорожки 1, 6 –
 гомозиготный генотип ВВ (104 п.н.; 59 п.н.).

Из общей выборки исследованных животных были отобраны свиньи породы йоркшир (n=36) для определения полиморфизма *pPRLR/Alu1* методом ПЦР в реальном времени с использованием HRM-анализа. Анализ HRM был выполнен с помощью программного обеспечения Precision Melt Analysis с плавлением ПЦР продукта в температурном диапазоне от +72 °С до +95 °С, где изменение интенсивности флуоресценции происходило при каждом подъеме температуры на +0,2 °С в течение 5 с.

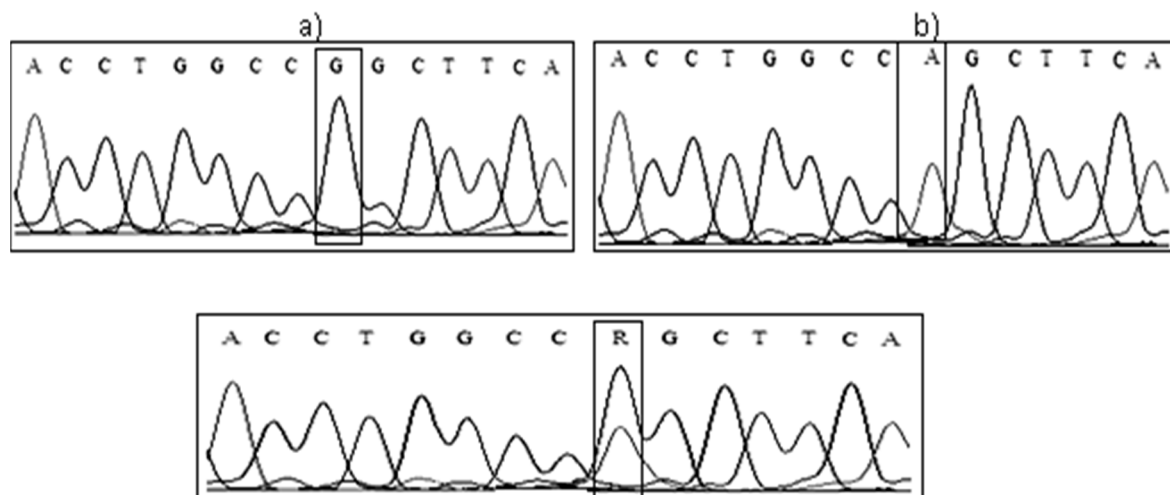


Рис. 2. Секвенирование образцов для выявления полиморфизма *pPRLR/Alu1* и определения генотипов AA (a), BB (b) и АВ (c)

Для определения генотипов по гену *pPRLR/Alu1* в исследуемых образцах использовали кривые плавления, образующие три четких кластера, соответствующие генотипам AA, BB и АВ. Деление на кластеры по результатам HRM анализа было подтверждено пост-HRM секвенированием, данные которого представлены справа на рис. 3.

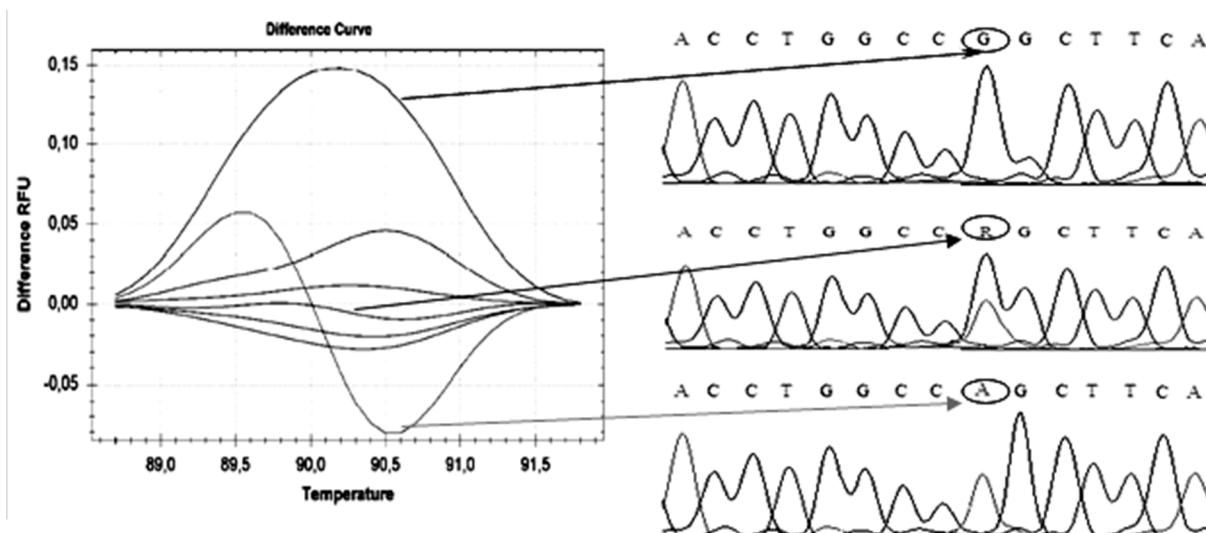


Рис. 3. Результаты HRM-анализа в программе Precision Melt Analysis™ software с результатами пост-HRM секвенирования

HRM-анализ более эффективен в сравнении с ПЦР-ПДРФ методом для определения полиморфизма *pPRLR/AluI*, поскольку анализ высокочувствительный, характеризуется низким риском контаминации, так как ПЦР и плавление продукта амплификации происходит в первой закрытой пробирке, результаты анализируются с помощью программного обеспечения, исключая этап электрофореза.

Выводы

Технология HRM-анализа характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, является быстрой по времени и недорогой по стоимости, что позволяет использовать ее как экспресс-метод для выявления полиморфизма *pPRLR/AluI* для массового скрининга животных в селекционно-племенной работе в свиноводстве.

Развитие молекулярно-генетических исследований и ДНК-технологий позволяет выявлять предпочтительные аллели и генотипы, что даст возможность прогнозировать развитие хозяйственно-полезных признаков у животных для быстрого введения в популяцию особей желаемого генотипа с целью повышения рентабельности производства свинины.

Список литературы

1. Лобан Н. А. Метод повышения продуктивных качеств свиней с использованием маркерных генов / Вісник аграрної науки Причорномор'я Вип. 3. – Т. 2, ч.1. – 2010. – С. 117–128.
2. Prolactin receptor maps to pig Chromosome 16 / Vincent A. L. [et al.] // Mammalian Genome. – 1997. – № 8. – P. 793–794.
3. A mutation in the prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs / Rothschild M.F. [et al.] // Animal Genetics. – 1998. – № 29. – P. 60–74.
4. Van Rens B. Piglet and placental traits at term in relation to the estrogen receptor genotype in gilts / Van Rens B., Van Der Lende T. // Theriogenology. – 2002. – № 57 (6). – P. 1651–1667.

5. Candidate gene markers for litter size in different German pig lines / C. Drogemuller, H. Hamann, O. Dist // *Jornal Animal Science*. – 2001. – № 79.– P. 65–70.

Запропоновано технологію HRM-аналізу для визначення поліморфізму PRLR-AluI у гені PRLR у свиней. Запропонований метод на основі технології HRM може бути використаний як експрес-метод для масового скринінгу тварин на підвищення багатоплідності свиноматок.

Технологія HRM, ПЦР ПДРФ, поліморфізм PRLR-AluI, алелі, свинарство.

In this study, for determining the PRLR-AluI polymorphism in the gene PRLR in pigs offered HRM-analysis technology. So the proposed method is based on the technology of HRM can be used as a rapid method for mass screening of animals.

Technology HRM, PCR-RFLP, polymorphism of PRLR-AluI, pig breeding.