

УДК 575.174.015.3;57.088

М. Е. МИХАЙЛОВА, Е. Л. РОМАНИШКО

ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА *ESR1-PvuII* ГЕНА ЭСТРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА У СВИНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПЦР–ПДРФ И ТЕХНОЛОГИИ HRM-АНАЛИЗА

(Представлено академиком Л. В. Хотылевой)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

Поступило 04.08.2014

Введение. Различия в продуктивности между отдельными животными, линиями и породами обусловлены, с одной стороны, средовыми, с другой – генетическими факторами. Большинство хозяйственно полезных признаков сельскохозяйственных животных относится к полигенным признакам, т. е. их количественный уровень генетически определяется целым рядом генов (локусов), разбросанных по всему геному. Такие локусы получили название локусов количественных признаков (QTLs, Quantitative Trait Loci's) [1]. Одним из перспективных направлений использования QTLs в животноводстве является молекулярно-генетический анализ генов-кандидатов, которые кодируют ключевые белки, ответственные за проявления признака.

Выявление молекулярных маркеров, влияющих на показатели воспроизводства на первом плане у молекулярных генетиков и селекционеров. Для управления селекционным процессом и ведения генетического мониторинга в свиноводстве значительный интерес представляет ген эстрогенового рецептора *ESR1*, который является ДНК-маркером плодовитости свиней [2].

Эстрогены – стероидные половые гормоны, способные регулировать рост, дифференцировку и функции в различных клетках и тканях млекопитающих. Проводниками гормональных сигналов являются эстрогеновые рецепторы (ESR), представленные в клетках-мишенях органов животных. В настоящее время широко известны два типа эстрогеновых рецепторов – *ESR1* и *ESR2*, которые являются транскрипционными факторами, имеющие центры связывания с регуляторными участками ДНК (промоторами, энхансерами). Гены *ESR* у свиньи локализованы на коротком плече 1-й хромосомы (SSC1) в регионе p.2.5–p.2.4 [3]. Ген *ESR1* получил наиболее широкое распространение в качестве маркера плодовитости свиней.

Для *ESR1-PvuII* полиморфизма выявлена ассоциация с репродуктивными качествами свиней породы крупная белая (масса гнезда при рождении, процент мертворожденных поросят и т. д.) [4]. Свиноматки с различными генотипами отличаются по воспроизводительным качествам. Установлено положительное влияние аллеля В на воспроизводительную функцию свиней, в частности, на многоплодие свиней английской крупной белой породы. Свиньи этой породы получили данный аллель от китайской многоплодной породы мэйшан в процессе ее создания в XIX в. с последующей передачей аллеля породам, созданным с участием крупной белой свиньи. В результате исследований установлено, что предпочтительным, с точки зрения селекции, является генотип ВВ. Превосходство по многоплодию маток составило 0,9 поросенка по сравнению с генотипом АА, а по размерам гнезда на 0,7–1,4 поросенка [5; 6].

В настоящее время для определения полиморфизма *ESR1-PvuII* используется традиционный метод анализа ПЦР–ПДРФ, который является достаточно длительным по времени и затратным.

Цель работы – разработка достоверного и недорогого экспресс-метода для определения полиморфизма *ESR1-PvuII* с использованием технологии HRM (High Resolution Melting) для массового скрининга животных, а также оценка его эффективности в сравнении с методом ПЦР–ПДРФ.

Материал и методы исследования. В работе в качестве объекта исследования были использованы свиньи белорусской крупной белой породы. Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из биологического материала – проб ткани (ушной выщип) и цельной крови. Для выделения ДНК использовали набор реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб» (Праймтех, Беларусь). Была проанализирована выборка животных ($n = 125$) по полиморфизму *ESR1-PvuII* гена эстрогенового рецептора. 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 постановки ПЦР-РВ и проведения HRM-анализа геномная ДНК образцов была нормализована (концентрация 4 нг/мкл).

ПЦР-ПДРФ метод. Для амплификации фрагмента гена *ESR1* длиной 120 п. н. использованы прямой праймер 5'-CCTGTTTTTACAGTGACTTTTACAGAG-3' и обратный праймер 5'-CACTTC-GAGGGTCAGTCCAAATTAG-3' (Short, 1997) [7]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала деионизированную воду, 1x 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 °C – 4 мин; 35 циклов: 94 °C – 30 с, 58 °C – 40 с, 72 °C – 40 с; 72 °C – 5 мин. Рестрикция продуктов амплификации длилась в течение ночи при 37 °C с использованием рестриктазы PvuII (Thermo scientific, Литва). Идентификацию фрагментов после рестрикционного анализа проводили в 4 %-ном агарозном геле (SeaKem® LE Agarose, Lonsa) с использованием интеркалирующего красителя ZUBR Green-1 (Праймтех, Беларусь) относительно маркера молекулярных масс DNA Ladder (Thermo scientific, Литва).

Секвенирование ДНК. Специфичные ПЦР-продукты изучаемого локуса гена *ESR1* вырезали из геля и очищали с помощью набора реагентов Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo scientific, Литва) согласно прилагаемой производителем инструкции по применению. Для постановки секвенирующей ПЦР использовали Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Секвенирующую ПЦР проводили согласно следующим условиям: 96 °C 1 мин; 25 циклов: 96 °C 10 с, 50 °C 5 с, 60 °C 4 мин; 16 °C 5 мин. ПЦР-продукты после секвенирующей ПЦР очищали от непрореагировавших флуоресцентно меченых терминаторных нуклеотидов переосаждением этанолом/Na₂ЭДТА. Определение нуклеотидной последовательности проводили на приборе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

HRMA (High Resolution Melting Analysis). Образцы геномной ДНК животных ($n = 51$) анализировали с использованием технологии HRM-анализа на приборе CFX96 (BioRad, США). Для амплификации фрагмента гена длиной 120 п. н. использованы те же праймеры, что и для ПЦР-ПДРФ анализа. Реакционная смесь в общем объеме 25 мкл содержала 1x ПЦР мастер-микс (Синтол, Россия) с интеркалирующим красителем EvaGreen, 500 нМ каждого праймера и по 20 нг ДНК каждого образца. Условия проведения амплификации и HRM-анализа были следующими: 95 °C – 5 мин; 35 циклов: 95 °C – 10 с, 63 °C – 30 с, 72 °C – 15 с; 94 °C – 1 мин, 72 °C – 30 с; Melt Curve 72 °C – 85 °C: Increment 0,2 °C – 5 с. Анализ результатов HRM-анализа проводили с помощью программного обеспечения Precision Melt Analysis™ software.

Пост-HRM секвенирование. После определения генотипов методом HRM по 4 образца из каждого кластера с генотипами AA, BB, AB были секвенированы. 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 и их обсуждение. Выборка свиней ($n = 125$) белорусской крупной белой породы исследована для определения полиморфизма *ESR1-PvuII* методом ПЦР-ПДРФ. 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 с целью дальнейшего использования их в качестве контрольных образцов для HRM-анализа. Оценка и обработка данных проводились с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis, версия 5.4 (рис. 2).

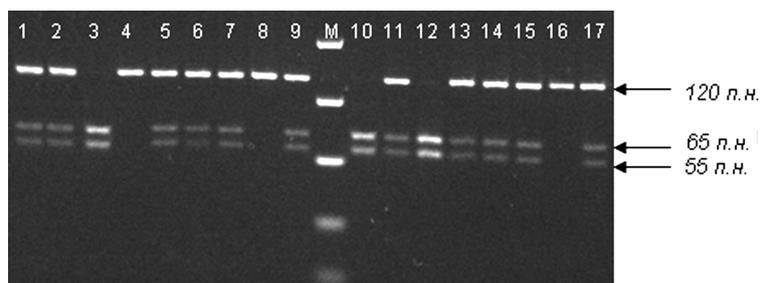


Рис. 1. Определение полиморфизма *ESRI-PvuII* методом ПЦР–ПДФ: М – маркер FastRulerUltra Low Range DNA Ladder; дорожки 8, 16 – гомозиготный генотип AA (120 п. н.); дорожки 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 17 – гетерозиготный генотип АВ (120 п. н., 65 п. н., 55 п. н.); дорожки 3, 10, 12 – гомозиготный генотип ВВ (65 п. н., 55 п. н.)

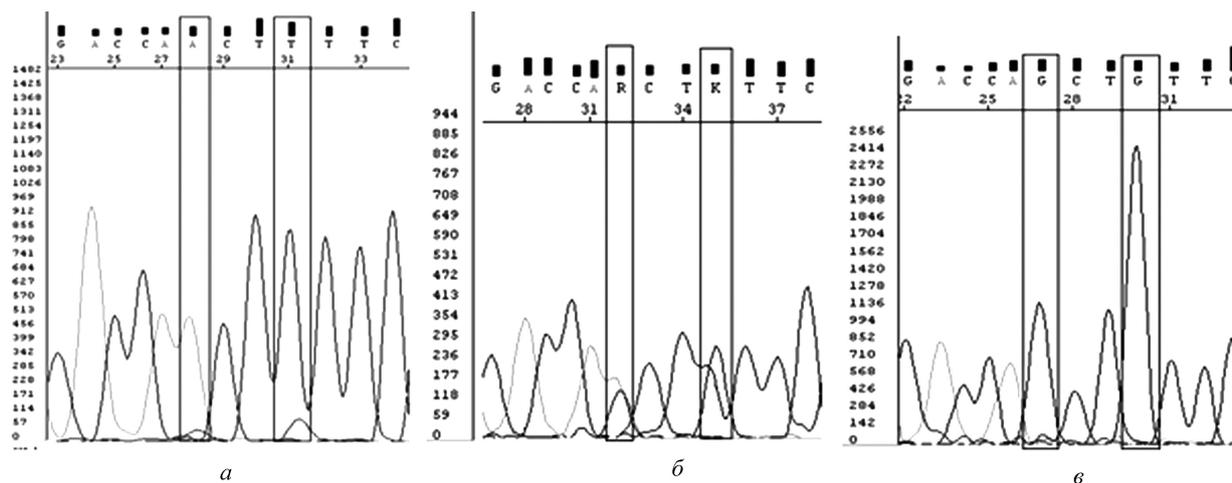


Рис. 2. Секвенирование образцов для выявления полиморфизма *ESRI-PvuII*: а – двойная гомозигота (генотип AA); б – двойная гетерозигота (генотип АВ); в – двойная гомозигота (генотип ВВ)

По результатам секвенирования было выявлено, что полиморфизм *ESRI-PvuII* включает две однонуклеотидные замены (SNP) 65A→G, 68T→G в 3 интроне гене *ESRI* (GenBank HF947272). Только наличие двух SNP дает сайт рестрикции для эндонуклеазы PvuII, что позволяет выявлять особей с генотипом ВВ.

Из общей выборки исследованных животных были отобраны свиньи белорусской крупной белой породы ($n = 51$) для определения полиморфизма *ESRI-PvuII* методом ПЦР в реальном времени с использованием HRM-анализа. Анализ HRM был выполнен с помощью программного обеспечения после амплификации специфичного продукта в режиме реального времени. Этот анализ состоял из одного цикла с ростом температуры от 72 до 85 °C, где изменения флуоресценции фиксировали при каждом подъеме температуры на 0,2 °C в течение 5 с.

Первая реакция амплификации на CFX96 была также проверена на наличие неспецифических продуктов на 4 %-ном агарозном геле.

Для определения генотипов в исследуемых образцах использовали кривые плавления (рис. 3). В результате исследуемые образцы образовывали три четких кластера, соответствующих генотипам AA, ВВ, АВ.

Деление на кластеры по результатам HRM-анализа было подтверждено пост-HRM секвенированием, данные которого представлены справа на рис. 4.

Плавление с высоким разрешением (High Resolution Melts, HRM) – это технология, используемая после проведения ПЦР в реальном времени, основана на определении различий в кривых плавления (диссоциации ДНК) с помощью специального программного обеспечения. HRM начинается с ПЦР-амплификации интересующей области в присутствии интеркалирующего красителя (SYTO® 9, EvaGreen®, SYBR Green I), который имеет интенсивную флуоресценцию при связывании с дцДНК и слабую флуоресценцию в свободном состоянии. Далее осуществляется

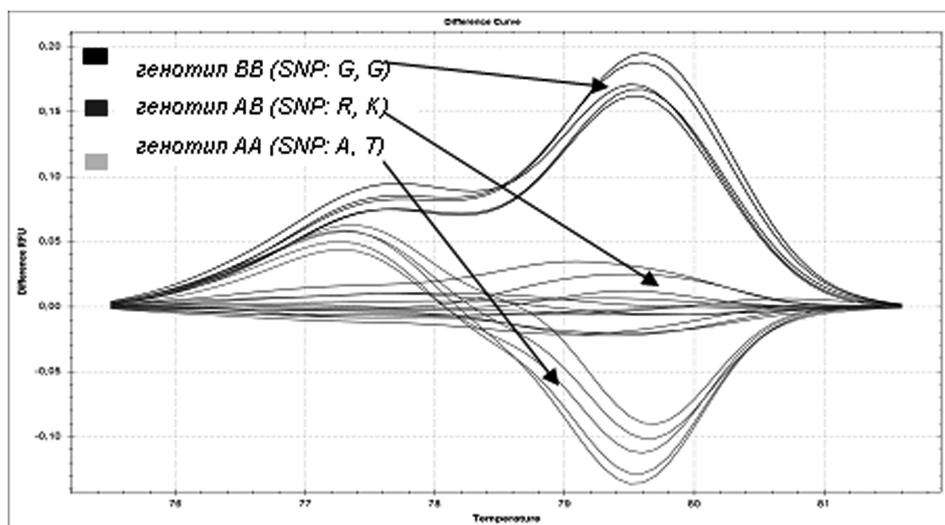


Рис. 3. Результаты HRM-анализа в программе Precision Melt Analysis™ software

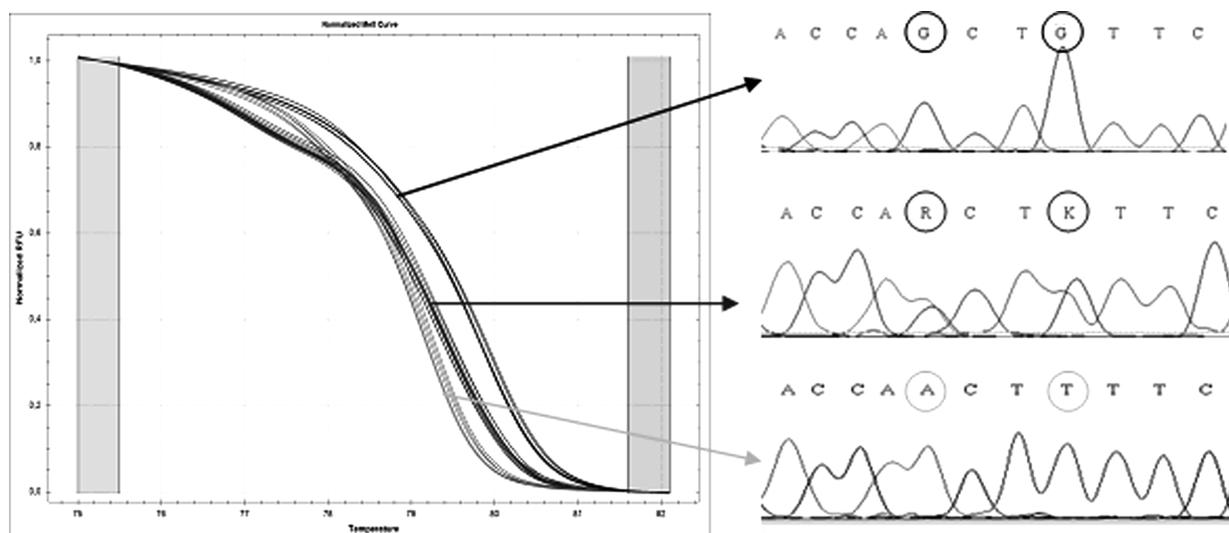


Рис. 4. Результаты пост-HRM секвенирования

плавление продукта: двойная спираль ДНК диссоциирует с высвобождением интеркалирующего красителя, что приводит к снижению уровня флуоресценции. Процесс изменения уровня флуоресценции в зависимости от температуры отслеживается с помощью специального программного обеспечения, которое преобразует полученные данные в виде графика кривой плавления. При изменении в структуре ДНК кривая плавления меняется. Эта разница может быть очень небольшой, в доли градуса, однако даже с помощью этой разницы можно выявлять однонуклеотидные замены (SNP), небольшие инсерции, делеции и метилирование ДНК.

HRM-анализом подтверждены генотипы животных по гену *ESR1*, выявленные методом ПЦР–ПДРФ. Эффективность HRM-анализа в сравнении с ПЦР–ПДРФ методом для определения полиморфизма *ESR1-PvuII* включает высокую чувствительность, низкий риск контаминации (ПЦР и плавление продукта амплификации происходит в 1 закрытой пробирке, с последующим анализом результатов с помощью компьютерного программного обеспечения, исключая этап электрофореза), воспроизводимые и точные результаты, минимальные временные затраты и низкую стоимость.

Заключение. 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 *ESR1-PvuII* для массового скрининга животных в селекционно-племенной работе в свиноводстве.

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

Литература

1. Эрнст Л. К., Зиновьева Н. А. Биотехнология в животноводстве. М., 2008. – 510 с.
2. Terman A., Kmiec M., Polasik D. // Arch. Tierz., Dummerstorf. 2006. N 49. P. 71–76.
3. Сметник А. А. // Проблемы репродукции. 2011. № 3. С. 31–37.
4. Munoz G., Ovilo C., Estelle J. // Genet. Sel. 2007. Vol. 39. P. 195–206.
5. Зиновьева Н. А., Гладырь Е. А., Эрнст Л. К., Брем Г. Введение в молекулярно-генную диагностику сельскохозяйственных животных. М., 2002. С. 68–70.
6. Шейко И. П., Лобан Н. А., Василюк О. Я., Драбинович Д. С. // Весці НАН Беларусі. Сер. аграрных навук. 2006. № 3. С. 77–81.
7. Short T. H., Rothschild M. F., Southwood O. I., McLaren D. G. // J. Animal Science. 1997. N 75. P. 3138–3142.

M. E. MIKHAILOVA, E. L. RAMANISHKA

M. Mikhailova@igc.bas-net.by, LenaRamanishko@mail.ru

EVALUATION OF THE POLYMORPHISM *ESR1-PVUII* OF THE ESTROGEN RECEPTOR GENE IN PIGS USING THE PCR–RFLP METHOD AND THE HRM-ANALYSIS TECHNOLOGY

Summary

The DNA typing for the estrogen receptor gene (*ESR1*) in pigs is proposed to carry out with the aid of the technology of the HRM-analysis (High Resolution Melting) and continue to use it as an express method for mass screening of breeding animals in order to increase the fertility and to improve the breeding animals process in the pig. Assessed polymorphism *ESR1-PvuII* of the estrogen receptor gene in the Belarusian large white pigs ($n = 51$) with the use of the HRM-analysis, which is highly sensitive and cost-effective as compared to the traditional PCR-RFLP method. The conditions for real-time PCR are worked out, the accuracy of identification of genotypes AA, BB, AB is confirmed, and the effectiveness of the HRM-method is also analyzed.