6.Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR – Based Typing from Forensic Material // BioTechniques. – 1991. - № 10. – P.506-9.
7. http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/.

Рудоман Г.С. Молекулярно-генетический мониторинг устойчивости свиней различных пород к энтеропатогенным штаммам бактерии Escherichia coli.
Представлены результаты ДНК-типирования свиней различных пород по локусу FUT1, который ассоциирован с устойчивостью животных к колибактериозу. Проведен молекулярно-генетический мониторинг резистентности к этому заболеванию. Определено распределение частот аллелей и генотипов, уровень гетерозиготности и фиксационный индекс. Имеющийся полиморфизм данного локуса позволяет проводить маркерную селекцию с целью создания генетически резистентных стад животных к кишечной инфекции.
Ключевые слова: локусы, генотип, аллели, фиксационный индекс, резистетность.

G.C. Rydoman. Molecylar genetical monitoring of the resistance of pigs of different breeds to enteropathogenic strains of bacterium Escherichia coli.
The results of DNA typing of pigs of different breeds for FUT1 locus which is assotiated with the resistance of animals to colibacteriosis are presented. Molecyla rgenetical monitoring of the resistance to this disease was performed. It has been determined the allocation of frequencies of alleles and genotypes, a heterozygosis level and a fixation index. The presence polymorphism of this locus afford the possibility to performed a marker selection with the aim of the creating of genetically resistant herds of animal to intestinal infection.

УДК 577.21; 636.082

Нор В.Ю., аспірант*
Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА ПОРІД СВИНЕЙ РІЗНОГО НАПРЯМКУ ПРОДУКТИВНОСТІ ЗА ГЕНОМ ПЕРИЛІПІНУ

Рецензент – кандидат біологічних наук В.М. Балацький

Представлено результати ДНК-типування свиней порід велика біла, миргородська та помісей велика біла×ландрас за поліморфними сайтами гену перилiпіну, що асоційовані з показниками середньодобового приросту та осаленості туш. Показана можливість проведення маркерної селекції на покращення відгодівельних і м'ясних якостей свиней за певними PLIN - генотипами.

Ключові слова: ДНК-типування, перилiпін, осаленість туш, маркерна селекція.

* *Науковий керівник: кандидат сільськогосподарських наук О.І. Метлицька*

Постановка проблеми. Періліпін (perylipin) – крапельнозвя'заний фосфопротеїн залучений у цикл протеїнкінази К, що викликає гормональну стимуляцію розщеплення жиру. Дослідження, які проводилися на щурах, мишах та людині показали, що періліпін експресується головним чином в адипоцитах [3], де відіграє важливу роль у регулюванні депонування триацилгліцеролу та гідролізі [4]; у стероїдогенних клітинах регулює розщеплення жиру ефірами холестерину - попередниками синтезу стероїдного гормону. Тварини, у яких експресія гену *PLIN* відсутня, характеризуються більш низькою масою тіла та меншою кількістю адипоцитів, мають вищий рівень експресії лептину і не схильні до ожиріння [6]. Зразки тканин, у яких вивчалася експресія свинячого *PLIN* гену, показали синтез його mRNA з найвищим рівнем у жировій, та нижчим в інших тканинах (печінка, нирки, серце, м'язи, легені, селезінка, підшлункова залоза, кишковик, мозок, шлунок) [5]. З вищенаведених фактів, ген *PLIN* можна розглядати як кандидатний для ознаки жировідкладення у свиней.

Окремі поліморфізми кодуючої послідовності гену свинячого періліпіну асоційовані з такими показниками як середньодобовий приріст, товщина шпику та вміст пісного м'яса в туші. У екзонних ділянках ідентифіковано вісім однонуклеотидних замін, сім з яких – мовчазні мутації і одна (у екзоні 2) несинонімічна мутація, що призводить до заміни амінокислоти валін на ізолейцин у положенні 3 (p. Val3Ile). Дві точкові заміни: *PLIN1* (g.4119A>G) та *PLIN2* (g.7966T>C) ми обрали для свого дослідження [7].

Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. Встановлений вірогідний зв'язок генотипу AG за поліморфним сайтом *PLIN1* із зниженою товщиною шпику свиней порід ландрас та велика біла, тварини генотипу AA – характеризуються збільшеними середньодобовими приростами; за сайтом *PLIN2* – особини генотипу GG характеризуються небажаною осаленістю туш при відгодівлі. Таким чином, найбільш бажаними гаплотипами при селекції на м'ясність і швидкість росту свиней зазначених вище порід є: для збільшення середньодобового приросту – AATT, для отримання пісного м'яса в туші із зменшеною товщиною шпику – AGTC. Не бажаними для відбору є тварини з гаплотипом GGCC [4].

Визначення генотипів батьківських форм за локусами *PLIN* гену, не виключно, дозволить зменшити витрати галузі свинарства за рахунок добору тварин, які є носіями бажаних алелей гену *PLIN*.

Мета досліджень та методика їх проведення. Опрацювати та оптимізувати умови ПЛР-аналізу фрагментів гену періліпіну, що містять сайти поліморфізму *PLIN1* та *PLIN2*. Оцінити можливість проведення маркерної селекції на підвищення м'ясності туш та збільшення середньодобових приростів у свиней вітчизняних порід.

Зразки крові були відібрані від свиней порід велика біла (АФ СВК «Оржицька», Оржицький р-н Полтавської обл., ДПДГ «Степне», Полтавський р-н Полтавської обл., ПАФ «Україна», Великобагачанський р-н, Полтавська обл., ТОВ «Маяк» Котелевський р-н Полтавської обл.), миргородська (ДПДГ ПЗ ім. Декабристів, Миргородський р-н Полтавської обл.) та помісних тварин велика біла×ландрас (ТОВ НВП «Глобинський свинокомплекс», Глобинський р-н Полтавської обл.) на станції контрольної відгодівлі Інституту свинарства і АПВ НААН.

Виділення ДНК з біоматеріалу проводили за допомогою реагенту Chelex-100 [2]. Для ДНК-типування за локусами *PLIN1* та *PLIN2* використовували метод ПЛР-ПДРФ [1]. ПЛР проводили у стандартній реакційній суміші (Tapotili, Росія) на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технология», Росія) за програмою: 95ºС – 2 хв; 30 цикл.: 95 ºС – 20 с; 58 ºС – 20 с; 68 ºС – 20 с; 68 ºС – 7 хв для локусу *PLIN1* та 95ºС – 2 хв; 30 цикл.: 95 ºС – 20 с; 64 ºС – 20 с; 68 ºС – 20 с; 68 ºС – 7 хв для локусу *PLIN2*.

Структура праймерів:

PLIN1 – Forward: 5' - CCA GAA GAC CTA CAC CAG CAC - 3'

PLIN1 – Reverse: 5' - TCT GGA TGC CCT TCT CGT AA - 3'

PLIN2 – Forward: 5' - GAT CTG CTC TCC TTC CCT CC - 3'

PLIN2 – Reverse: 5' - CTG TTT CAG AGC GCG AGA C - 3'

У результаті ПЛР синтезується фрагмент локусу *PLIN1* розміром 80 п.н., який гідролізували ендонуклеазою *Hin1I* та фрагмент локусу *PLIN2* розміром 175 п.н., що піддавали обробці рестриктазою *Nla*IV згідно рекомендацій виробника (Fermentas, Литва). У результаті гідролізу отримували фрагменти ДНК, які відповідають певним генотипам (табл. 1).

1. Фрагменти рестрикції і відповідні їм генотипи за локусами PLIN1 та PLIN2

Локус/фермент рестрикції	Генотипи і відповідні фрагменти рестрикції, п.н.		
PLIN1 / *Hin*1I	AA: 80	AG: 80, 44, 36	GG: 44, 36
PLIN2 / *Nla*IV	TT: 175	CT: 175, 115, 60	CC: 115, 60

Аналіз фрагментів рестрикції виконували за допомогою електрофорезу у 8% поліакриламідному гелі за використанням маркерів молекулярної маси (*pBR322/BsuR1)*. Візуалізацію проводили шляхом фарбування поліакриламідного гелю розчином бромистого етидію в ультрафіолетовому світлі на трансілюмінаторі. Фотодокументацію гелів здійснювали цифровим фотоапаратом «Canon».

Статистичну обробку даних проводили за допомогою стандартної комп'ютерної програми GenAlex 6.0.

Результати досліджень. Оптимізовано методику генотипування свиней за локусами *PLIN1* та *PLIN2* шляхом підбору умов ампліфікації, рестриктного аналізу та електрофоретичного розділення продуктів рестрикції. На рисунку представлені фрагменти продуктів рестрикції, які відповідають різним генотипам за досліджуваними локусами.

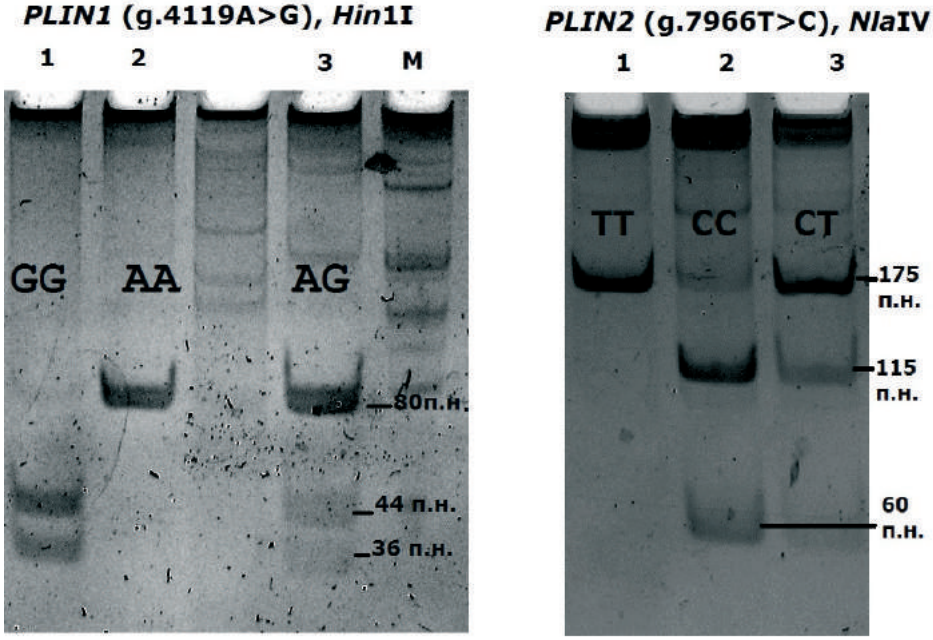

Рис. Електрофорез у 8% поліакриламідному гелі продуктів Hin1I, NlaIV рестрикції фрагментів локусів PLIN1 та PLIN2 ампліфікованих у ПЛР: 1-3. ДНК свиней, М. маркер молекулярної маси (pBR322/BsuR1)

У таблиці 2 наведені основні генетико-популяційні параметри порід велика біла, миргородська та помісей велика біла×ландрас за локусами *PLIN1* та *PLIN2*. Всі досліджені популяції свиней мають високий рівень генетичного поліморфізму за обома локусами, що створює можливості для проведення селекції.

2. Генетико-популяційна характеристика свиней за локусами PLIN1 та PLIN2

Популяція свиней	Частоти алелей		Частоти генотипів			Гетерозиготність		Фіксаційний індекс
Велика біла порода	***PLIN1* (g.4119A>G)**							
	A	G	AA	AG	GG	H_o	H_e	F
	0,413	0,587	0,171	0,485	0,345***	0,217	0,485	0,552
	***PLIN2* (g.7966T>C)**							
	C	T	CC	CT	TT	H_o	H_e	F
	0,620	0,380	0,384	0,471	0,145	0,283	0,471	0,401
Помісі велика біла×ландрас	***PLIN1* (g.4119A>G)**							
	A	G	AA	AG	GG	H_o	H_e	F
	0,727	0,273	0,529	0,397	0,074**	0,545	0,397	-0,375
	***PLIN2* (g.7966T>C)**							
	C	T	CC	CT	TT	H_o	H_e	F
	0,773	0,227	0,597	0,351	0,052	0,273	0,351	0,224
Миргородська порода	***PLIN1* (g.4119A>G)**							
	A	G	AA	AG	GG	H_o	H_e	F
	0,591	0,409	0,349	0,483	0,167	0,455	0,483	0,060
	***PLIN2* (g.7966T>C)**							
	C	T	CC	CT	TT	H_o	H_e	F
	0,591	0,409	0,349	0,483	0,167*	0,818	0,483	-0,692

*Примітка: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (за критерієм хі-квадрат).*

Розподіл частот алелей за локусом *PLIN1* у трьох досліджених популяціях суттєво відрізнявся. Так, популяція свиней великої білої породи більш насичена алелем G (0,587), тоді як тварини миргородської породи є переважно носіями алелю A (0,591), частка алелю G (0,273) у помісних тварин помітно менша, ніж у тварин інших двох досліджених популяцій, що може бути пов'язано із впливом на генетичну структуру помісних тварин кнурів спеціалізованої м'ясної породи ландрас та ефектом міжпородного гетерозису. Аналізуючи характер розподілу частот алелей за локусом *PLIN2* показано, що популяції свиней великої білої породи та помісних тварин характеризуються високою частотою алеля C (0,620 та 0,773), в той час як розподіл частот алелей серед тварин миргородської породи є майже однаковим (C - 0,591, T - 0,409), що, очевидно, пов'язано із сальним напрямком продуктивності породи.

У популяціях свиней великої білої породи та помісей велика біла×ландрас за локусом *PLIN1* і у тварин миргородської породи за локусом *PLIN2* виявлено достовірні відхилення фактичного розподілу генотипів від очікуваного значення за Харді-Вайнбергом. Показано, що частка небажаних гаплотипів GGTT найнижча у популяції помісних свиней (GG - 0,074, TT - 0,052). У тварин породи велика біла (P<0.001) частота генотипу GG (0,345) виявилася найвищою серед усіх досліджених популяцій. Значна перевага очікуваної гетерозиготності (H_e) над фактичною (H_o) у об'єднаній виборці свиней великої білої породи свідчить про неоднорідність та відсутність консолідованості великої білої породи в цілому, що створює сприятливі умови для проведення селекційних заходів у окремих господарствах на основі генетичної гетерогенності породи. У свиней миргородської породи та помісних тварин знайдені суттєві міжлокусні відмінності у показниках фактичної і очікуваної гетерозиготності в межах однієї популяції, що очевидно є наслідком нерівноваги за зчепленням цих локусів відносно генів кількісних ознак.

Висновки. Оптимізовано техніку ДНК-типування свиней в ПЛР за полімерними сайтами гену периліпіну *PLIN1* та *PLIN2*. Показана перспективність проведення маркерної селекції для підвищення середньодобових приростів та м'ясності у свиней великої білої і миргородської породи на чистопородній основі, завдяки високому рівню генетичного поліморфізму досліджуваних локусів периліпіну у цих популяціях.

БІБЛІОГРАФІЯ

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

2. СОУ 85.2-37-206:2004 Методи виділення ДНК із біопроб за допомогою гуанідінізотіоціонату та реагенту "Chelex-100" для проведення полімеразної ланцюгової реакції.

3. Egan J.J. Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and β-adrenergic stimulation / Egan J.J., Greenberg A.S., Chang M.-K., Londos C // The Journal of Biological Chemistry. – 1990. – №265. – P. 18769–18775.

4. Souza S.C. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor α to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes / Souza S.C., de Vargas L.M., Yamamoto M.T., Lien P., Franciosa M.D., Moss L.G., Greenberg A.S // The Journal of Biological Chemistry. – 1998. – №273. – P. 24665–24669.

5. Tao X. Cloning, chromosome mapping and expression pattern of porcine *PLIN* and *M6PRBP1* genes / Tao X., Jihong Y., Li G., Bin F., Yi Z., Xiaodong C., Peichao Z., Yang Z // Genetics Selection Evolution. – 2008. – №40. – P. 215–226.

6. Yan W. Polymorphisms in *PLIN* and hypertension combined with obesity and lipid profiles in Han Chinese / Yan W., Chen S., Huang J., Shen Y., Qiang B., Gu D // Obesity Research. – 2004. –№12. – P. 1733–1737.

7. Z. Vykoukalova. Porcine *perilipin* (*PLIN*) gene: Structure, polymorphism and association study in Large White pigs / Z. Vykoukalova, A. Knoll1, S. Čepica // Czech J. Anim. Sci. – 2009. – №54(8). – P. 359–364.

Нор В.Ю. Генетическая структура пород свиней разного направления продуктивности по гену перилипина.

Представлены результаты ДНК-типирования свиней пород крупная белая, миргородская и помисей крупная белая ×ландрас по полиморфным сайтам гена перилипина, ассоциированных с показателями среднесуточных привесов и осаленности туш. Показана возможность проведения маркерной селекции на улучшение откормочных и мясных качеств свиней по определённым PLIN - генотипами.

Ключевые слова: ДНК-типирование перилипин, осаленность туш, маркерная селекция.

V.Yu. Nor. The genetic structure of pig breeds of a different direction of the productivity on polymorphic site perylipin.

It is the results of DNA typing of the Large White and the Myrgorod breeds of pigs and crosses the Large White ×Landrace, on polymorphic site of gene perylipin which are associated with indexes of on average daily gain and a backfat carcasses. The possibility of marker selection to improve fattening and meat qualities of pigs for certain PLIN - genotypes.