DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-7-1
УДК 636.082.2

Изучение частот однонуклеотидного полиморфизма Ser638Arg гена CAST у свиней кросса PIC

Соколова Е.А.
Sokolova E.A.

Соколова Е.А.,¹ канд. биол. наук, младший научный сотрудник лаборатории фармакогеномики
Филипенко М.Л.,¹ кандидат биологических наук, заведующий лаборатории фармакогеномики
Воронина Е.Н.,¹ канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории фармакогеномики
Барсукова М.А.,³ канд. биол. наук, доцент каф. разведения, кормления и частной зоотехнии
Донченко Н.А.,² чл. корр. РАН, руководитель Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
Афонюшкин В.Н.,^{2,1} канд. биол. наук, зав. сектором молекулярной биологии
Шеманаев С. А.,⁴ технический специалист

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки сибирский федеральный центр агробиотехнологий РАН

³ФБГОУ ВО "Новосибирский государственный аграрный университет"

⁴АО "Хювефарма"

Ключевые слова: кальпастатин, однонуклеотидный полиморфизм, аллельспецифичная ПЦР.

Резюме. Ген CAST (кальпастатина) считается ответственным за инициацию деградации миофибриллярного белка, что может существенно влиять на качественные показатели продуктов убоя. В наших исследованиях была протестирована группа финальных гибридов свиней, полученных на основе мясных пород, в том числе с использованием генотипов пород пьетрен и ландрас. Определяли полиморфизм гена CAST Ser638Arg у 83 голов молодняка. Материалом для исследования послужили образцы крови от 83 поросят на дорастивании одного из свиноплодков Европейской части РФ. В пробирки с ЭДТА из хвостовой вены были отобраны пробы крови, для дальнейшего выделения ДНК. На основе выравнивания нуклеотидных последовательностей изучаемого гена (GenBank) была сконструирована система праймеров и двух зондов, позволяющая отличить аллельные варианты А и С гена CAST, обуславливающие аминокислотную замену в положении 638. В ходе исследования были выявлены А и С аллели, с соответствующей частотой 0,78 и 0,22. Было установлено, что в исследуемой группе животных присутствуют два генотипа А/А и А/С, при этом генотип С/С выявлен не был. Неравномерность распределения генотипов указывает на подверженность аллеля С факторам отбора. Отсутствие гомозиготных особей по аллелю С полиморфизма Ser638Arg гена CAST у свиней кросса PIC позволяет считать что животные с этим генотипом подвергаются действию отбора при существующих условиях содержания и инфекционного неблагополучия.

Study of the frequencies of the single-nucleotide polymorphism Ser638Arg of the CAST gene in pigs of the crossbred PIC

Sokolova E.A.,¹ Junior Researcher, Laboratory of Pharmacogenomics

Filipenko M.L.,¹ candidate of biological sciences, head of the laboratory of pharmacogenomics

Voronina E.N.,¹ candidate of biological sciences, Researcher, Laboratory of Pharmacogenomics

Barsukova M.A.,³ candidate of biol. Sciences, Associate Professor breeding feeding and private zootechnics

Donchenko N.A.,² tsp correspondent RAS, head of the Institute of Experimental Veterinary Medicine of Siberia and the Far East

Afonyushkin V.N.,^{2,1} cand. biol. sciences, head. sector of molecular biology

Shemanaev S.A.,⁴ technical specialist

1- Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS.

2- Federal State Budgetary Institution of Science Siberian Federal Center for Agrobiotechnology RAS

3- FBGOU VO "Novosibirsk State Agrarian University "

4-Inc "Huvepharma"

Key words: calpastatin, single nucleotide polymorphism, allele-specific PCR.

Abstract. The CAST (calpastatin) gene is considered responsible for the initiation of degradation of myofibrillar protein, which can significantly affect the quality of slaughter products. In our studies, we tested a group of crossbred of pigs obtained on the basis of meat breeds, including using the genotypes of the Pietrain and Landrace breeds. The CAST Ser638Arg gene polymorphism was determined in 83 young animals. Blood samples from 83 piglets in the rearing of one of the pig farms of the European part of the Russian Federation served as material for the study. Blood samples were taken from the tail vein into EDTA tubes for further DNA isolation. Based on the alignment of the nucleotide sequences of the studied gene (GenBank), a system of primers and two probes was designed to distinguish between the allelic variants A and C of the CAST gene, which determine the amino acid substitution at position 638. During the study, A and C alleles were identified, with a corresponding frequency of 0.78 and 0.22. It was found that in the studied group of animals there are two genotypes A / A and A / C, while the C / C genotype was not identified. The uneven distribution of genotypes indicates the susceptibility of the C allele to selection factors. The absence of homozygous individuals for the CAST polymorphism Ser638Arg of the CAST gene in pigs of the PIC cross allows us to assume that animals with this genotype are subjected to selection under existing conditions of maintenance and infectious situation.

ющей частотой 0,78 и 0,22. Было установлено, что в исследуемой группе животных присутствуют два генотипа А/А и А/С, при этом генотип С/С выявлен не был. Неравномерность распределения генотипов указывает на подверженность аллеля С факторам отбора. Отсутствие гомозиготных особей по аллелю С полиморфизма Ser638Arg гена CAST у свиней кросса PIC позволяет считать что животные с этим генотипом подвергаются действию отбора при существующих условиях содержания и инфекционного неблагополучия.

Для цитирования / For citation

Изучение частот однонуклеотидного полиморфизма Ser638Arg гена CAST у свиней кросса PIC / Соколова Е.А. [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2019. - №7. – С. 6–8.

Study of the frequencies of the single-nucleotide polymorphism Ser638Arg of the CAST gene in pigs of the crossbred PIC / Sokolova E.A. [et al.] // Veterinaria I kormlenie – M., 2019. – Vol.7. – P. 6-8.

Достижения современной молекулярной генетики позволяют исследовать гены, связанные с хозяйственно полезными признаками сельскохозяйственных животных. Определение аллельных вариантов генов позволит дополнительно к традиционному отбору животных проводить селекцию непосредственно на уровне ДНК. Преимущество ДНК-анализа заключается в том, что можно определить генотип животного независимо от пола, возраста и физиологического состояния, что является важным фактором в селекционной работе [4, 8].

Интенсивное производство свинины в настоящее время требует использования специализированных мясных пород и линий свиней, отселекционированных на высокую скорость роста и низкое содержание жировой ткани в тушах. В то же время известно, что для пород мясного направления характерно значительное снижение качества мяса, в том числе и ассоциированного с синдромом PSE [1.]. Точечная мутация 1843 С-Т (замена аргинина на цистеин в позиции 615) в гене рианоинового рецептора (RYR1) [7] связана с синдромом злокачественной гипертермии и является маркером стресс-чувствительности свиней. Доля гомо- и гетерозиготных носителей мутантного гена в породе ландрас достигает 64 %, в породе пьетрен – 84,6%, при этом доля гомозигот генотипа n/n в породе пьетрен достигает 73%, в то время как в крупной белой – только 2,5% [4], в то время как в аборигенных и локальных породах свиней, а также популяциях дикого кабана мутантный аллель Т практически не фиксируется [3, 2].

В исследовании Рубарчук с соавт. была выдвинута гипотеза о влиянии генов RYR и CAST на качество мяса у свиней породы пьетрен, являющейся основой для промышленного скрещивания [6]. Ген CAST (кальпластатина) считается ответственным за инициацию деградации миофибриллярного белка, что может существенно влиять на качественные показатели продуктов убоя. В данных литературы нет указаний на связь полиморфизма гена CAST с продуктивными качествами животных [5], однако распределение частот генотипов в группах животных позволяет предположить влияние косвенного отбора на частоты генотипов.

Цель исследования: изучить частоту полиморфизма Ser638Arg гена CAST у свиней кросса PIC.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы крови от 83 поросят на дорастивании одного из свинок-комплексов Европейской части РФ. В пробирки с ЭДТА из хвостовой вены были отобраны пробы крови, для дальнейшего выделения ДНК при помощи набора "ДНК Сорб В".

Компьютерный подбор праймеров делали с использованием программы UGENE с последующей проверкой на гомологию с неспецифической ДНК в программе BLAST, оценкой вторичной структуры ампликонов с использованием алгоритма MFold.

На основе выравнивания нуклеотидных последовательностей изучаемого гена (GenBank), была сконструирована система праймеров и двух зондов, позволяющая отличить аллельные варианты А и С гена CAST, обуславливающие аминокислотную замену в положении 638. Структуры праймеров и зондов:

CAST.S638-U 5'-AAGATCCCATTGATGCCCTCTC-3'
CAST.S638-R 5'-TGTTCTCTGAGGTTTCTGTAGTTG-3'
CAST.S638-PA 5'-HEX-TGGACATCTGTCAAAATCCC-BHQ-3'
CAST.S638-PC 5'-FAM-TGGACAGCTGTCAAAATCCC-BHQ-3'

ПЦР в режиме реального времени с Taqman зондом проводили на реалтайм-амплификаторе «CFX» (BioRad). ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл, содержащем 67 мМ трис-НCl (pH 8,9), 16 мМ сульфат аммония; 2,4 мМ MgCl₂; 0,01% Твин 20; 0,2 мМ дНТФ; 0,5 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров, 1х, Taq-ДНК полимеразы 1–2 ед.

Частоту встречаемости генотипов определяли по формуле Г.Н. Шангина-Березовского (1983).

$P = n/N$

P – частота определения генотипа

n – количество особей, имеющих определенный генотип

N – общее число особей

Для получения основных показателей внутривидовой изменчивости использовали надстройку для MS Excel – GenAIEx (Peakall and Smouse, 2012).

Частоту встречаемости аллелей определяли по формуле

$$P = \frac{AA + \frac{AB}{2}}{N}$$

где AA – число гомозигот по исследуемому аллелю,

AB – число гетерозигот

N – объем выборки

Результаты собственных исследований

В наших исследованиях была протестирована группа финальных гибридов свиней, полученных на основе мясных пород, в том числе с использованием генотипов пород пьетрен и ландрас. Определялся полиморфизм гена CAST Ser638Arg у 83 голов молодняка.

В ходе исследования были выявлены А и С аллели, с соответствующей частотой 0,78 и 0,22. Было установлено, что в исследуемой группе животных присутствуют два генотипа А/А и А/С, при этом генотип С/С определен не был (Таблица).

Частота гомозиготного генотипа А/А составила 0,57, гетерозиготного А/С – 0,43 соответственно. Подобное распределение генотипов в группе животных, содержащихся в технологически неблагоприятных условиях и полученных от жестко селекционируемых родителей, позволяет предположить, что, не смотря на циркуляцию в популяции мутантного аллеля С, определяемого с достаточно высокой частотой 0,22, животные с генотипом С/С тем или иным образом подвергаются действию отбора на раннем этапе развития. Литературные данные позволяют предположить, что в более благополучных популяциях животные носители генотипа С/С выживают (частота генотипа С/С – 0,70), однако неравномерность распределения генотипов указывает на подверженность аллеля С факторам отбора. Ассоциированность гена CAST с геном RYR позволяет предположить, что на его полиморфизм в популяциях действуют сходные факторы, включая факторы среды.

Заключение

Отсутствие гомозиготных особей по аллелю С полиморфизма гена CAST Ser638Arg у свиней кросса PIC позволяет считать что животные с этим генотипом подвергаются действию отбора при существующих условиях содержания и инфекционного неблагополучия.

Работа выполнена при частичной поддержке проекта КР ФНИ СО РАН II.1 (ГЗ № 0309-2018-0018) «Новые подходы высокопроизводительного типирования структурных вариантов ДНК для селекционных исследований и разведения крупного рогатого скота, свиней и кур».

Литература

1. Бажов Г.М. Технологическая характеристика свинины с пороками PSE и DFD/ Бажов Г.М., Крыштол Е.А., Баранников А.И.// Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2013. - №85. С.1-12.
2. Зиновьева Н.А. Полиморфизм генов, ассоциированных с локусами количественных признаков, у кабана (*Sus scrofa* L., 1758), обитающего на территории России/ Зиновьева Н.А., Костюнина О.В., Экономов А.В. и др.// Сельскохозяйственная биология, 2013. - №2. - С.77-81.
3. Князев С.П. Проблемы дискордантности и ко-сегрегации экспрессии галотан-чувствительности свиней с мутацией 1843 С-Т в локу-

Таблица. Частоты генотипов А и С, % / **Table.** Frequencies of genotypes A and C, %

	A/C	A/A	C/C	χ^2
Наблюдаемые частоты генотипов	0.4337	0.5662	0	6,364
Ожидаемые частоты генотипов при распределении по Харди-Вайнбергу	0.3397	0.61323	0.04578	(P=0.0116)

се RYR1 рецептора рианодина /Князев С.П., Жучаев К.В., Гарт В.В. и др.// Генетика. - 1998. - Т. 34. - №12. - С. 1648-1654.

4. Bauerova M. Detection of malignant hyperthermia in pigs by PCR-RFLP analysis using plucked hair as a source of DNA /Bauerova M., Vasicek D., Uhrin P. et al.// Zivocisna vyroba/ - 1995. - Vol. 40. - №4. - P. 145-147.

5. Vehovsky K. Effect of the Ser638Arg variation in the cast gene and causal SNP g.1843C>T in the RYR1 gene on carcass traits in crossbreed pigs/ Vehovsky K., Zadinova K, Stupka R et al.//Genetika, 2019. - № 51(1). - P. 61-68.

6. Rybarczyk A. Association of CAST and RYR1 genes polymorphism with carcass and meat quality in crossbreed pigs with a share of Pietrain breed/ Rybarczyk A., Terman A., Zak G.// Animal Science, 2016. - №5 - P.253-260.

7. Fujii J. Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor that is associated with malignant hyperthermya /Fujii J., Otsu K., Zorzato D. et al. // Science. - 1991. - № 253. - P. 448-451.

8. Афонюшкин В.Н., Донченко Н.А., Бушмелева П.В., Барсукова М.А., Фролова О.А. Теоретические аспекты обеспечения инфекционного благополучия в птицеводстве и свиноводстве путем использования методов селекции и молекулярно-генетического анализа ДНК/Ветеринарный врач. 2018. № 4. С. 63-68.

References

1. Bazhov G.M. Tekhnologicheskaya harakteristika svininy s porokami PSE i DFD/ Bazhov G.M., Kryshchuk E.A., Barannikov A.I.// Politematicheskij setevoy elektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2013. - №85. S.1-12.
2. Zinov'eva N.A. Polimorfizm genov, associirovannyh s lokusami

kolichestvennyh priznakov, u kabana (*Sus scrofa* L., 1758), obitayushchego na territorii Rossii/ Zinov'eva N.A., Kostyunina O.V., Ekonomov A.V. i dr.// Sel'skhozaystvennaya biologiya, 2013. - №2. - S.77-81.

3. Knyazev S. P. Problemy diskordantnosti i kosegregatsii ekspressii galotan-chuvstvitel'nosti svinej s mutaciej 1843 S-T v lokuse RYR1 receptora rianodina /Knyazev S.P., Zhuchaev K.V., Gart V.V. i dr.// Genetika. - 1998. - Т. 34. - №12. - С. 1648-1654.

4. Bauerova M. Detection of malignant hyperthermia in pigs by PCR-RFLP analysis using plucked hair as a source of DNA /Bauerova M., Vasicek D., Uhrin P. et al.// Zivocisna vyroba/ - 1995. - Vol. 40. - №4. - P. 145-147.

5. Vehovsky K. Effect of the Ser638Arg variation in the cast gene and causal SNP g.1843C>T in the RYR1 gene on carcass traits in crossbreed pigs/ Vehovsky K., Zadinova K, Stupka R et al.//Genetika, 2019. - № 51(1). - P. 61-68.

6. Rybarczyk A. Association of CAST and RYR1 genes polymorphism with carcass and meat quality in crossbreed pigs with a share of Pietrain breed/Rybarczyk A., Terman A., Zak G.// Animal Science, 2016. - №5 - P.253-260.

7. Fujii J. Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor that is associated with malignant hyperthermya /Fujii J., Otsu K., Zorzato D. et al. // Science. - 1991. - № 253. - P. 448-451.

8. Afonyushkin V.N., Donchenko N.A., Bushmeleva P.V., Barsukova M.A., Frolova O.A. Teoreticheskie aspekty obespecheniya infekcionnogo blagopoluchiya v pticevodstve i svinovodstve putem ispol'zovaniya metodov selekcii i molekulyarno-geneticheskogo analiza DNK/ Veterinarnyj vrach. 2018. № 4. S. 63-68.