Науковий вісник Ужгородського університету
Серія Біологія, Випуск 22, 2008: 110-113
© Коновал О.М., Костенко С.О., Спиридонов В.Г.,
Мельничук С.Д., Григорюк І.П., 2008

УДК 636.4:636.082:575.827

ГЕН *MC4R* ЯК ГЕНЕТИЧНИЙ МАРКЕР ПРИРОСТУ ЖИВОЇ МАСИ У СВИНЕЙ

О.М. Коновал, С.О.Костенко, В.Г. Спиридонов, С.Д. Мельничук, І.П. Григорюк

Ген MC4R як генетичний маркер приросту живої маси у свиней–О.М. Коновал, С.О.Костенко, В.Г. Спиридонов, С.Д. Мельничук,І.П. Григорюк*. – Поліморфізм гену MC4R у свиней великої білої породи чотирьох господарств України було досліджено методом ПЛР ПДРФ (полімеразна ланцюгова реакція, поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів). Тварини з РР генотипом (гомозиготи за мутантною рецесивною алеллю) мають переваги у швидкості набору живої маси до досягнення 100 кг. Частоти генотипу РР коливались від 0,16 до 1.*

Адреса*: Національний аграрний університет України, вул. Героїв Оборони 15, Київ, 03041, Україна. E-mail: oxanakonoval@mail.ru, swetakostenko@mail.ru; spyrydonov@nauu.kiev.ua ; biotech_nni_director@twin.nauu.kiev.ua*

MC4R gene as genetic marker which associated with growth-related traits in pigs.-O.M.Konoval., S.O. Kostenko, V.G. Spyrydonov, S.D. Melnychuk, I.P. Grygoriuk*-The polymorphism by MC4R gene of Large White pig breed of four Ukrainian farms has been investigated with PCR PLRF. Animals with PP genotipe (homozygous by allele with missens mutation) were characterized by increased growth-related traits in pigs till age at 100kg weight. Frequencies of the genotype PP were fluctuated from 0,16 to 1.*

Address*: National agricultural university of Ukraine, 15 Geroiv oborony Str., Kyiv-41.03041 Ukraine, E-mail oxanakonoval@mail.ru; swetakostenko@mail.ru; spyrydonov@nauu.kiev.ua; biotech_nni_director@twin.nauu.kiev.ua*

Вступ

Серед факторів, що впливають на рентабельність свинокомплексів різних форм власності вагоме місце займає показник приросту живої маси тварин, на який, окрім особливостей технології розведення свиней, раціону харчування, впливають також інтенсивність обміну речовин тварин та пов'язані з ним швидкість росту і відкладення жиру. Незважаючи на тривалу селекцію, спрямовану на вдосконалення порід в цьому напрямку, внутрішньопородна гетерогенність за показниками приросту живої маси у свиней в Україні залишається невивченою. Генотипування за генами, що впливають на швидкість набору маси тіла, дає можливість передбачати цю господарсько-цінну ознаку у тварин, на рівні ДНК, ще до їх народження і швидко ввести в популяцію свиней бажаного генотипу з метою підвищення рентабельності виробництва свинини.

На обмін речовин впливають протеїни, що відповідають за ожиріння у свиней, серед яких окремо виділяють H-FABP (Heart Fatty Acid-Binding Protein), A-FABP (Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein), LEPR (Porcine Leptin Receptor), LEP (Porcine Leptin) [5, 6, 8, 1] та групу MCR (меланокортин рецептори). Гени, що кодують ці білкові молекули відрізняються внутрішньопопуляційним поліморфізмом. Ген MC4R кодує меланокортин-4 рецептор, який є одним із найвивченіших в родині меланокортин-рецепторів [13], причому широко експресується в клітинах центральної нервової системи (ЦНС), включаючи ділянки, що відповідають за регуляцію відчуття насичення їжею та енергії гомеостазу [9, 12, 13].

Рецептор меланокортин-4 (MC4R або PRUM) є важливим у контролі енергетичного балансу, через який опосередковується вплив лептину (LEP) на засвоюваність поживних речовин та витрату енергії [2]. MC4R впливає на обмін речовин, живу масу тіла та надання переваги в їжі [10], а також контролює енергію гомеостазу у ссавців [11]. Місенс мутація Asp298Asn в амінокислотній послідовності цього рецептору у ссавців сприяє ожирінню [7]. Мутантний алель спричиняє відчуття голоду, підвищений апетит і, як наслідок, вищі показники приросту живої маси тварин. [4].

До теперішнього часу популяції свиней в Україні практично недосліджені за генами господарсько-цінних ознак. Неналагодженим залишається і сам процес генотипування племінних тварин. Виходячи з цього метою наших досліджень було вивчення поліморфізму гену MC4R у великої білої породи, яка складає близько 70% генофонду свиней в Україні.

Матеріали і методика досліджень

Біоптат (кров та волосяні фолікули) відбирали у свиней породи велика біла (105 голів) у наступних господарствах: ВАТ «Маки», ДСПГ «Христинівське» УААН, СП ТОВ «Нива Переяславщини» та ВАТ агрокомбінат «Калита». У ВАТ «Маки» та ДСПГ «Христинівське» УААН використовують традиційну технологію розведення і годівлі без використання преміксів та біодобавок. Відлучення поросят здійснюється з огляду на показники їх живої маси та загальний фізіологічний стан свиноматки. В господарстві СП ТОВ «Нива Переяславщини» дотримуються датської технології: тварини мають вільний доступ до збалансованих кормів, поросят відлучають у 28- добовому віці. Усі досліджені тварини належали до великої білої породи: у ВАТ «Маки» та ДСПГ «Христинівське» УААН – тварини місцевої, СП ТОВ «Нива Переяславщини» – датської, ВАТ агрокомбінаті «Калита» – англійської селекції. У свиней визначали показники живої маси, довжину тіла, висоту в холці, товщину шпику та генотипи племінних свиноматок і кнурів, з якими їх спаровували.

Дослідження проводили у відділі молекулярної діагностики Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного аграрного університету.

Геномну ДНК виділяли за допомогою сорбенту діоксиду кремнію у присутності хаотропних агентів. Концентрацію та чистоту виділеної нуклеїнової кислоти визначали на спектрофотометрі «BioPhotometer» (Eppendorf, Німеччина). Генотипування проводили методом ПЛР-ПДРФ (полімеразна ланцюгова реакція, поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів) із використанням діагностичного набору, розробленого у відділі молекулярної діагностики УЛЯБП АПК, НАУ.

Відбір біоптату проводили стерильними інструментами. Кров (в об'ємі 5-10 мл) переносили в пробірки з 3%-м розчином ЕДТА (трилон Б) із розрахунку 10:1. Волосяні фолікули відбирали в 1.5 мл пробірки (15-25 волосин, обрізаних 0,5 см від луковиці). Біоптат доставляли в день відбору охолодженим. В подальшому матеріал зберігається при температурі -700С.

Маніпуляції, пов'язані з пробопідготовкою, здійснювали дозаторами перемінних об'ємів (типу «Eppendorf»), з використанням одноразових поліпропіленових пробірок та наконечників с аерозольним бар'єром. Зразки цільної крові, стабілізованої ЕДТА, переносили в 1,5 мл пробірки та використовували для виділення ДНК. В пробірки з волосяними фолікулами вносили лізуючий розчин, проводили лізування 20-25 хв при 650С, періодично перемішували на вортексі. Супернатант переносили в стерильні пробірки. Далі проводили виділення ДНК з цільної крові та волосяних фолікулів за допомогою сорбенту SiO2 за однаковою схемою [3].

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали в об'ємі 25 мкл на один зразок з розрахунку: 19.8 мкл ПЛР-суміші (деіонізована вода, реакційний буфер з MgCl2, суміш дезоксинуклеотид-трифосфатів і прямий та зворотній праймери [10, 4] в концентрації 5 пкМ), 0.2 мкл Taq-полімерази та 5 мкл ДНК зразку. ПЛР виконували в термоциклері (Applied Biosystems, GeneAmp2400) за наступними параметрами: початкова денатурація ДНК – 95 0С – 1 хв., послідовні 35 циклів: денатурації 94 0С –20 с, відпалу праймерів 600С, синтезу 720С - 20 с; фінального синтезу 720С – 5 хв.

Рестрикцію продуктів ПЛР проводили у реакційній суміші із розрахунку 19.8 мкл рестрикційного буферу і 0.2 мкл рестриктази Taq I на один зразок. Зразки інкубували протягом 12-16 год при 37ºС. Для електорфорезу використовували 4% агарозний гель та забарвлювали 1% розчином бромового етидію.

В лунки геля вносили по 25-35 мкл реакційної суміші. Оцінку розмірів продуктів рестрикції здійснювали по ДНК-маркеру молекулярних мас GeneRulerTM 100bp DNA Ladder Plus, "Fermentas". Електрофорез проводили протягом 30 хв при напруженні електричного поля 10 В/см, 160V. Результати ампліфікації і рестриктного аналізу візуалізували на трансілюмінаторі за допомогою УФ-променів. Отримані дані фотографували і заносили в комп'ютерну базу даних (рис.1). На доріжках досліджених зразків визначали розмір продуктів ПЛР гену MC4R після обробки відповідною рестриктазою. Генотип ММ характеризується наявністю продуктів розміром 156 п.н. і 70 п.н., РМ – 226, 156 і 70, РР - 226 п.н., відповідно.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати генотипування тварин наведено в табл.1. Частоти генотипів *PP* коливалися від 0,16 до 1. В господарстві ДСПГ «Христинівське» УААН усі досліджені тварини мали генотип *PP*. У тварин ВАТ «Маки» переважав генотип *PP* із частотою 0,8. Водночас не було виявлено тварин гомозиготних за дикою алеллю *M*, хоча алелі *M* і *P* зустрічалися із частотою 0,47 та 0,53 відповідно. Це свідчить про селекційну роботу в господарстві, спрямовану на відбір тварин, що характеризуються інтенсивним приростом живої маси. Отримані дані ілюструють достовірні відмінності між тваринами із різними генотипами. Свині ВАТ «Маки» з генотипом *PP* мають вищі показники за швидкістю росту і набором маси, ніж з генотипом *MP* (табл. 2 та 3).

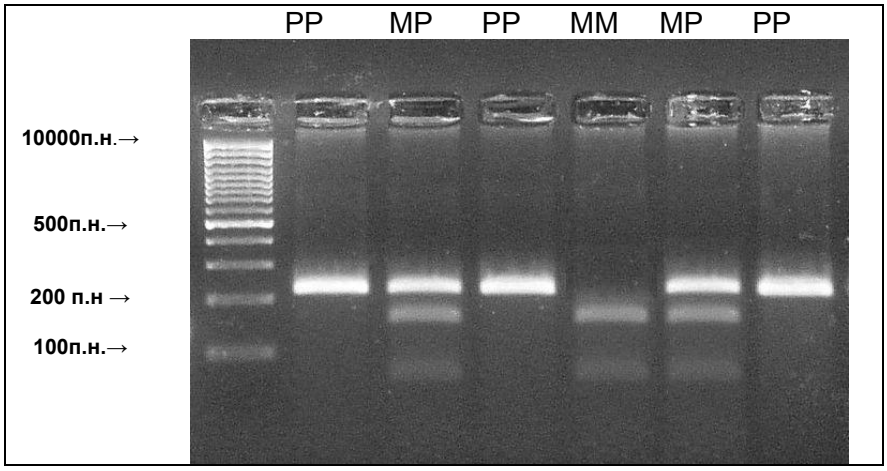

Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР-ПДРФ аналізу поліморфізму гену *MC4R* у свиней породи велика біла, розділених у 4-% агарозному гелі.

У ВАТ агрокомбінат «Калита» переважали свині з генотипами *MP* та *PP* із частотою 0,56 і 0,42. В генофонді популяції досліджених свиней частіше зустрічалася алель *P* із частотою 0,68.

У СП ТОВ «Нива Переяславщини» виявлено однакову кількість тварин з генотипами *MM* та *PM* (0,42), а частоти між алелями *M* і *P* були розподілені 0,47 і 0,53 відповідно. Порівняння морфометричних показників тварин з різними генотипами у СП ТОВ «Нива Переяславщини» свідчить про відсутність статистично достовірних відмінностей. Це можна пояснити зменшенням приросту живої маси тварин з віком.

Таблиця 1. Частоти генотипів і алелей гену *MC4R*

Господарство	Генотип		Алелі		
	MM	*MP*	*PP*	*M*	*P*
ВАТ «Маки» (n=20)	0	0,2	0,8	0,22	0,78
СП ТОВ «Нива Переяславщини»(n=24)	0,42	0,42	0,16	0,47	0,53
ВАТ агрокомбінат «Калита»(n=41)	0,02	0,56	0,42	0,32	0,68
ДСПГ "Христинівське" УААН (n=20)	-	-	1	0	1
Разом по всіх господарствах (n=105)	0,1	0,3	0,6	0,2	0,8

Таблиця 2. Середня жива маса свиней (кг) з різними генотипами гену *MC4R*

Господарство	Генотипи тварин		
	MM	PM	PP
ВАТ «Маки»	-	***144±4	***164±6
СП ТОВ «Нива Переяславщини»	248±5	242±5	249±8
ВАТ агро комбінат «Калита»	198 ±1	210 ± 5	210 ± 8

Таблиця 3. Середня довжина тіла свиней (см) з різними генотипами гену *MC4R*

Господарство	Генотипи тварин		
	MM	PM	PP
ВАТ «Маки»	-	***145±5	***153±3
СП ТОВ «Нива Переяславщини»	158±1	159±1	159±1
ВАТ агро комбінат «Калита»	157±1	161±1	162±2

***p<0,001

За даними Чена та ін. [4] тварини з генотипом *PP* мають найбільші переваги в період до досягання живої маси 100 кг. За умов набору живої маси більше 100 кг, різниця між показниками тварин з різними генотипами поступово зменшується. Про це свідчать морфометричні показники тварин двох інших господарств. В СП ТОВ «Нива Переяславщини» середня жива маса тварин з різними генотипами коливалася між 242 і 249 кг, ВАТ агрокомбінат «Калита» дорівнювала 210 кг. Таким чином, генотип *PP* має суттєві переваги за умов товарного виробництва свинини, який впливає на швидкість росту тварин.

Висновки

Поліморфізм гену *MC4R* впливає на показники живої маси свиней. Свині з генотипом *PP* (гомозиготи за мутантною рецесивною алеллю) мають переваги у швидкості набору живої маси до досягнення 100 кг. Генетичний моніторинг племінних тварин за геном *MC4R* доцільно використовувати у селекційній програмі з свинарства. Розроблена система генетичного контролю дозволяє ідентифікувати поліморфізм гену *MC4R*. У досліджених господарствах України спостерігається високий рівень генотипу *PP* у свиней породи велика біла, частоти якого коливаються від 0,16 до 1.

1. Alfonso L., Arana A. Characterisation of some fatness candidate genes in basque Black Pied and Large White pigs // Archivos de Zootecnia. - 2004. - Vol 53, № 204. - P. 411-414.
2. Benoit S. CNS Melanocortin System Involvement in the Regulation of Food Intake // Hormones and Behavior .- 2000. - 37, № 4.- P. 299-305
3. Boom et al. Rapid and simpe method of purification of nucleic acids // J. Clin. Microb. – 1990. – 28, № 3. - P. 495-503.
4. Chen et al. Different allele frequencies of MC4R gene variants in Chinese pig Breeds // Arch. Tierz., Dummerstorf –2004.- 47, № 5.-P.- 463-468
5. Gerbens et al. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs // Mamm. Genome. - 1998.-Vol. 9. - P. 1022-1026.
6. Gerbens et al. Affect of genetic variants of the Fatty Acid-Binding Protein gene on intramuscular and performance trait in pigs / /J. Anim Sci. - 1999. - Vol. 77. -P. 846-852.
7. Houston R.D., Cameron N.D., Rance, K.A. A melanocortin- 4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected large white pig populations // Animal Genetics. - 2004. - Vol. 35.- P. 386–390.
8. Kennes et al. Characterization of swine leptin polimorphisms and their assosiation with production traits // J. Anim. Genet.- 2001.-Vol. 32.- P. 215-218.
9. Kishi T. et al. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat // Journal of Comparative Neurology. - 2003.- Vol. 457. - P.-213–35.
10. Kim, K.S., Larsen, N. J., Rothschild, M. F. Rapid communication: linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene // Journal of Animal Science. - 2000a. – Vol. 78. - P.791–792.
11. Kim, K.S. et al Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin- 4 receptor mutation in domestic pigs // Domestic Animal Endocrinology. – 2004. - Vol. 26. – P. 75–86.
12. Mountjoy K.G., et al. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain // Molecular Endocrinology. – 1994. Vol. 8. – P. 1298–308.
13. Salajpal K. et al. Effect of MC4R polymorphism on physiological stress response in pigs Agriculture // Scientific and Professional Review. – 2007.- Vol. 13 № 1.- P. 46-50.

Отримано: 12 грудня 2007 р.

Прийнято до друку: 12 грудня 2007 р.