

О.С. Романенкова, ✉
 В.В. Волкова,
 А.А. Белоус

Федеральный исследовательский центр
 животноводства — ВИЖ им. академика
 Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы,
 Московская область, Российская
 Федерация

✉ moonlit_elf@mail.ru

Поступила в редакцию:
 18.01.2023

Одобрена после рецензирования:
 15.02.2023

Принята к публикации:
 28.02.2023

Olga S. Romanenkova, ✉
 Valeria V. Volkova,
 Anna A. Belous

L.K. Ernst Federal Research Center for
 Animal Husbandry, Dubrovitsy, Moscow
 region, Russian Federation

✉ rebezov@ya.ru

Received by the editorial office:
 18.01.2023

Accepted in revised:
 15.02.2023

Accepted for publication:
 28.02.2023

Разработка тест-систем для анализа полиморфизма генов TNFAIP3 и CDS1, ассоциированных с толщиной шпика у свиней

РЕЗЮМЕ

Актуальность. В свиноводстве одной из главных задач при проведении селекционно-племенной работы является эффективность повышения выхода качественной продукции. Развитие молекулярно-генетических методов исследований с помощью чипов различной плотности и последующие полно-геномные ассоциативные исследования позволили идентифицировать большое количество новых генов, потенциально ассоциированных с селекционно значимыми признаками. Такими потенциальными генами являются гены TNF α -индуцированного белка 3 (TNFAIP3) и CDP-диацилглицеролсинтазы 1 (CDS1). Данные отечественных и зарубежных исследований показывают, что эти гены ассоциированы с регуляцией процесса катаболизма клеточных белков и дифференцировки жировых клеток.

Методы. Для проведения дальнейшего исследования были выбраны два полиморфизма, показавшие достоверную ассоциацию с признаками: толщина шпика над 6–7-м грудными позвонками и толщина шпика над 10–12-м грудными позвонками — в генах TNFAIP3 (SSC1, rs81351586, A/G) и CDS1 (SSC8, rs331818788, C/A). Определение полиморфизма осуществлялось методом ПЦР в реальном времени. Подбор олигонуклеотидных зондов и праймеров проводился исходя из локализации мутации с использованием онлайн-ресурса BLAST. Для проверки информативности разработанных ПЦР-РВ тест-систем были подобраны альтернативные пары праймеров для проведения ПДРФ-анализа. В качестве генетического материала были использованы образцы ДНК 50 голов свиней породы крупная белая.

Результаты. Разработанные тест-системы по потенциальным генам-маркерам продуктивности TNFAIP3 и CDS1 позволили четко определять генотипы животных в формате ПЦР-РТ. Было установлено, что оба исследованных локуса являются полиморфными. Разработанная тест-система может быть использована для генотипирования большого поголовья животных и проведения отбора животных с определенными генотипами.

Ключевые слова: свиньи, ген, однонуклеотидный полиморфизм, продуктивность, тест-система

Для цитирования: Романенкова О.С., Волкова В.В., Белоус А.А. Разработка тест-систем для анализа полиморфизма генов TNFAIP3 и CDS1, ассоциированных с толщиной шпика у свиней. *Аграрная наука.* 2023; 368 (3): 58–61, <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-368-3-58-61>

© Романенкова О.С., Волкова В.В., Белоус А.А.

Development of test systems for the analysis of polymorphism of the TNFAIP3 and CDS1 genes associated with the fat thickness in pigs

ABSTRACT

Relevance. In pig husbandry, one of the main issue in selection and breeding work is the efficiency of increasing the yield of quality products. The development of molecular genetic research methods using chips of various densities and subsequent genome-wide association studies made it possible to identify a large number of new genes potentially associated with selectively significant traits. Some of these potential genes are the TNF α -induced protein 3 (TNFAIP3) and CDP-diacylglycerol synthase 1 (CDS1) genes. The results of domestic and foreign studies show that these genes are associated with the regulation of the process of catabolism of cellular proteins and differentiation of fat cells.

Methods. For further investigation, two polymorphisms were selected that showed a reliable association with the signs: the thickness of the fat over the 6–7 thoracic vertebrae and the thickness of the fat over the 10–12 thoracic vertebrae — in the TNFAIP3 genes (SSC1, rs81351586, A/G) and CDS1 (SSC8, rs331818788, C/A). Polymorphism was determined by real-time PCR. The selection of oligonucleotide probes and primers was carried out based on the localization of the mutation using the BLAST online resource. To test the information content of the developed RT-PCR test systems, alternative primer pairs were selected for RFLP analysis. DNA samples from 50 Large White pigs were used as genetic material.

Results. The developed test systems for potential marker genes of productivity TNFAIP3 and CDS1 made it possible to clearly determine the genotypes of animals in the PCR-RT format. Both studied loci were found to be polymorphic. The developed test system can be used for genotyping a large number of animals and selecting animals with certain genotypes.

Key words: pigs, gene, single nucleotide polymorphism, productivity, test system

For citation: Romanenkova O.S., Volkova V.V., Belous A.A. Development of test systems for the analysis of polymorphism of the TNFAIP3 and CDS1 genes associated with the fat thickness in pigs. *Agrarian science.* 2023; 368 (3): 58–61, <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-368-3-58-61> (In Russian).

© Romanenkova O.S., Volkova V.V., Belous A.A.

Введение / Introduction

Одним из перспективных подходов для будущего развития селекционного процесса является использование метода геномной селекции, а именно повышение точности оценки племенной ценности путем идентификации SNP в специфических генах, вовлеченных в формирование хозяйственно значимых и экономически значимых признаков [1, 2]. В свиноводстве одной из главных задач при проведении селекционной работы является повышение продуктивности. В настоящее время имеется большое количество исследований, посвященных ассоциациям различных генов с хозяйственно полезными признаками у свиней. Например, ген DMD, обуславливающий наличие стресс-синдрома, ген гормона роста GH, ген ESR эстрогенового рецептора, ген рецептора меланокортина MC4R и ген PRLR пролактинового рецептора [3–6].

Развитие молекулярно-генетических методов исследований с помощью чипов различной плотности и последующие полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) позволили идентифицировать большое количество новых генов, потенциально ассоциированных с селекционно значимыми признаками. Определение таких генотипов у свиней позволяет проводить отбор животных с предпочтительными (с точки зрения селекции) вариантами признаков [7, 8].

Проведение GWAS-анализа по показателям скороспелости свиней, их мясным, откормочным и воспроизводительным качествам на основе данных о генотипах по SNP-маркерам (исследование по признакам плодовитости, многоплодия, количества мертворожденных поросят и т. д.) является важным этапом для поиска потенциальных генов-маркеров [9]. Для детального исследования их связи с хозяйственно полезными признаками удобными инструментами являются молекулярно-генетические тест-системы, которые разрабатываются специфически для анализа конкретного SNP, что позволяет изучить его полиморфизм, а также достоверные корреляции хотя бы с одним признаком. Такими потенциальными генами являются гены TNF α -индуцированного белка 3 (TNFAIP3) и CDP-диацилглицеролсинтазы 1 (CDS1). Результаты отечественных и зарубежных исследований показывают, что эти гены ассоциированы с регуляцией процесса катаболизма клеточных белков и дифференцировки жировых клеток [10, 11].

Цель работы — разработка молекулярно-генетических тест-систем анализа полиморфизма генов TNFAIP3 и CDS1, применимых для исследования большого поголовья животных и проведения геномного отбора.

Материал и методы исследования / Material and methods

На первом этапе были проведены полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) по 248 головам свиней у пород крупная белая (124 головы) и ландрас (124 головы). По полученным результатам был выполнен поиск SNP, ассоциированных с признаками воспроизводства, а именно многоплодия, количества мертворожденных и мумифицированных поросят.

Для проведения дальнейшего исследования были выбраны два полиморфизма, показавшие достоверную ($p < 0,00001$) ассоциацию с признаками: толщина шпика над 6–7-м грудными позвонками и толщина шпика над 10–12-м грудными позвонками — в генах TNFAIP3 (SSC1, rs81351586, A/G) и CDS1 (SSC8, rs331818788, C/A).

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для ПЦР

Table 1. Primers sequences used for PCR

Ген/полиморфизм	Последовательность праймеров
TNFAIP3 SSC1, rs81351586, A/G	FAM — attgggattaataactaagct — BHQ1 R6G attgggattgataactaagct — BHQ2 aaacactggcccagctt aggaatctgtctaaatgag
CDS1 SSC8, rs331818788, C/A	FAM — accctatgctctctggattga — BHQ1 R6G — accctatgctactggattgaaa — BHQ2 aggactcaagaatggaaagat ggccatttcaaatgatagcaat

Таблица 2. Эндонуклеазы рестрикции и длины фрагментов в зависимости от генотипов

Table 2. Restriction endonucleases and fragment lengths depending on genotypes

Ген	Рестриктаза	SNP	Генотипы	Длина фрагментов, п. о.
TNFAIP3	Vsp I	A/G	AA	116, 169
			AG	285, 116, 169
			GG	285
CDS1	Psp6 I	C/A	CC	217, 146
			CA	363, 217, 146
			AA	363

Определение полиморфизма осуществлялось методом ПЦР-ПДРФ в реальном времени. Подбор олигонуклеотидных зондов и праймеров проводился исходя из локализации мутации с использованием онлайн-ресурса Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [12]. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов указаны в таблице 1.

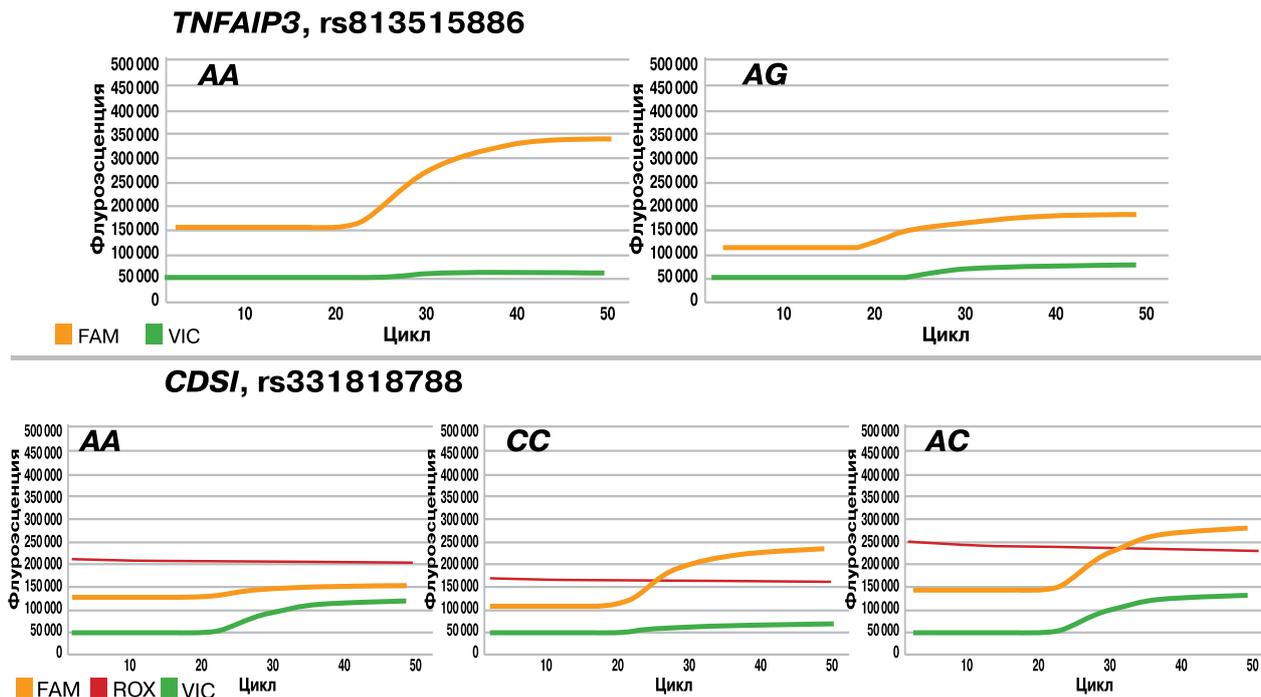
Для апробации полученных генов были использованы образцы ДНК 50 голов свиней породы крупная белая. Выделение ДНК производилось с использованием коммерческого набора «ДНК-Экстран-1» (ЗАО «Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией производителей. ПЦР проводили в конечном объеме 19 мкл реакционной смеси, содержащей 1 × ПЦР буфера, 1 mM MgCl₂, 200 мкМ дНТФ, 20 пмоль каждого из праймеров и зондов, 1 Ед. Taq-полимеразы и 2 мкл ДНК.

Для проведения ПЦР использовали прибор Quant Studio 5 (Applied Biosystems). Реакции выполняли в следующем температурно-временном режиме: начальная денатурация 95 °C — 3 мин., 50 циклов амплификации в следующем температурно-временном режиме: 95 °C — 30 сек., 60 °C — 45 сек. Идентификация генотипов животных в режиме реального времени проводилась по характеру кривых флуоресценции.

Для проверки информативности разработанных ПЦР-ПВ тест-систем были подобраны альтернативные пары праймеров для проведения последующего ПДРФ-анализа. Полученные ПДРФ-продукты разделяли в 3%-ном агарозном геле в присутствии бромида димидиума с последующей визуализацией в УФ-трансиллюминаторе. Для проведения амплификации были подобраны следующие праймеры: TNFAIP3 (5'-atctccaagaacatttcta-3', 5'-tttcttaataaagcctcttgt-3'), CDS1 (5'-aacaccttttaaaactgcatac, 5'-gtagctttgtaaatattgttgaa-3'). Исползованные эндонуклеазы рестрикции и длины фрагментов в зависимости от генотипов указаны в таблице 2.

Рис. 1. Кривые флюоресценции различных генотипов генов TNFAIP3 и CDS1

Fig. 1. Fluorescence curves of different genotypes of the TNFAIP3 and CDS1 genes



Результаты и обсуждение / Results and discussion

Разработанные тест-системы по потенциальным генам-маркерам продуктивности TNFAIP3 и CDS1 позволили четко определять генотипы животных в формате ПЦР-РТ (рис. 1) и ПЦР-ПДРФ (рис. 2).

Было установлено, что оба исследованных локуса являются полиморфными. Частоты встречаемости аллелей и генотипов генов TNFAIP3 и CDS1 показаны в таблице 3.

Выводы / Conclusion

На сегодняшний день в связи с развитием методов полногеномного секвенирования широкое распространение получили исследования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) с помощью биочипов различной плотности. Следует отметить, что проведение генотипирования данным методом требует использования дорогостоящих секвенаторов и ДНК-чипов. Для массового скрининга животных по генам, ассоциированных с хозяйственно полезными признаками, удобно использовать простые и относительно недорогие тест-системы, основанные на методе полимеразной цепной реакции.

Разработанные нами тест-системы, основанные на методах ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) и ПЦР-РВ (ПЦР в реальном времени), показали высокую валидность при сравнении результатов генотипирования как между собой, так и с серией референтных образцов с известными генотипами, предварительно исследованных с помощью чипов GGP PorcineHD-24 Kit (Illumina).

Тем не менее следует отметить, что тест-системы на основе метода ПЦР-РТ имеют некоторые преимущества. Прежде всего это сокращение времени и себестоимости анализа за счет отсутствия необходимости проведения электрофореза и покупки дополнительных реактивов — эндонуклеаз рестрикции Vsp I и Psp6 I. Также тест-системы ПЦР-РТ отличаются более высокой

Рис. 2. Результат генотипирования исследуемых генов методом ПЦР-ПДРФ. Генотипы CDS1: 1, 2 — AA; 3 — CA; 6, 7 — CC; 4, 5 — CC (не полностью рестрицированные фрагменты). Генотипы TNFAIP3: 8, 9 — GG; 10, 11 — AA; 12-14 — AG; M — маркер молекулярного веса (шаг — 100 п. о.)

Fig. 2. The result of genotyping of the studied genes by PCR-RFLP. CDS1 genotypes: 1, 2 — AA; 3 — CA; 6, 7 — CC; 4, 5 — CC (half-restricted fragment). TNFAIP3 genotypes: 8, 9 — GG; 10, 11 — AA; 12-14 — AG; M — DNA size marker (100 b. p. range)

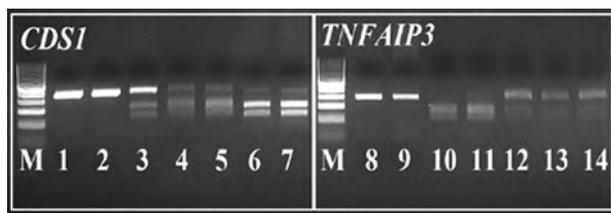


Таблица 3. Частоты встречаемости аллелей и генотипов генов TNFAIP3 и CDS1 в исследуемой выборке свиней

Table 3. The frequencies of alleles and genotypes of the TNFAIP3 and CDS1 genes in the studied sample of pigs

Ген/полиморфизм	Частота генотипов			Частота аллелей	
	AA	AG	GG	A	G
TNFAIP3	0,54	0,46	0	0,77	0,23
	AA	AC	CC	A	C
CDS1	0,06	0,34	0,60	0,23	0,77

точностью и позволяют минимизировать ошибки в интерпретации полученных результатов (рис. 2). Таким образом, разработанные тест-системы могут быть применены для исследования полиморфизма генов TNFAIP3 и CDS1 у свиней.

Все авторы несут ответственность за свою работу и представленные данные.

Все авторы внесли равный вклад в эту научную работу. Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors have made an equal contribution to this scientific work. The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism. The authors declare no conflict of interest.

ФИНАНСИРОВАНИЕ:

Материалы подготовлены в рамках выполнения работы по проекту РНФ № 21-76-10038 «Изучение генетической структуры и идентификация генов, участвующих в процессах регуляции фенотипического проявления мясных, откормочных и воспроизводительных качеств закрытой популяции свиней материнских пород».

FUNDING:

The materials were prepared as part of the work under the Russian Science Foundation project No. 21-76-10038 «Study of the genetic structure and identification of genes involved in the regulation of the phenotypic manifestation of meat, fattening and reproductive qualities of a closed population of pigs of mother breeds».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Belous A.A., Sermyagin A.A., Zinovieva N.A. PSXI-5 Genome-wide association study of feed efficiency in Russian Duroc boars. *Journal of Animal Science*. 2021; 99(S3): 247. <https://doi.org/10.1093/jas/skab235.451>
2. Zeng H. *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies uncovers shared candidate genes across breeds for pig fatness trait. *BMC Genomics*. 2022; 23: 786. DOI:10.1186/s12864-022-09036-z.
3. Погорельский И.А., Сердюк Г.Н., Иванов Ю.В. Влияние генотипов генов гипофизарного фактора транскрипции (POU1F1) и соматотропина (GH) на мясные и откормочные качества помесных свиней. *Генетика и разведение животных*. 2019; 4: 49–55. eLIBRARY ID: 41571187
4. Лобан Н.А. Селекция на повышение продуктивных качеств свиней белорусской крупной белой породы с использованием маркерных генов. *Зоотехническая наука Беларуси*. 2020; 55(1): 145–156. eLIBRARY ID: 43879552
5. Костюнина О.В. и др. Полиморфизм гена рецептора меланокортина MC4R и его влияние на мясные и откормочные качества свиней. *Достижения науки и техники АПК*. 2012; 8: 49–51. eLIBRARY ID: 17955733
6. Максимов А.Г. Генотипы хряков по маркерным генам MC4R, LIF, PRLR и их взаимосвязь с откормочными и мясными качествами. *Известия Горского государственного аграрного университета*. 2018; 55(1): 41–44. eLIBRARY ID: 32659723
7. Траспов А.А., Костюнина О.В., Белоус А.А., Карпушкина Т.В., Свеженцева Н.А., Зинovieva Н.А. Полногеномные ассоциативные исследования распространения пороков развития и других селекционно значимых качественных признаков у потомства хряков крупной белой породы российской селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020; 24(2): 185–190. DOI: 10.18699/VJ20.612.
8. Viterbo V.S. *et al.* Genome wide association study of fatty acid composition in Duroc swine. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2018; 31(8): 1127–1133. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0779>
9. Falke-Gieske C., Blaj I., Preuß S., Bennewitz J., Thaller G., Tetens J. GWAS for Meat and Carcass Traits Using Imputed Sequence Level Genotypes in Pooled F2-Designs in Pigs. *G3 (Bethesda)*. 2019; 9(9): 2823–2834. DOI: 10.1534/g3.119.400452
10. Mercadé A., Sánchez A., Folch J.M. Characterization and physical mapping of the porcine CDS, and CDS, genes. *Animal Biotechnology*. 2007; 18(1): 23–35. DOI: 10.1080/10495390601091073
11. Zhang H. *et al.* Genome-Wide Detection of Genetic Loci and Candidate Genes for Body Conformation Traits in Duroc × Landrace × Yorkshire Crossbred Pigs. *Frontiers in Genetics*. 2021; 12: 664343. DOI:10.3389/fgene.2021.664343
12. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ОБ АВТОРАХ:

Ольга Сергеевна Романенкова, кандидат биологических наук, Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 60, Московская обл., 142132, Российская Федерация y7tteaip@mail.ru <https://orcid.org/0000-0002-2682-6164>

Валерия Владимировна Волкова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 60, Московская обл., 142132, Российская Федерация moonlit_elf@mail.ru <https://orcid.org/0000-0002-2080-0182>

Анна Александровна Белоус, кандидат биологических наук, Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, 60, Московская обл., 142132, Российская Федерация abelous.vij@ya.ru <https://orcid.org/0000-0001-7533-4281>

REFERENCES

1. Belous A.A., Sermyagin A.A., Zinovieva N.A. PSXI-5 Genome-wide association study of feed efficiency in Russian Duroc boars. *Journal of Animal Science*. 2021; 99(S3): 247. <https://doi.org/10.1093/jas/skab235.451>
2. Zeng H. *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies uncovers shared candidate genes across breeds for pig fatness trait. *BMC Genomics*. 2022; 23: 786. DOI:10.1186/s12864-022-09036-z.
3. Pogorelskij I., Serdyuk G., Ivanov Y. The influence of genotypes of pituitary transcription factor gene (POU1F1) and growth hormone gene (GH) on meat and fattening qualities in the crossbred pigs. *Genetics and breeding of animals*. 2019; 4: 49–55. eLIBRARY ID: 41571187 (In Russian).
4. Loban N.A. Selection aimed on increasing performance traits of pigs of belarusian large white breed using marker genes. *Zootechnical science of Belarus (Zootekhnicheskaya nauka Belarusi)*. 2020; 55(1): 145–156. eLIBRARY ID: 43879552 (In Russian).
5. Kostjulina O.V. *et al.* Polymorphism of melanocortin receptor gene MC4R and their effect on the growth and meat productive traits of pigs. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2012; 8: 49–51. eLIBRARY ID: 17955733 (In Russian).
6. Maksimov A.G. Boars' genotypes in marker genes MC4R, LIF, PRLR and their interrelation between fattening and meat qualities. *Izvestia Gorskoy State Agrarian University*. 2018; 55(1): 41–44. eLIBRARY ID: 32659723 (In Russian).
7. Traspov A.A., Kostyunina O.V., Belous A.A., Karpushkina T.V., Svejencheva N.A., Zinovieva N.A. Whole-genome association studies of distribution of developmental abnormalities and other breeding-valuable qualitative traits in offspring of the Russian large-white boars. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(2): 185–190. DOI: 10.18699/VJ20.612 (In Russian).
8. Viterbo V.S. *et al.* Genome wide association study of fatty acid composition in Duroc swine. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2018; 31(8): 1127–1133. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0779>
9. Falke-Gieske C., Blaj I., Preuß S., Bennewitz J., Thaller G., Tetens J. GWAS for Meat and Carcass Traits Using Imputed Sequence Level Genotypes in Pooled F2-Designs in Pigs. *G3 (Bethesda)*. 2019; 9(9): 2823–2834. DOI: 10.1534/g3.119.400452
10. Mercadé A., Sánchez A., Folch J.M. Characterization and physical mapping of the porcine CDS, and CDS, genes. *Animal Biotechnology*. 2007; 18(1): 23–35. DOI: 10.1080/10495390601091073
11. Zhang H. *et al.* Genome-Wide Detection of Genetic Loci and Candidate Genes for Body Conformation Traits in Duroc × Landrace × Yorkshire Crossbred Pigs. *Frontiers in Genetics*. 2021; 12: 664343. DOI:10.3389/fgene.2021.664343
12. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ABOUT THE AUTHORS:

Olga Sergeevna Romanenkova, Candidate of Biological Sciences, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60 Dubrovitsy, Moscow region, 142132, Russian Federation y7tteaip@mail.ru <https://orcid.org/0000-0002-2682-6164>

Valeriya Vladimirovna Volkova, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60 Dubrovitsy, Moscow region, 142132, Russian Federation moonlit_elf@mail.ru <https://orcid.org/0000-0002-2080-0182>

Anna Alexandrovna Belous, Candidate of Biological Sciences, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60 Dubrovitsy, Moscow region, 142132, Russian Federation abelous.vij@ya.ru <https://orcid.org/0000-0001-7533-4281>