

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 636.4:575.224.22:57.038.7

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.4.79-86

**ДЕТЕКЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *ESR1* И *IGF2* МЕТОДОМ
ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

Бардуков Н.В., Свеженцева Н.А., Форнара М.С., Костюнина О.В.

*Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. Л.К. Эрнста
Подольск - Дубровицы Московской области, Российская Федерация*

Рутинное использование результатов генотипирования по ДНК-маркерам регламентировано Приказом МСХ Российской Федерации в 2021 г. и осуществляется в ряде племенных свиноводческих предприятий. Одними из наиболее востребованных в практической работе являются ДНК-маркеры генов *ESR1* (оказывает влияние на репродуктивные признаки свиней) и *IGF2* (ген инсулиноподобного фактора роста – 2, ассоциированный с мясными и откормочными качествами свиней). Оптимизация тест-систем и диагностикумов в части снижения себестоимости и трудоемкости, а также повышения точности за счет нивелирования фактора субъективности характеризуется практической значимостью. Прогресс, достигнутый за последние десятилетия в области детекции полиморфизмов, позволяет использовать альтернативные методы идентификации генетических вариантов. Одним из таких методов является ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ), который авторы использовали при разработке тест-систем анализа полиморфизма генов *ESR1* и *IGF2*. В данной статье изложены принципы создания тест-систем детекции полиморфизма вышеизложенных генов методом ПЦР-РВ, причем дизайн системы предусматривает амплификацию и генотипирование ДНК как симплексном, так и в мультиплексном режиме, и продемонстрированы результаты генотипирования с их использованием. Предложенные тест-системы предусматривают использование реактивов отечественных производителей, позволяют снизить временные и материальные затраты, повысить точность генотипирования. Сопоставление результатов исследований с использованием разработанной тест-системы и полученных посредством использования традиционных методов генотипирования (ПЦР-ПДРФ) продемонстрировали 100% совпадение. Таким образом, предложенные тест-системы детекции полиморфизма генов *ESR1* и *IGF2* методом ПЦР-РВ могут быть с успехом использованы для генотипирования свиней различных пород.

Ключевые слова: свиньи, полиморфизм генов, ПЦР-РВ, IGF2, ESR1, хозяйственно-полезные признаки

Проблемы биологии продуктивных животных. 2021. 4: 79-86

Использование в практической селекционно-племенной работе результатов исследований по ДНК-маркерам в настоящее время осуществляется во многих племенных хозяйствах. Приказом МСХ Российской Федерации (2011 г.) определены правила в области племенного животноводства, предусматривающие для ряда племенных организаций проведение работ по генетической экспертизе на достоверность происхождения животных, а также по выявлению генетических аномалий. Вместе с тем, востребованы молекулярно-генетические исследования, направленные на выявление носителей желательных генетических сочетаний по генам, ассоциированным с экономически-значимыми признаками. Одним из первых идентифицированных полиморфизмов, ассоциированных с репродуктивными признаками свиней, является мутация в гене эстрогенового рецептора (*ESR1*). Эстроген известен своей ролью в развитии и функционировании женской репродуктивной системы. Первичный механизм действия эстрогена заключается в связывании и модуляции активности рецепторов эстрогена (*ESR1* и *ESR2*), которые являются лиганд-зависимыми факторами ядерной транскрипции, экспрессируемыми на высоких уровнях в женских органах,

критически важных для осуществления репродуктивной функции, включая яичники, матку, шейку матки, молочные железы и гипофиз (Muñoz et al., 2007).

В 1991 году был обнаружен полиморфизм *Pvu II* в гене эстрогенового рецептора (Rothschild et al., 1991) и исследована его связь с многоплодием свиней (Rothschild et al., 1994; 1996). Позднее были выявлены ассоциации полиморфных вариантов гена *ESR1* с различными хозяйственно-полезными признаками (Terman et al., 2006; Horogh et al., 2006; Balatsky et al., 2012). Было также обнаружено статистически значимое влияние генотипа по *ESR1* на фенотипические показатели количества поросят при рождении (TNB и NBA) и на величину EBV для признака «средняя масса поросят при рождении» у свиней крупной белой породы (Мельникова и др., 2019). Отмечается также, что свиноматки с генотипом CC отличались от остальных лучшими фенотипическими и генетическими характеристиками. Вместе с тем, не было установлено ассоциаций маркера *ESR1* с фенотипом свиней породы ландрас по показателям воспроизводства, однако средние значения EBV по числу всех и живорожденных поросят оказались значимо выше у животных с гетерозиготным генотипом: $XEBV(AC) = +0,10$, при том что $XEBV(CC) = 0,00$ и $XEBV(AA) = -0,10$. По признаку «средняя масса поросенка при рождении» лучшими показателями характеризовались свиноматки обеих пород с генотипом CC (Мельникова и др., 2019). Свиноматки второго опороса с генотипом BB по *ESR1* имели значительно большее количество поросят-отъемышей по сравнению с свиноматками AB с тенденцией к различиям между гомозиготами по количеству живорожденных поросят и по количеству отъемышей в линии свиней ландрас × крупная белая (Topigs 20) (Mencik et al., 2019). Свиноматки с генотипом AB дали самые большие по размеру гнезда, в то время как обладательницы генотипа BB показали лучшие показатели по количеству мумий, количеству мертворожденных поросят и продолжительности периода от отъема до следующей охоты. Этот результат согласуется с предыдущими исследованиями о том, что аллель В гена *ESR* имеет тесную связь с количеством поросят в гнезде (Rothschild et al., 1991). С использованием SLAF-seq были идентифицированы дифференциально отобранные регионы (DSR, differentially selected regions) у свиней пород ландрас, мэйшан и эрхулиан, один из которых включал ген *ESR1* (Li et al., 2017). Таким образом, многочисленными исследованиями показано наличие ассоциаций гена *ESR* с репродуктивными признаками свиней, что позволяет использовать *Pvu II* полиморфизм в гене эстрогенового рецептора в качестве генетического маркера воспроизводительных качеств свиней.

Еще одним ДНК-маркером, ассоциированным с продуктивными признаками свиней, является мутация G3052A гена *IGF2* – инсулиноподобного фактора роста-2. Эта мутация была обнаружена (Van Laere et al., 2003) в эволюционно консервативном CpG островке, функция которого неизвестна (Amarger et al., 2002). Ген *IGF2* относят к импринтинговым генам. Показано, что отцовские аллели этого гена у свиней влияют на рост мышц, отложение жира и размеры сердца (Van Laere et al., 2003). Мутация расположена в высококонсервативном острове CpG, который гипометилирован в скелетных мышцах и отменяет сайт связывания ZBED6 - ядерного фактора, который репрессирует транскрипцию *IGF2*, что приводит к 3-х кратному усилению экспрессии *IGF2* в скелетных мышцах (Markljung et al., 2009). Было показано, что эта мутация влияет как на состав туши, так и на размер окорока (López-Buesa et al., 2014), при этом было отмечено увеличение мононенасыщенных жирных кислот (MUFA) и снижение содержания полиненасыщенных жирных кислот (PUFA) в окороке у свиней – носителей аллеля А. Ранее нами было показано, что животные с генотипом AA по *IGF2* имели достоверно лучшие EBV по признакам мясной и откормочной продуктивности, превосходя особей, гомозиготных по альтернативному аллелю G (Мельникова и др., 2019).

Наиболее известна тест-система идентификации полиморфизма гена *ESR1*, предусматривающая амплификацию фрагмента гена длиной 120 п.н. (Short et al., 1997). После гидролиза эндонуклеазой *Pvu II* при разделении продуктов рестрикции в геле визуализируются фрагменты длиной 120 п.н., характерные для аллеля А и 65+55 п.н., характерные для аллеля В. Фрагменты такой длины сложно разделить при стандартном 2%-ном агарозном гель-электрофорезе. Ранее нами была разработана тест-система, предусматривающая амплификацию фрагмента гена длиной 140 п.н., при этом после гидролиза образуются фрагменты длиной 140 п.н., характерные для аллеля А и 114+26 п.н., характерные для аллеля В (Костюнина, 2016).

Для идентификации полиморфизма *IGF2* была предложена тест-система на основе ПЦР с последующим пиросеквенированием (Van Laere et al., 2003). Предложена тест-система, предусматривающая амплификацию фрагмента гена длиной 198 п.о., причем один из праймеров на 3' конце содержал замену, приводящую к появлению сайта рестрикции эндонуклеазы Taq I у животных-носителей аллеля G, поскольку без модификации ПДРФ-анализ невозможен в силу отсутствия сайта рестрикции (Костюнина, 2016).

Несмотря на относительно низкую трудоёмкость и себестоимость ПЦР-ПДРФ анализа, использование этого метода сопряжено с рядом особенностей: опыт оператора, идентифицирующего генотипы; успешность рестрикционного гидролиза (наличие случаев недорестрикции); время анализа с момента постановки реакции ПЦР до идентификации генотипов в геле составляет более 12 часов. Оптимизация тест-систем и диагностикумов в части снижения себестоимости и трудоемкости, а также повышения точности за счёт нивелирования фактора субъективности, является практической значимой. Прогресс, достигнутый за последние десятилетия в области детекции полиморфизмов, позволяет использовать альтернативные методы идентификации генетических вариантов. Одним из таких методов является ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ), который был использован нами при разработке тест-систем анализа полиморфизма генов *ESR1* и *IGF2*. Данный метод позволяет идентифицировать генотипы в течение 2-2,5 часов с момента постановки ПЦР, идентификация генотипов осуществляется в автоматическом режиме, тем самым снижается субъективность специалиста при определении генотипов животных. Следует также отметить более низкую себестоимость генотипирования, поскольку отсутствует потребность в использовании дорогостоящих реагентов: агарозы, эндонуклеаз рестрикции, а синтез олигонуклеотидов и зондов может быть осуществлен в отечественных компаниях, оказывающих такие услуги.

Целью настоящей работы было усовершенствование тест-систем для детекции полиморфизма генов *ESR1* и *IGF2* методом ПЦР в реальном времени с возможностью идентификации генотипов в мультиплексном формате.

Материал и методы

Исследования проведены в отделе биотехнологии и молекулярной диагностики животных ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста в 2020-2021 гг. В проведении исследований было использовано оборудование Центра коллективного пользования «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. В качестве материала для создания серии референтных образцов с известными генотипами по *ESR1* и *IGF2* ($n = 96$) были использованы образцы ткани (ушной выщип) хряков породы ландрас ($n = 48$) и крупная белая ($n = 48$). ДНК выделяли набором ДНК-Экстран 2 (ООО «Синтол», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Создание серии референтных генотипов проводили посредством ПЦР-ПДРФ анализа (Костюнина, 2016). Определяли генотипы по ДНК-маркерам *ESR1* (GG→AT в позициях 65-68, Accession No. HF947272.1, GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и *IGF2* (G→A в позиции 16144, Accession No. AY242112). В качестве базового метода для моделирования тест-системы для детекции полиморфизма генов *ESR1* и *IGF2* был выбран метод ПЦР-РВ. Суть разработанных тест-систем заключается в использовании двух специфических праймеров и двух аллель-специфичных зондов, помеченных флуоресцентными метками, для каждого ДНК-маркера. Генотипирование выполняли на приборе QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

Реакции проводили в 15 мкл реакционной смеси следующего состава: 1xПЦР буфер (16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67.7 mM Трис-НСl, pH 8.8, 0.1% (v/v) Tween 20, 1.5 mM MgCl_2), 0,2 mM дНТФ, 10 пмоль каждого из праймеров, 2 mM MgCl_2 , 1 Ед Taq-полимеразы и 1 мкл ДНК при следующем температурно-временном режиме: 1 цикл - 95°C 5 мин, 44 цикла последовательно: 94°C – 45 с., 62°C – 45 с., 72°C – 45 с., заключительная элонгация при 72°C – 8 мин. Результативность тест-систем осуществляли путем сравнения генотипов, определенных с использованием усовершенствованных тест-систем с результатами, полученными при использовании ПЦР-ПДРФ метода.

Результаты и обсуждение

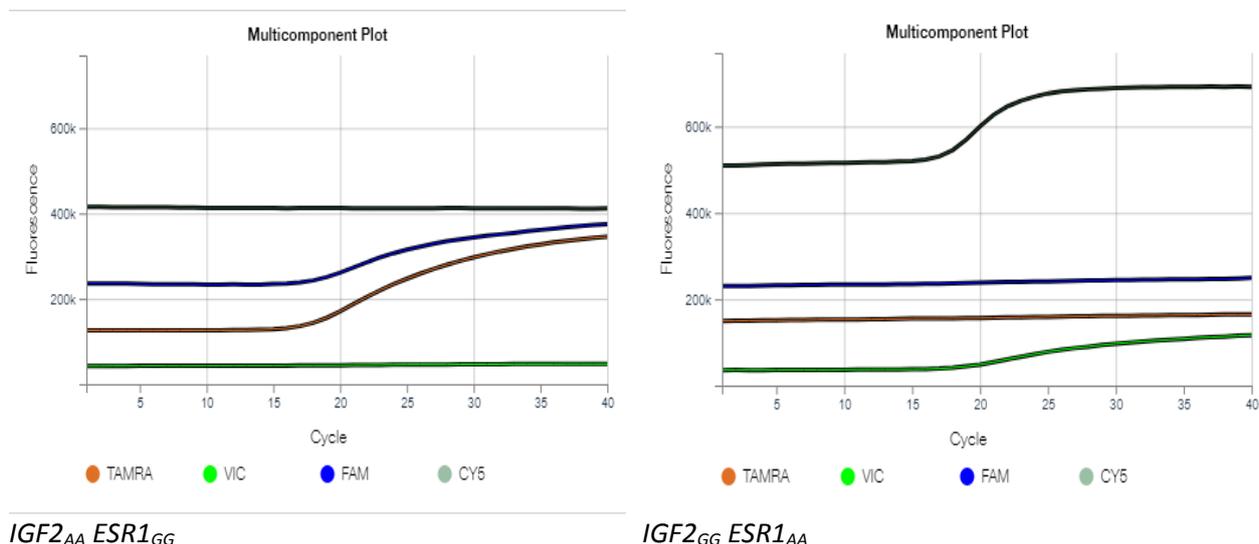
При создании дизайна тест-систем детекции полиморфизма генов *ESR1* и *IGF2* учитывали возможность определения генотипов по исследуемым ДНК-маркерам в мультиплексном формате. Создаваемые тест-системы базируются на определении нуклеотидных замен в гене эстрогенового рецептора *ESR1* GG→AT в позициях 65-68 гена (№ HF947272.1, генный банк) и гене инсулиноподобного фактора роста 2 *IGF2* G→A в позиции 16144 (№ AY242112, генный банк). С этой целью были выбраны соответствующие участки генов *ESR1* и *IGF2*, содержащие целевые точечные мутации.

Подбор праймеров осуществляли с использованием программного обеспечения Primer3web, v. 4.0.0 (Untergasser et al., 2012), учитывая следующие условия: 1) температура отжига: +60°C (минимальная), +62°C (желаемая), +67°C (максимальная); 2) соотношение GC: 40% (минимальное), 50% (желаемое), 55% (максимальное); 3) длина фрагмента в пределах 150-200 пар оснований (п.о.).

Для диагностики полиморфизма гена *ESR1* были подобраны следующие праймеры: ESR1-TM-F GTG CTT TAT TCA CTT CGA GGG TCA GTC CAA TTA G и ESR1-TM-R CAG AGT ATA TCT AAA GAT GCA GAA TCA AGT TTT ATG AG, позволяющие амплифицировать фрагмент гена; флуоресцентно-меченные зонды, предназначенные для идентификации аллеля G ESR1-TM-GG /TAMRA/- CCA GCT GTT CTT GTC AAG TC /-BHQ-2/ и аллеля A ESR1-TM-AT /Cy5/- CCA ACT TTT CTT GTC AAG TCC /-BHQ-2/.

Для детекции полиморфизма гена *IGF2* предложены праймеры IGF2-TM-F CCG CCG CGC CCC ACG CGC TC и IGF2-TM-R GCG GCA GCC GGG CCG CGG CTT, амплифицирующие фрагмент гена, содержащего целевую мутацию, а также флуоресцентно-меченные зонды IGF2-TM-A /5-FAM/- CGC TGT GAG CCT AGG C /-BHQ-1/ и IGF2-TM-G /R6G/- CGC TGC GAG CCT AGG C /-BHQ-1/, позволяющие диагностировать аллели A и G, соответственно.

На рис. 1 показаны кривые флуоресценции, полученные при генотипировании с использованием тест-систем идентификации генотипов по генам *ESR* и *IGF2* в мультиплексном режиме, т.е. проводимые в одной пробирке одновременно.



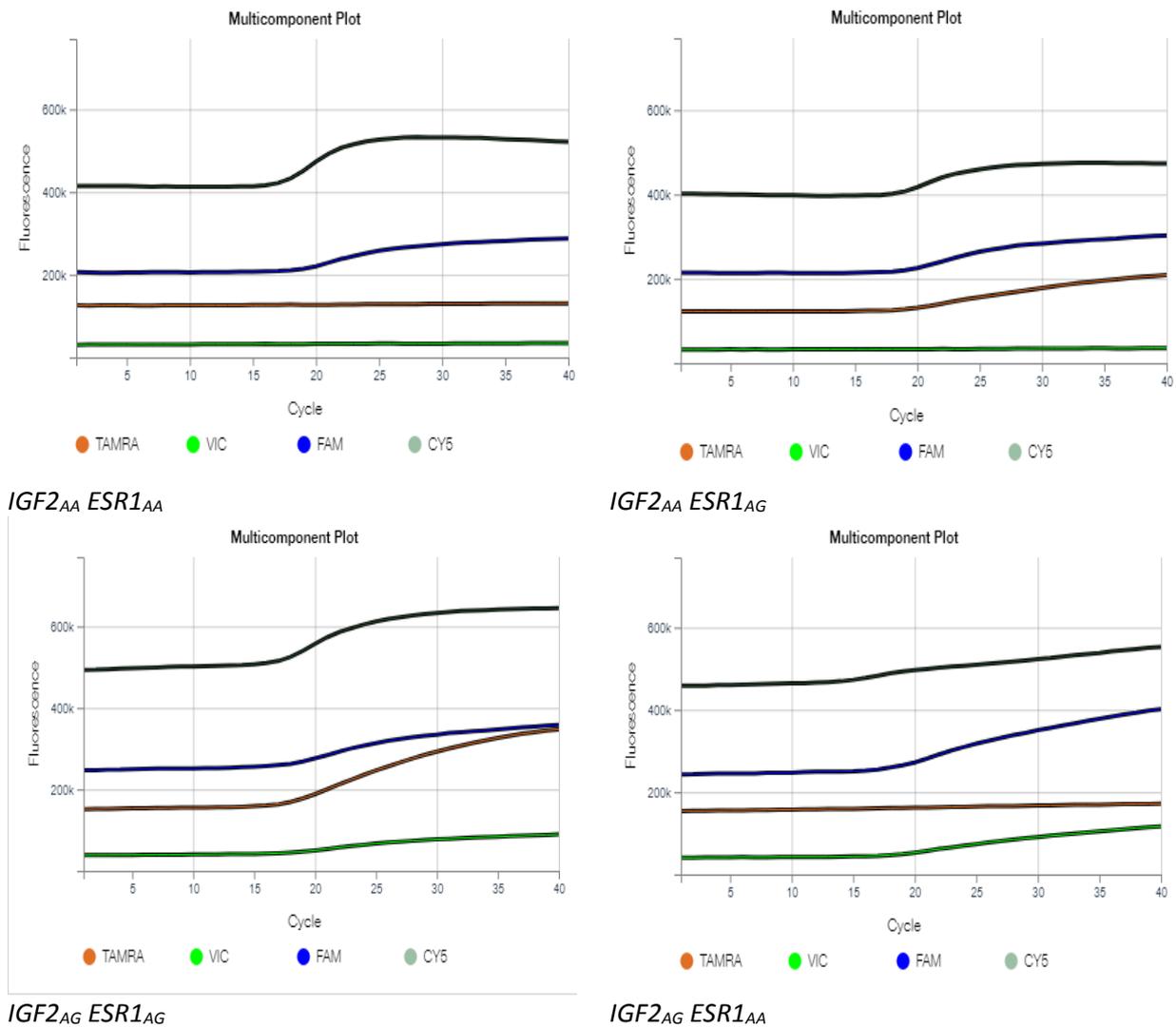


Рис. 1. Кривые флуоресценции при генотипировании с использованием тест-системы идентификации генотипов по генам *IGF2* и *ESR1*. Канал VIC – *IGF2_G*, канал FAM – *IGF2_A*, канал TAMRA – *ESR_G*, канал CY5 – *ESR_A*.

Как показано на рис. 1, идентификация генотипов производится по наличию или отсутствию сигналов в соответствующих каналах. Кривые плавления позволяют точно идентифицировать генотипы животных, мультиплексная амплификация позволяет снизить трудовые, материальные и временные затраты, позволяя осуществлять одновременную идентификацию генотипов по двум ДНК-маркерам.

Сопоставление результатов генотипирования 96 образцов, генотипы которых были определены с использованием предложенных тест-систем, а также традиционными методами, используемыми в лаборатории молекулярных основ селекции ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, показали 100% совпадение.

В табл. 1 представлены результаты генотипирования свиней пород ландрас и крупная белая, полученных с использованием новых тест-систем.

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов *ESR1* у свиней породы крупная белая и ландрас

Породы	n	Частота встречаемости аллелей		Частота встречаемости генотипов		
		1	2	11	12	22
<i>ESR1</i>						
Крупная белая	305	0,636	0,364	42,62	41,97	15,41
Ландрас	302	0,967	0,033	94,04	5,30	0,66
<i>IGF2</i>						
Крупная белая	305	0,823	0,177	68,52	27,54	3,94
Ландрас	302	0,219	0,781	11,92	19,87	68,21

Примечания: 1 - аллель А для *ESR* и А для *IGF2*; 2 - аллель G для *ESR1* и G для *IGF2*.

Генотипирование с использованием разработанных тест-систем позволило определить частоты аллелей и генотипов по *ESR1* и для *IGF2*. Частота аллеля А по гену *ESR1* в исследуемых группах свиней составила 0,636 и 0,967 для крупной белой и ландраса, соответственно. Следует отметить, что для свиней крупной белой породы желательным является аллель G, для свиней породы ландрас – аллель А. По гену *IGF2* частота желательного аллеля А достигала 0,823 и 0,219 у свиней пород крупная белая и ландрас, соответственно. Таким образом, продемонстрирована возможность использования предложенных тест-систем генотипирования по генам *ESR1* и *IGF2*, позволяющих идентифицировать генетические варианты по указанным ДНК-маркерам.

Разработанные тест-системы предусматривают использование реактивов отечественных производителей, позволяют снизить временные и материальные затраты, повысить точность генотипирования и могут быть применимы для генотипирования свиней различных пород.

Исследования выполнены в рамках государственного задания № 121052600358-5.

Список литературы

1. Костюнина О.В. Характеристика аллелофонда и анализ ассоциаций ДНК-маркеров с хозяйственно-полезными признаками свиней: автореф. дисс... д.б.н., ВИЖ, 2016. 39 с.
2. Мельникова Е.Е., Бардуков Н.В., Форнара М.С., Костюнина О.В., Сермягин А.А., Брем Г., Зиновьева Н.А. Влияние генотипов по ДНК-маркерам на воспроизводительные качества свиней пород крупная белая и ландрас. // Сельскохозяйственная биология. 2019, Т. 54. № 2. С. 227-238. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.2.227rus
3. Мельникова Е.Е., Бардуков Н.В., Форнара М.С., Костюнина О.В., Сермягин А.А., Зайцев А.М., Зиновьева Н.А. Влияние генотипов по *IGF2*, *SSCAR* и *MC4R* на фенотипические показатели и племенную ценность свиней по хозяйственно полезным признакам. // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 4. С. 723-734. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.4.723rus
4. Amarger V., Nguyen M., Van Laere A.S., Braunschweig M., Nezer C., Georges M., Andersson L. Comparative sequence analysis of the *INS-IGF2-H19* gene cluster in pigs. // *Mamm. Genome*. 2002. Vol. 13. nr 7. P. 388-98. DOI: 10.1007/s00335-001-3059-x
5. Balatsky V.N., Saenko A.M., Grishina L.P. Polymorphism of the estrogen receptor 1 locus in populations of pigs of different genotypes and its association with reproductive traits of large white sows. *Cytology and Genetics*. 2012. Vol. 46. nr 4. P. 233-237. DOI:10.3103/s0095452712040020
6. Horogh G., Zsolnai A., Komiosi I., Nyiri A., Anton I., Fesus L. Oestrogen receptor genotypes and litter size in Hungarian Large White pigs // *J. Anim. Breed. Genet*. 2005. Vol. 122. nr 1. P. 56-61.
7. Li Z., Wei S., Li H., Wu K., Cai Z., Li D., Wei W., Li Q., Chen J., Liu H., Zhang L. Genome-wide genetic structure and differentially selected regions among Landrace, Erhualian, and Meishan pigs using specific-locus amplified fragment sequencing. // *Sci. Rep*. 2017. Vol. 7. P. 10063. DOI: 10.1038/s41598-017-09969-6.
8. López-Buesa P., Burgos C., Galve A., Varona L. Joint analysis of additive, dominant and first-order epistatic effects of four genes (*IGF2*, *MC4R*, *PRKAG3* and *LEPR*) with known effects on fat content and fat distribution in pigs. // *Anim Genet*. 2014. Vol. 45. nr 1. P. 133-137. DOI: 10.1111/age.12091

9. Markljung E., Jiang L., Jaffe J.D., Mikkelsen T.S., Wallerman O., Larhammar M. et al. ZBED6, a novel transcription factor derived from a domesticated DNA transposon regulates IGF2 expression and muscle growth. // PLoS Biol. 2009. Vol. 7. nr 12. P. e1000256. DOI:10.1371/journal.pbio.1000256
10. Mencik S., Vukovic V., Spehar M., Modric M., Ostovic M., Ekert Kabalin A. Association between ESR1 and RBP4 genes and litter size traits in a hyperprolific line of Landrace × Large White cross sows. // Veter. Med. 2019. Vol. 64. P. 109-117.
11. Muñoz G., Ovilo C., Estellé J., Silió L., Fernández A., Rodriguez C. Association with litter size of new polymorphisms on ESR1 and ESR2 genes in a Chinese-European pig line. // Genet. Sel. Evol., BioMed Central. 2007. Vol. 39. nr 2. P. 195-206.
12. Rothschild M., Jacobson C., Vaske A., Tuggle C., Short T.H., Sasaki S., Eckardt G.R., McLaren D.G. A major gene for litter size in pigs. In: Proc. 5th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. Guelph, ON, Canada. 1994. Vol. 21. P. 225-228.
13. Rothschild M., Jacobson C., Vaske D., Tuggle C., Wang L., Short T., Eckardt G., Sasaki S., Vincent A., McLaren D., Southwoods O., van der Steen H., Mileham A., Plastow G. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs // Proc. Nat. Acad.Sci. USA. 1996. Vol. 93. nr 1. P. 201-205.
14. Rothschild M.F., Larson R.G., Jacobson C.D., Pearson P. Pvu II polymorphisms at the porcine estrogen receptor locus (ESR) // Anim. Genet. 1991. Vol. 22. P. 448.
15. Short T.H., Rothschild M.F., Southwood O.I., McLaren D.G., De Vries A., Van der Steen H., Eckardt G.R., Tuggle C.K., Helm J., Vaske D.A., Mileham A.J., Plastow G.S. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. // Anim. Sci. 1997. Vol. 75. P. 3138-3142.
16. Terman A., Kmiec M., Polasik D. Estrogen receptor gene (ESR) and semen characteristics of boars. // Arch. Tierz. 2006. Vol. 1. P 71-76.
17. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3 - new capabilities and interfaces. // Nucl. Acids Res. 2012. Vol. 40. nr 15. e115.
18. Van Laere A.S., Nguyen M., Braunschweig M., Nezer C., Collette C., Moreau L., Archibald A.L., Haley C.S., Buys N., Tally M., Andersson G., Georges M., Andersson L. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. // Nature. 2003. Vol. 425. nr 6960. P. 832-836. DOI:10.1038/nature02064

References (for publications in Russians)

1. Kostyunina O.V. Kostyunina O.V. *Kharakteristika allelofonda i analiz assotsiatsii DNK-markerov s khozyaistvenno-poleznymi priznakami svinei* (Characterization of the allele pool and analysis of associations of DNA markers with economically useful traits of pigs). Extended Abstract of Diss. Dr. Sci. Biol., VIZH, 2016. 39 p.
2. Mel'nikova E.E., Bardukov N.V., Fornara M.S., Kostyunina O.V., Sermyagin A.A., Brem G., Zinov'eva N.A. [Effect of genotypes for DNA markers on the reproductive qualities of pigs of the Large White and Landrace breeds]. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya - Agricultural Biology*. 2019. Vol. 54. nr 2. P. 227-238. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.2.227rus
3. Mel'nikova E.E., Bardukov N.V., Fornara M.S., Kostyunina O.V., Sermyagin A.A., Zaitsev A.M., Zinov'eva N.A. [Effect of IGF2, CCKAR and MC4R genotypes on phenotypic indicators and breeding value of pigs for economically useful traits]. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya - Agricultural Biology* 2018. Vol. 53. nr 4. P. 723-734. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.4.723rus

UDC: 636.4:575.224.22:57.038.7

Detection of ESR1 and IGF2 genes polymorphism by real time PCR method

Bardukov N.V., Svezhentseva N.A., Fornara M.S., Kostyunina O.V.

*Federal Research Center of Animal Husbandry - Ernst VIZh, Podolsk - Dubrovitsy,
Moscow oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. The routine use of genotyping results for DNA markers is regulated by the Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation in 2021 and is carried out in a number of pig breeding enterprises. DNA markers of genes ESR1 (affects reproductive traits of pigs) and IGF2 (gene for insulin-like growth factor-2 associated with meat and fattening qualities of pigs) are among the most popular in practical work. Optimization of test systems and diagnostic kits in terms of reducing the cost and labor intensity, as well as increasing accuracy by leveling the subjectivity factor is characterized by practical significance. The progress achieved over the past decades in the field of polymorphism detection allows the use of alternative methods for the identification of genetic variants. One of these methods is real-time PCR (RT-PCR), which the authors used in the development of test systems for the analysis of polymorphism of the ESR and IGF2 genes. This article outlines the principles of creating test systems for detecting polymorphism of the above genes by RT-PCR, and the design of the system provides for amplification and genotyping of DNA in both simplex and multiplex modes, and demonstrates the results of genotyping using them. The proposed test systems provide for the use of reagents from domestic manufacturers, reduce time and material costs, and improve the accuracy of genotyping. Comparison of research results using the developed test system and those obtained using traditional genotyping methods (PCR-RFLP) showed 100% agreement. Thus, the proposed test systems for detecting polymorphism of the ESR1 and IGF2 genes by RT-PCR can be successfully used for genotyping pigs of various breeds.

Keywords: pigs, gene polymorphism, RT-PCR, IGF2, ESR1, productive traits

Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology. 2021. 4: 79-86

Поступило в редакцию: 10.11.2021 Получено после доработки: 20.12.2021

Сведения об авторах:

Бардуков Николай Владимирович, м.н.с., bardukv-nikolajj@mail.ru

Свеженцева Надежда Александровна, асп., nadezhda.svezhenceva@mail.ru

Форнара Маргарет Сержевна, к.б.н., с.н.с., margaretfornara@gmail.com

Костюнина Ольга Васильевна, д.б.н., вед.н.с., зав. лаб., тел. +7(496)765-11-02,
kostolan@yandex.ru