

ДНК-ТИПУВАННЯ СВИНЕЙ ЗА ГЕНОМ ТЕЛОМЕРАЗНОЇ ЗВОРОТНЬОЇ ТРАНСКРИПТАЗИ (*TERT*)

А. М. САЄНКО, В. М. БАЛАЦЬКИЙ, Є. О. БУДАКВА, М. Ю. ПЕКА, С. М. КОРИННИЙ

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН України (Полтава Україна)

<https://orcid.org/0000-0002-1633-4799> – А. М. Саєнко

<https://orcid.org/0000-0002-6034-3852> – В. М. Балацький

<https://orcid.org/0000-0001-5941-1953> – Є. О. Будаква

<https://orcid.org/0000-0003-0612-1164> – М. Ю. Пека

<https://orcid.org/0000-0002-1649-3079> – С. М. Корінний

saenko_artem@meta.ua

Довжина теломерної ДНК і поліморфізм гену *TERT* (*Telomerase Reverse Transcriptase*, теломераза зворотня транскриптаза) можуть бути основою для розроблення молекулярно-генетичних маркерів продуктивних ознак сільськогосподарських тварин, зокрема свиней.

Метою роботи було проаналізувати бази даних первинної структури гену *TERT* свині, визначити однонуклеотидні поліморфізми (*SNPs*), розробити систему ДНК-типування тварин за геном *TERT*.

Зразки біоматеріалів (кров, щетина) для ДНК-типування були відібрані з провідних господарств України в групах 4-х порід свиней і гібридних тварин. Виділення ДНК з біоматеріалу здійснювали за допомогою реагенту «*Chelex 100*». Генотипування тварин за локусом теломеразы проводили на основі стандартних методик здійснення полімеразної ланцюгової реакції та поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей під час аналізу первинної структури гену *TERT* проводилось з використанням програмного забезпечення *MegaX* і сервісу *Blast*. Дизайн структури олігонуклеотидних праймерів для ПЛР проводився за допомогою комп'ютерної програми *Primer3Plus*.

Під час розроблення методики генотипування свиней за геном *TERT* було проведено аналіз баз даних щодо первинної структури гену, виявлено ділянку гену зі значною кількістю *SNPs*, здійснено дизайн олігонуклеотидних праймерів для ПЛР-ампліфікації даної ділянки гену. У роботі подано умови ампліфікації фрагмента гену *TERT*, його розщеплення ендонуклеазою рестрикції *RsaI* за місцезоташуванням *SNP rs698799571*, електрофорез отриманих ДНК-фрагментів рестрикції у 8% поліакриламідному гелі, а також визначено генотипи тварин. Розроблена техніка ДНК-типування за геном *TERT* була використана для аналізу його поліморфізму в групах 4-рьох чистопорідних свиней і групі гібридних тварин. У чистопорідних свиней був присутній мономорфний гомозиготний генотип *TERT^{AA}*. Поліморфізм гену *TERT* за *SNP rs698799571* виявлено у групі свиней фінального ірландського гібриду (*ВБ х Л*) х *Максгро* (генотип *TERT^{AT}*).

Враховуючи те, що в Україні досліджень за геном теломеразы та визначення поліморфізму *TERT* за *SNP rs698799571* у свиней ще не проводили, розроблена техніка ДНК-типування за геном теломеразы має перспективу щодо подальшого визначення розподілу алелів і генотипів у вітчизняних і завезених із закордону породах, а також у маркер-асоційованій селекції.

Ключові слова: теломераза зворотня транскриптаза, *TERT*, ДНК-типування, маркер-асоційована селекція, поліморфізм, сайт рестрикції, ПЛР-ПДРФ, свині

DNA TYPING BY TELOMERASE REVERSE GENE TRANSCRIPTASE (*TERT*)

A. M. Saienko, V. N. Balatsky, Ye. O. Budakva, M. Y. Peka, S. M. Korinnyi

Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production of NAAS (Poltava, Ukraine)

The length of the telomeric DNA and polymorphism of the TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) gene can be the basis for the development of molecular genetic markers for the productive traits of agricultural animals, in particular pigs.

The purpose of the work was to analyze the databases of the primary structure of the pig TERT gene, to determine single nucleotide polymorphisms (SNPs), to develop a DNA system for animal typing based on the TERT gene.

Samples of biomaterials (blood, bristles) for DNA typing were selected from the leading farms of Ukraine in groups of 4 breeds of pigs and hybrid animals. Isolation of DNA from biomaterial was carried out using the Chelex 100 reagent. Genotyping of animals by the telomerase locus was carried out on the basis of standard methods of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The alignment of nucleotide sequences during the analysis of the primary structure of the TERT gene was carried out using the MegaX software and the Blast service. Design of the structure of oligonucleotide primers for PCR was carried out using the computer program Primer3Plus.

During the development of the method of pigs genotyping according to TERT gene, a database analysis was carried out regarding the primary structure of the gene, a region of the gene with a significant number of SNPs was identified, and oligonucleotide primers were designed for PCR amplification of this region of the gene. The study presents the conditions of amplification of the TERT gene fragment, its cleavage by restriction endonuclease RsaI at the location of SNP rs698799571, electrophoresis of the obtained restriction DNA fragments in an 8% polyacrylamide gel, and the genotypes of the animals are also determined. The developed DNA typing technique for the TERT gene was used to analyze its polymorphism in groups of 4 purebred pigs and a group of hybrid animals. Monomorphic homozygous TERT^{AA} genotype was present in purebred pigs. The polymorphism of the TERT gene by SNP rs698799571 was detected in a group of pigs of the final Irish hybrid (LW x L) x Maxgro (TERT^{AT} genotype).

Considering the fact that studies on the telomerase gene and determination of the TERT polymorphism for SNP rs698799571 in pigs have not yet been conducted in Ukraine, the developed technique of DNA typing by the telomerase gene has a perspective for further determination of the distribution of alleles and genotypes in domestic and imported breeds, as well as in marker-associated selection.

Keywords: telomerase reverse transcriptase, TERT, DNA typing, marker-associated selection, polymorphism, restriction site, PCR-RFLP, pigs

Вступ. Теломерна ДНК і теломеразна зворотня транскриптаза (теломераза) активно вивчаються у різних аспектах впливу на фізіологічні та біохімічні процеси в організмі людини і тварин [1, 2]. Теломери являють собою ДНК, що повторюється, виявлену на кінцях хромосом, які за відсутності відновлювальних процесів коротшають при реплікації клітин і є причиною старіння. У більшості організмів основним механізмом підтримки довжини теломер служить добудовування теломерної ДНК ферментом теломеразою (*TERT*). Довжина теломерної ДНК і поліморфізм гену *TERT* (*Telomerase Reverse Transcriptase*, *теломеразна зворотня транскриптаза*) можуть бути основою для розроблення молекулярно-генетичних маркерів продуктивних ознак та здоров'я сільськогосподарських тварин, зокрема свиней, і впровадження маркер-асоційованої селекції [3, 4].

У ряді досліджень показано, що у гені *TERT* різних тварин наявні поліморфізми, які можуть бути використані у якості молекулярно-генетичних маркерів. Так, показана можливість використання поліморфізмів у гені *TERT* у якості оцінки ступеня диференціації між кінями англо-арабської та гуцульської порід, а також перевірки батьківства [4, 5]. Є роботи, в яких показано, що можливе успадкування більш довгих теломер завдяки подовженню теломер у сперматозоїдів, що у свою чергу уповільнить процеси старіння, а у перспективі для

сільського господарства збільшить продуктивну придатність тварин [2]. Зміни у регуляції та у самому гені *TERT* призводять до більшої схильності до захворювань [3, 6], що безпосередньо має впливати на продуктивність тварини. Типування свиней за вказаним геном може дати корисну інформацію для відбору тварин зі сприятливим для розвитку продуктивних ознак генотипом. Тим не менше, на даний час невідомо, чи можлива маркерна селекція за вказаним геном. Якщо буде знайдений поліморфізм за геном *TERT* у свиней і встановлений його зв'язок з продуктивними ознаками тварин, це дасть підґрунтя для селекційної роботи, спрямованої на закріплення певних ознак в досліджуваній популяції.

Мета досліджень. Проаналізувати бази даних первинної структури гену *TERT* свині, визначити однонуклеотидні поліморфізми (*SNP*), розробити систему ДНК-типування тварин за геном *TERT*.

Матеріали та методи досліджень. Зразки біоматеріалів (кров, щетина) були відібрані з провідних господарств України: ТОВ «Маяк», село Соснівка Гадяцького р-ну Полтавської обл. – велика чорна порода (10 голів); Державне підприємство «ДГ «Степне», село Степне Полтавського р-ну Полтавської області – велика біла порода внутрішньопородного типу УВБ-1 (10 гол.); ПРАТ «Племзавод «Степной», селище Заповітне Кам'янсько-Дніпровського р-ну, Запорізької обл. – велика біла порода англійської селекції (20 гол.); ДП «Деркульський кінзавод № 63», село Новодеркул Біловодського р-ну Луганської обл. – українська м'ясна порода (10 гол.); ТОВ «НВП «Глобинський свинокомплекс» – фінальний ірландський гібрид (ВБ х Л) х Максгро (велика біла × ландрас) × Максгро (10 голів); із банку ДНК лабораторії генетики Інституту свинарства і АПВ НААН – в'єтнамська звислобруха порода (13 гол.).

Виділення ДНК з біоматеріалу здійснювали за допомогою реагенту «Chelex 100» [7]. Генотипування тварин за локусом теломерази проводили на основі стандартних методик полімеразної ланцюгової реакції та поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ) [8].

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей під час аналізу первинної структури гену *TERT* проводилось з використанням програмного забезпечення MegaX [9] і сервісу Blast [10]. Дизайн структури олігонуклеотидних праймерів для ПЛР проводився за допомогою комп'ютерної програми Primer3Plus [11].

Результати досліджень. З метою пошуку однонуклеотидних поліморфізмів проаналізовано бази даних первинної структури гену *TERT* (*Ensembl ID*: ENSSSCG00000017118 (gene sequence), *NCBI Reference Sequence*: NM_001244300.2 (mRNA sequence)). Для дослідження обрано фрагмент гену, що містить значну кількість однонуклеотидних поліморфізмів: *rs789641834*, *rs698799571*, *rs320317081*, *rs706045634*, *rs696805316* (рис. 1). Для розроблення методу генотипування свиней за геном *TERT* було обрано *SNP rs698799571*.

```

          А      Т
1   acgacgtgct caccacctg ttggcgcgct gcgcgCtggtA cctgctgggtg cccccgagtt
          №1   №2

          Т
61  ggcctacca ggtgtgcggg cgcctActct atgacctcta caccgcagcg gaggctcggc
          №3

          С
121 ccatgcgaca caagggccag accccgactg gcctcggact caccgGcccc gtttgcaatg
          №4
181 gggaaagccgg gcgaccccaag gagcagaggg cgcaaggtgt gaggcgacgt cggggcagag
          А
241 cggGgggaca tccacttcca gccaaagaggc
          №5

```

Рис. 1. Фрагмент гену *TERT* свині (270 п. н.)

№ 1 – *rs789641834* (C/A), № 2 – *rs698799571* (A/T), № 3 – *rs320317081* (A/T), № 4 – *rs706045634* (G/C), № 5 – *rs696805316* (G/A)

червоним виділено місенс *SNP*, зеленим – синонімічний *SNP*, підкреслювання позначає положення праймерів, gt↓ac – сайт рестрикції для ендонуклеази *RsaI*

Підібрана структура олігонуклеотидних праймерів для ПЛР-ампліфікації визначеного фрагмента гену теломерази свині показана на рис. 1 та у табл. 1. Виконана оптимізація умов ПЛР-ампліфікації фрагмента гену *TERT*, його розщеплення ендонуклеазою рестрикції *RsaI* і електрофорезу отриманих ДНК-фрагментів рестрикції в поліакриламідному гелі. Параметри ампліфікації та рестрикції, які є етапами роботи з генотипування, а також генотипи тварин, наведені в табл. 1 та табл. 2.

1. Структура праймерів і програма ампліфікації

Ген	Програма ампліфікації	Структура праймерів
<i>TERT</i>	94°C – 3 хв.; 31 цикл: 94°C – 30 сек.; 65°C – 26 сек.; 72°C – 40 сек., та 72°C – 2 хв.	F: 5' ACGACGTGCTCACCCACCT -3
		R: 5' GCCTCTGGCTGGAAGTGG -3

2. Ендонуклеаза рестрикції, та прогнозовані фрагменти рестрикції і відповідні їм алелі

Ген/ендонуклеаза рестрикції	Алелі і відповідні фрагменти рестрикції в п. н.	
<i>TERT / RsaI</i>	A : 231+39	T : 270

Проведено електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації і рестрикції у 8% поліакриламідному гелі. Згідно результатів електрофорезу розміри отриманих ДНК-фрагментів відповідають очікуваним. Фрагмент ампліфікації знаходиться на рівні 270 п. н. (рис. 2). Більший фрагмент рестрикції розміром 231 п. н. на електрофореграмі згідно ДНК-маркеру виявляється у відповідному положенні (рис. 2). Менший фрагмент рестрикції розміром 39 п. н. на електрофореграмі має слабо виражене забарвлення та в деяких випадках може не виявлятися.

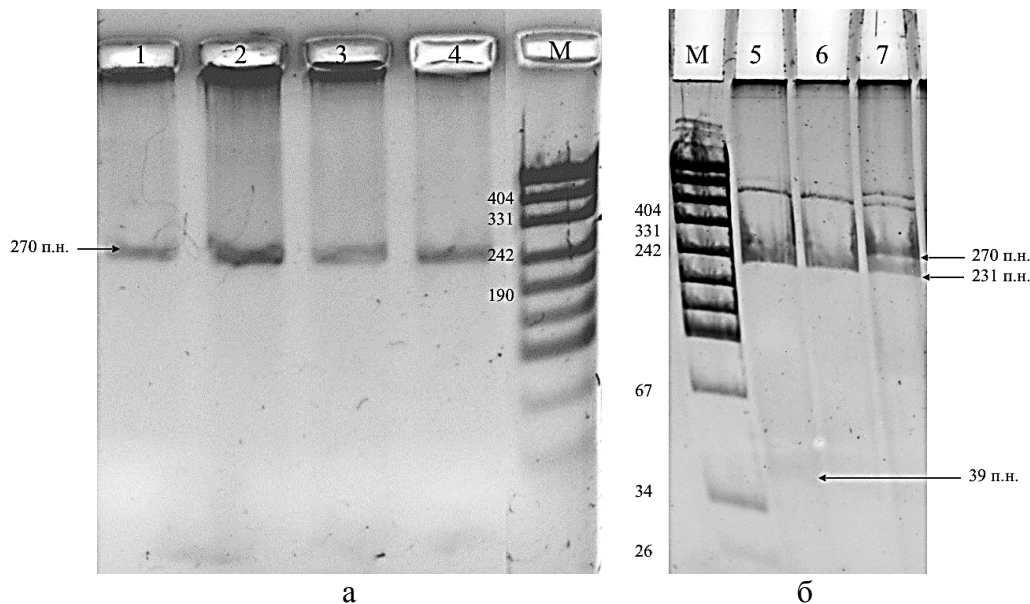


Рис. 2. Електрофореграми продуктів ампліфікації у агарозному 2% гелі (а) та продуктів рестрикції ендонуклеазою *RsaI* у 8% поліакриламідному гелі (б) фрагменту ДНК гену *TERT*
 М – маркер молекулярної маси pUC19 DNA/MspI; 1–4 – ампліфікати; 5–7 рестрикти (5–6 – тварини з генотипом АА, 7 – тварини з генотипом АТ)

ДНК-типування за *SNP rs698799571* у гені *TERT* виявило, що у вибірці чистопорідних свиней великої чорної, великої білої внутрішньопородного типу УВБ-1, української м'ясної, великої білої породи англійської селекції та в'єтнамської звислобрюхої порід був присутній

мономорфний гомозиготний генотип $TERT^{AA}$. Поліморфізм у гені $TERT$ виявлено у групі свиней фінального ірландського гібриду (генотип $TERT^{AT}$). Слід зазначити, що ірландський гібрид є результатом схрещування декількох порід свиней. Вочевидь, порода свиней, яка входить до складу гібриду має найбільшу частку альтернативного алеля, що і пояснює появу поліморфізму у гені $TERT$ саме у цій групі тварин. Можливо, типування у чистопорідному стані свиней, які використовувались для отримання фінального ірландського гібриду, дозволить виявляти поліморфізм у гені $TERT$ з високою частотою. Також, вочевидь, необхідно збільшити вибірку тварин за обраними породами, що показує необхідність продовження досліджень та перспективу подальшої роботи щодо виявлення поліморфізму за геном $TERT$.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Під час розроблення методики генотипування свиней за геном $TERT$ було проведено аналіз баз даних щодо первинної структури гену, виявлено ділянку гену зі значною кількістю SNPs, здійснено дизайн олігонуклеотидних праймерів для ПЛР-ампліфікації даної ділянки гену. У ході досліджень виконано оптимізацію умов ПЛР-ампліфікації фрагмента гену $TERT$, його розщеплення ендонуклеазою рестрикції $RsaI$ за місцезоташуванням $SNP rs698799571$, і електрофорезу отриманих ДНК-фрагментів рестрикції в поліакриламідному гелі.

Підібрані умови ПЛР-ПДРФ для генотипування за геном $TERT$ дозволяють коректно визначати генотипи тварин. Наявність на електрофореграмі після рестрикції ПЛР-амплікату фрагменту ДНК розміром 231 п. н. відповідає генотипу AA (наявний $RsaI$ -сайт рестрикції, 270 п. н. – генотипу TT (відсутній $RsaI$ -сайт рестрикції), двох ДНК-фрагментів розміром 270 п. н. і 231 п. н. – гетерозиготному генотипу AT.

Розроблена техніка ДНК-типуювання за геном $TERT$ була використана для аналізу його поліморфізму в групах 4-рьох чистопорідних свиней і групі гібридних тварин. У чистопорідних свиней був присутній мономорфний гомозиготний генотип $TERT^{AA}$. Поліморфізм гену $TERT$ за $SNP rs698799571$ виявлено у групі свиней фінального ірландського гібриду (генотип $TERT^{AT}$).

Враховуючи те, що в Україні досліджень за геном теломерази та визначення поліморфізму $TERT$ за $SNP rs698799571$ у свиней ще не проводили, розроблена техніка ДНК-типуювання за геном теломерази має перспективу щодо подальшого визначення розподілу алелів і генотипів у вітчизняних і завезених із закордону породах, а також у маркер-асоційованій селекції.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Зверева М. Э., Щербакова Д. М., Донцова О. А. Теломераза: структура, функции и пути регуляции активности. *Успехи биологической химии*. 2010. Т. 50. С. 155–202.
2. Eisenberg D. T. A., Kuzawa S. W. The paternal age at conception effect on offspring telomere length: mechanistic, comparative and adaptive perspectives. *Philosophical Transaction of the Royal Society. Series B. Biological Society*. 2018. Vol. 373, iss. 1741. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0442> (date of access: 14.11.2020).
3. Epel E. S., Blackburn E. H., Lin J., Dhabhar F. S., Adler N. E., Morrow J. D., Cawthon R. M. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2004. Vol. 101, iss. 49. P. 17312–17315. DOI: 10.1073/pnas.0407162101 (date of access: 12.12.2020).
4. Turner K. J., Vasu V., Griffin D. K. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells*. 2019. Vol. 8, No 73. P. 1–19. DOI: 10.3390/cells8010073 (date of access: 02.06.2021).
5. Ząbek T., Ząbek T. Z., Czapla P., Wnuk M., Lewińska A., Oklejewicz B., Bartosz G., Słota E. Genetic structure of Hucul and Anglo-Arabian horses at the Tert locus. *Annals of Animal Science*. 2012. Vol. 12, iss. 4. P. 483–494. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10220-012-0040-4> (date of access: 04.11.2020).
6. McAloney C. A., Silverstein K. A. T., Modiano J. F., Bagchi A. Polymorphisms within the Telomerase Reverse Transcriptase gene (TERT) in four breeds of dogs selected for difference in

lifespan and cancer susceptibility. *BMC Veterinary Research*. 2014. Vol. 10. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-20> (date of access: 18.04.2021).

7. Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*. 2013. Vol. 54, No 3. P. 134–139. DOI: <https://doi.org/10.2144/000114018> (date of access: 20.03.2021).

8. Глазко В. И., Шульга Е. В., Дымань Т. Н., Глазко Г. В. ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих. Белая Церковь: Изд-во БГАУ, 2001. 487 с.

9. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018. Vol. 35, iss. 6. P. 1547–1549. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096> (date of access: 21.05.2021).

10. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*. 1990. Vol. 215, iss. 3. P. 403–410. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2) (date of access: 08.11.2021).

11. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rosen S. G. Primer3–new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012. Vol. 40, No 15. P. 115. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks596> (date of access: 07.02.2021).

REFERENCES

1. Zvereva, M. Je., D. M. Shherbakova, and O. A. Doncova. 2010. Telomeraza: struktura, funkcii i puti reguljacii aktivnosti – Telomerase: structure, functions and pathways of activity regulation. *Uspehi Biologicheskoy Himii – Biological chemistry reviews*. 50:155–202 (in Russian).

2. Eisenberg, D., and C. W. Kuzawa. 2018. The paternal age at conception effect on offspring telomere length: mechanistic, comparative and adaptive perspectives. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 373(1741):20160442. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0442> (in English).

3. Epel, E. S., E. H. Blackburn, J. Lin, F. S. Dhabhar, N. E. Adler, J. D. Morrow, and R. M. Cawthon. 2004. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *PNAS*. 101(49):17312–17315. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0407162101> (in English).

4. Turner, K. J., V. Vasu, and D. K. Griffin. 2012. Genetic structure of Hucul and Anglo-Arabian horses at the Tert locus. *Annals of Animal Science*. 12(4):483–494. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10220-012-0040-4> (in English).

5. Ząbek, T., P. Czapla, M. Wnuk, A. Lewińska, B. Oklejewicz, G. Bartosz, and E. Słota. 2012. Genetic structure of Hucul and Anglo-Arabian horses at the Tert locus. *Annals of Animal Science*. 12(4):483–494. URL: <https://doi.org/10.2478/v10220-012-0040-4> (in English).

6. McAloney, C. A., K. A. T. Silverstein, J. F. Modiano, and A. Bagchi. 2014. Polymorphisms within the Telomerase Reverse Transcriptase gene (TERT) in four breeds of dogs selected for difference in lifespan and cancer susceptibility. *BMC Vet Res*. 10:20. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-20> (in English).

7. Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi. 2013. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*. 54(3):134–139. DOI: <https://doi.org/10.2144/000114018> (in English).

8. Glazko, V. I., E. V. Shul'ga, T. N. Dyman', and G. V. Glazko. 2001. *DNK-tehnologii i bioinformatika v reshenii problem biotehnologij mlekopitajushhih – DNA technologies and bioinformatics in solving the problems of mammalian biotechnologies*. Bila Tserkva, BGAU, 487 (in Russian).

9. Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6):1547–1549. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096> (in English).

10. Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403–410. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2) (in English).

11. Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, and S. G. Rozen. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40(15):e115. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks596> (in English).

Одержано редколегією 08.07.2022 р.

Прийнято до друку 25.11.2022 р.