



## Генотипова структура мікропопуляцій свиней вітчизняних порід за локусом ріанодинового рецептора RYR1

Т. М. Рук

tanya.ryk.77@gmail.com

Львівська медична академія імені Андрея Крупинського,  
вул. Петра Дорошенка, 70, м. Львів, 79000, Україна

Проблему нестачі органів і тканин у трансплантаційній медицині можна вирішувати завдяки використанню ксенотрансплантації — пересадки людині органів тварин, зокрема свиней. Однак свині мають бути стресостійкими і пристосованими до умов утримання і годівлі у віваріях. Стресостійкість у свиней контролюється ДНК-маркером Hal 1843. Точкова мутація, за якої відбувається заміна 1843C>T в екзоні 17 гена рецептора ріанодину RYR1 у гомозиготному стані у свиней, спричиняє стрес-синдром. Метою дослідження було вивчення генетичної структури окремих популяцій свиней за локусом гена RYR1, відповідального за підвищену стрес-чутливість. Проведено ДНК-тестування 102 свиней порід полтавської м'ясної, миргородської, великої білої, ландрас, п'єтрен, в'єтнамської звислочеревої, української м'ясної, української степової рябої. Дослідження проводили на зразках ДНК, отриманих із крові свиней. ДНК виділяли за допомогою реагенту *Chelex 100*. Дослідження фрагмента гена RYR1 проводили за поліморфізмом довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). У досліджених тварин було ідентифіковано два алелі гена ріанодинового рецептора RYR1 (n і N) і три генотипи (NN, Nn, nn). У результаті молекулярного дослідження свиней різних порід був виявлений поліморфізм гена RYR1. Кількість тварин-носіїв рецесивного алеля n гена ріанодинового рецептора RYR1, який відповідає за чутливість свиней до стресових факторів, коливалася у значних межах: від повної його відсутності у представників в'єтнамської звислочеревої, української м'ясної, великої білої та української степової рябої порід до 100% тварин гомозиготного RYR1<sup>nn</sup> генотипу в породі п'єтрен і 50% особин породи ландрас, які мали гетерозиготний генотип RYR1<sup>Nn</sup>. Мутантний алель RYR1<sup>n</sup> виявляли у тварин породи п'єтрен зі 100-відсотковою частотою. Гетерозиготний генотип RYR1<sup>Nn</sup> виявлено у свиней порід полтавська м'ясна (10%), ландрас (50%), миргородська (15%), українська степова ряба (50%). У всіх досліджених свиней порід велика біла, в'єтнамська звислочерева і українська м'ясна виявлено гомозиготний генотип RYR1<sup>NN</sup>, який свідчить про відсутність у них стрес-синдрому. Встановлено, що бажаними для розведення з метою використання у біомедичних цілях є свині порід великої білої, в'єтнамської звислочеревої та української м'ясної. Розведення свиней породи п'єтрен і будь-яких поєднань з цією породою унеможливує використання таких тварин для біомедичних експериментальних робіт.

**Ключові слова:** ксенотрансплантація, свині, стрес-синдром, ген ріанодинового рецептора RYR1

Дефіцит органів і тканин для пересадки людині — важлива проблема трансплантаційної медицини, одним із напрямів вирішення якої нині вважається використання органів і тканин тварин, ксенотрансплантація. Для медико-біологічних потреб тварини, зокрема свині повинні бути стресостійкими й адаптованими до умов утримання та годівлі в межах віварію.

Підвищена чутливість свиней окремих порід до стресів (стресчутливість) стає дедалі гострішою проблемою і в селекційній роботі, оскільки супроводжується значними економічними збитками для господарств [5]. За повідомленнями дослідників, спостерігається різний ступінь прояву стрес-синдрому у тварин різних порід залежно від напряму їх продуктивності [4].

Стресонестійкі тварини характеризуються високою смертністю під час транспортування, гіперчутливістю до дії негативних факторів довколишнього середовища, що призводить до зниження рівня відтворювальних ознак, показників росту та розвитку [1].

У свиней за контроль такої важливої господарської ознаки, як чутливість до стресу, проявом якої є стрес-синдром — PSS (*porcine stress syndrom*), відповідає ген ріанодинового рецептора (RYR1, *ryanodine receptor 1 gene*) [8].

PSS — генетично обумовлена аномалія, яка має автосомно-рецесивний тип успадкування. Причиною її виникнення є точкова мутація в екзоні 17 гена ріанодинового рецептора, який кодує в скелетних м'язах білок кальцієвого каналу [2]. Ця транзиція у позиції 1843 (C→T) призводить до заміни аргініну на цистеїн у позиції 615 ріанодин-рецепторного білка, який є у саркоплазматичному ретикулумі м'язового волокна, що призводить до порушення основної функції цього білка і, як наслідок, відбувається низка біохімічних змін і розвиток злоякісної гіпертермії [3].

Метою нашого дослідження було вивчення генетичної структури окремих популяцій свиней за локусом гена RYR1, відповідального за підвищену стрес-чутливість.

## Матеріали і методи

Проведено ДНК-тестування 102 свиней порід полтавської м'ясної, миргородської, великої білої, ландрас, п'єтрен, в'єтнамської звислочевої, української м'ясної, української степової рябої. Дослідження проводили на зразках ДНК, отриманих із крові свиней. ДНК виділяли за допомогою реагента *Chelex 100* [12]. Основні параметри отриманих нуклеїнових кислот (концентрація ДНК, ступінь її чистоти та нативності) вимірювали за допомогою приладу *NanoDrop-219* (Інститут молекулярної біології і генетики НАН, м. Київ, Україна).

Дослідження фрагмента гена RYR1 проводили за поліморфізмом довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Ампліфікацію фрагмента RYR1 гена проводили в ампліфікаторі «Терцик» з праймерами; 5'-GTGCTG-GATGTCCTGTGTTCCCT-3', 5'-CTGGTGACATAGTT-GATGAGGT TTG-3' протягом 35 циклів у такому режимі: денатурація 94°C — 1 хв; 31 цикл — 94°C, 25 с; 68,5°C, 26 с; 72°C, 40 с; елонгація 72°C — 2 хв.

Гідроліз ампліфікованих послідовностей гену RYR1 здійснювали за схемою: реакційна суміш містила 10х рестрикційний буфер (оптимізований для цього ферменту) — 2,5 мкл, воду дейонізовану — 7,3 мкл, ендонуклеазу рестрикції *Hin 6* — 0,2 мкл (4–5 од. акт.) та 12,5 мкл ПЛР-продукту.

Розділення продуктів рестрикції здійснювали методом горизонтального гелю-електрофорезу з використанням 3% агарозного гелю у тріс-боратному електрофорезному буфері (TBE: 0,0879 М Тріс, 0,089 М борна кислота, 0,002 М EDTA pH 8,0). Для контролю за розмірами отриманих у результаті ампліфікації фрагментів використовували маркер молекулярного розміру *Thermo Scientific O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder*, що дозволяє проводити контроль за розмірами ДНК-фрагментів у діапазоні молекулярних розмірів від 100 до 1000 п.н.

Значення *genome copy number* (мінімальна кількість копій фрагменту ДНК для можливості його візуалізації) розраховували за формулою [9]:

## Результати й обговорення

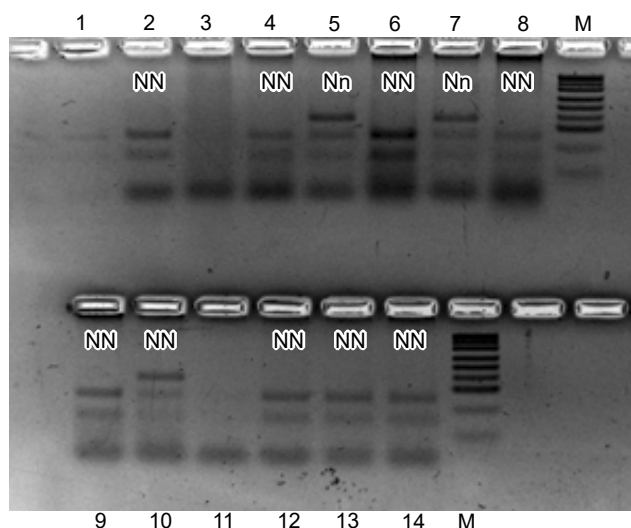
У досліджених тварин було ідентифіковано два алелі гена ріанодинового рецептора RYR1 (n і N) і три генотипи (NN, Nn, nn).

Електрофоретичне розділення рестрикційних фрагментів показано на рис. 1. Фрагменти довжиною 84 і 53 пари нуклеотидів вказують на домігантний гомозиготний генотип NN і це означає, що мутація відсутня, а досліджувана тварина стресостійка. Фрагмент довжиною 137 п.н. класифікується як рецесивний гомозиготний генотип nn і це означає, що тварина стресочутлива.

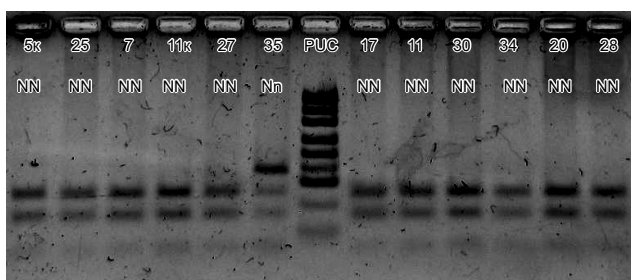
Тварини з гетерозиготним генотипом Nn — стресостійкі, але є носіями мутантного алеля.

Серед проаналізованих вибірок свиней різних порід, кількість тварин-носіїв рецесивного алеля n гена ріанодинового рецептора RYR1, який відповідає за чутливість свиней до стресових факторів, коливалася у значних межах: від повної його відсутності у представників в'єтнамської звислочевої, української м'ясної, великої білої та української степової рябої порід до 100% тварин гомозиготного RYR1<sup>nn</sup> генотипу в породі п'єтрен і 50% особин породи ландрас, які мали гетерозиготний RYR1<sup>Nn</sup> генотип.

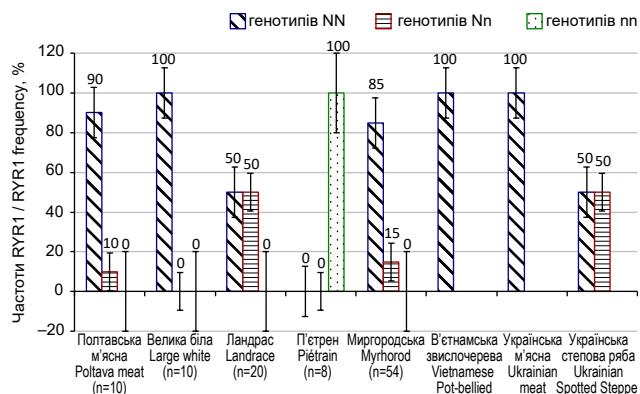
Встановлено, що носіями алеля стресочутливості виявилися 20% тварин миргородської і 10% свиней полтавської м'ясної порід. Генетико-популяційний аналіз свиней за локусом RYR1 показав, що в популяціях миргородської, великої білої та полтавської м'ясної порід частоти мутантного алеля RYR1<sup>n</sup> виявилися набагато нижчими, ніж у стадах порід ландрас та п'єтрен. Вкотре показана тотальна гомозиготність чистопородних свиней породи п'єтрен за мутантним алелем n локусу RYR1. Це пов'язано із надзвичайно високими показниками м'ясності цієї породи і негативним ефектом селекції на підвищену чутливість до стресових факторів, що супроводжується виникненням стрес-синдрому, органічними порушеннями з боку серцево-судинної системи, вадами якості м'яса: PSE (бліде, м'яке, ексудативне) та DFD (сухе, жорстке).



**Рис. 1.** Електрофореграма розділення продуктів рестрикції локусу RYR1 у 3%-у агарозному гелі. 1–14 — номери свиней та відповідні їм генотипи, М — маркер молекулярного розміру  
**Fig. 1.** Electrophoregram of separation of restriction products of RYR1 locus in 3% agarose gel. 1–14 — numbers of pigs and their corresponding genotypes, M — marker of molecular size



**Рис. 2.** Електрофореграма розділення продуктів рестрикції локусу RYR1 у 3%-у агарозному гелі. 5к, 25, 7, 11к, 27, 35, 17, 11, 30, 34, 20, 28 — номери тварин української м'ясної породи та відповідні їм генотипи, PUC — маркер молекулярного розміру  
**Fig. 2.** Electrophoregram of separation of restriction products of RYR1 locus in 3% agarose gel. 5k, 25, 7, 11k, 27, 35, 17, 11, 30, 34, 20, 28 — numbers of animals of Ukrainian meat breed and corresponding genotypes, PUC — marker of molecular size



**Рис. 3.** Частота різних генотипів за геном RYR1 серед свиней різних порід  
**Fig. 3.** Frequency of different genotypes for the RYR1 gene among pigs of different breeds

Таким чином, розведення свиней породи п'єтрин та будь-яких поєднань з цією породою унеможливорює використання таких тварин для біомедичних експериментальних робіт. Найбільш оптимальними у цьому аспекті є породи, популяції яких повністю позбавлені алеля RYR1<sup>n</sup>, оскільки із наукових джерел відомо, що тварини гетерозиготного генотипу реагують на стрес менш інтенсивно, ніж RYR1<sup>nn</sup>, тобто успадкування схильності до стресових факторів у свиней відбувається за неповного домінування нормального дикого алеля RYR1<sup>N</sup> [10].

На рис. 3 наведені дані щодо розповсюдження мутантного алеля n локусу ріанодинового рецептора серед різних порід свиней.

Популяційні дослідження, проведені іншими дослідниками, виявили відсутність алеля RYR1<sup>n</sup> або дуже низьку його концентрацію у породах сального і комбінованого напрямів продуктивності [2, 6].

За повідомленням В. С. Топіхи і О. О. Стародубець [11], помісні свині, отримані від схрещування порід дюрк і великої білої англійської селекції, є носіями мутантного алеля, що спричиняє стрес-синдром. У дослідженнях популяції свиней порід п'єтрин, дюрк і великої білої породи білоруські вчені виявили до 50% мутантного алеля у породи п'єтрин, 4,4% — в дюрк і 6,7% — у великої білої [7].

## Висновки

У результаті молекулярного дослідження свиней різних порід був виявлений поліморфізм гена RYR1. Мутантний алель RYR1<sup>n</sup> виявляли у тварин породи п'єтрин зі 100-відсотковою частотою. Гетерозиготний генотип RYR1<sup>Nn</sup> виявляли у свиней порід полтавська м'ясна (10%), ландрас (50%), миргородська (15%) українська степова (50%). У всіх досліджених свиней порід велика біла, в'єтнамська звислочерева і українська м'ясна виявлено гомозиготний генотип RYR1<sup>NN</sup>, який вказує на відсутність у них стрес-синдрому.

З огляду на результати нашого молекулярно-генетичного аналізу за маркерами RYR1 встановлено, що бажаними для розведення з метою використання у біомедичних цілях є свині порід великої білої української селекції, в'єтнамської звислочереві та української м'ясної.

## Перспективи подальших досліджень

У подальшому плануємо дослідити частоту мутантного алеля вв інших породах свиней української і зарубіжної селекції.

1. Fisher P, Mellett FD, Hoffman LC. Halothane genotype and pork quality. 2. Cured meat products from the three halothane genotypes. *Meat Sci.* 2000; 54 (2): 107–111. DOI: 10.1016/S0309-1740(99)00078-9.

2. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ, MacLennan DH. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Sci.* 1991; 253 (5018): 448–451. DOI: 10.1126/science.1862346.
3. Hardge T, Scholz A. The influence of RYR1-genotype and breed on fattening performance carcass value and meat quality. *45<sup>th</sup> Annu. Meet. EAAP*. Edinburgh, 1994: 340 p.
4. Kuznetsov AI, Simngatulin FA. A method for evaluating pigs for stress sensitivity. *Intensification of the selection process in animal husbandry: Mat. conf.* Persianovka. 1986: 76–78.
5. Loban NA, Vasilyuk OYa, Zinovieva NA, Gladyr UF. Evaluation of the stress resistance of pigs by various methods. *Math. Scientific-theoretical journal. Bull. Agr. Sci. Black Sea region*. 2003; 3: 146–150.
6. Metlytska O, Revenko O, Kopylova K. DNA marker systems in pig breeding. *Livestock Ukraine*. 2008; 2: 20–24. (in Ukrainian)
7. Mikhailova MU, Romanishko EL, Kamysh NA. Study of the genetic structure of pig populations by the RYR1 gene locus. *Bull. MDPU I. P. Shamyakina*. 2011; 1 (30): 20–24.
8. Stanišić N, Aleksić S, Di L, Stanimirović Z, Zhenhua G, Petrović M, Delić N, Radović Č, Parunović N, Gogić M. Porcine stress syndrome (PSS) in Mangalitsa pigs. *Biotechnol. Anim. Husb.* 2012; 28 (4): 873–878. DOI: 10.2298/BAH1204873S.
9. Stephenson FH. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology A Guide to Mathematics in the Laboratory*. Elsevier Inc. 2003: 302 p.
10. Fabrega E, Diestre A, Font J, Carrion D, Velarde A, Ruiz-De-La-Torre JL, Manteca X. Differences in open field behavior between heterozygous and homozygous negative gilts for the RYR(1) gene. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 2004; 7 (2): 83–93. DOI: 10.1207/s15327604jaws0702\_1.
11. Topikha VS, Starodubets OO. Stress sensitivity of Duroc pigs of the intra-breed type "Steppe". *Bull. Agr. Sci. Black Sea region*. 2008; 2 (45): 149–153.
12. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. *Chelex 100* as a medium for extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. 2013; 54 (3): 134–139. DOI: 10.2144/000114018.

## Genotypic structure of micropopulations of domestic pigs at the locus of the ryanodine RYR1 receptor

T. M. Ryk

tanya.ryk.77@gmail.com

Andrei Krupynskyi Lviv Medical Academy,  
70 Petro Doroshenko str., Lviv, 79000, Ukraine

An important problem in transplant medicine is the lack of organs and tissues for human transplantation. One of the promising areas of its solution today is the use of organs and tissues of animals — xenotransplantation. Pigs for medical and biological needs must be stress-resistant and adapted to the conditions of keeping and feeding within the vivarium. Stress syndrome in pigs is caused by a point mutation that replaces 1843CT in exon 17 of the ryanodine RYR1 receptor gene in a homozygous state. The aim of the study was to examine the genetic structure of individual pig populations at the locus of the RYR1 gene responsible for hypersensitivity. DNA testing of 102 pigs of Poltava meat, Myrhorod, Great White, Landrace and Pietren breeds was performed. The studies were performed on DNA samples obtained from pig blood. DNA was isolated using *Chelex 100* reagent. Studies of the RYR1 gene fragment were performed by restriction fragment length polymorphism (RFPR) by polymerase chain reaction (PCR). Two alleles of the ryanodine RYR1 receptor gene (n and N) and three genotypes (NN, Nn, nn) were identified in the studied animals. A molecular study of pigs of different breeds revealed a polymorphism of the RYR1 gene. The number of animals carrying the recessive allele n of the ryanodine receptor gene RYR1, which is responsible for the sensitivity of pigs to stress factors, varied considerably: from its complete absence in the Vietnamese Pot-bellied, Ukrainian meat, Large White and Ukrainian Spotted Steppe breeds up to 100% of animals of homozygous RYR1<sup>nn</sup> genotype in the Piétrain breed and 50% of Landrace individuals with the heterozygous RYR1<sup>Nn</sup> genotype. The mutant RYR1<sup>n</sup> allele was found in animals of the Piétrain breed with a 100% frequency. Heterozygous genotype RYR1<sup>Nn</sup> was found in pigs of Poltava Meat (10%), Landrace (50%), Myrhorod (15%) Ukrainian Spotted Steppe (50%). Homozygous RYR1<sup>NN</sup> genotype was detected in all Large White, Vietnamese Pot-bellied, and Ukrainian Meat pigs studied, indicating the absence of stress syndrome. It has been established that pigs of the Great White, Vietnamese Pot-bellied, and Ukrainian Meat breeds are preferred for breeding for biomedical purposes. Breeding of Piétrain pigs and any combinations with this breed makes it impossible to use such animals for biomedical experimental work.

**Key words:** xenotransplantation, pigs, stress syndrome, RYR1 receptor gene