

УДК [575.113+575.22]:[636.4+636.028]:577.213.3  
doi 10.37143/2786-7730-2024-3(81)2

## ТЕХНІКА ПЛР-АНАЛІЗУ ГЕНІВ MT2A У РІЗНИХ ВИДІВ ТВАРИН

А. М. Саєнко, М. Ю. Пека, Ю. С. Болотова, О. В. Лобченко,  
С. М. Корінний, В. М. Балацький

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН  
вул. Шведська Могила, 1, м. Полтава, Україна, 36013

Металотіонеїни – родина низькомолекулярних багатих на цистеїн білків, які беруть участь у метаболізмі есенціальних металів та захищають від токсичності важких металів. Металотіонеїни представлені різними ізоформами у багатьох еукаріотичних та прокаріотичних видів. Промоторні ділянки генів металотіонеїнів містять послідовності елементів, які регулюють експресію у відповідь на метали (MRE), що робить актуальною задачу дослідити поліморфізми у промоторних ділянках генів металотіонеїнів. **Мета.** Розробити та оптимізувати техніку ПЛР-аналізу ортологічних генів металотіонеїнів у різних біологічних видів на прикладі ізоформи MT2A щурів та свиней. **Методи.** Аналіз первинної структури генів ізоформи MT2A проводили з використанням баз даних NCBI та Ensembl. Дизайн праймерів для ПЛР-аналізу здійснювали за допомогою програми Primer3. Для проведення дослідження використовували зразки біоматеріалу: печінки щурів лінії Wistar та крові свиней великої білої породи внутрішньопородного типу УВБ-1. Виділення ДНК з печінки щурів здійснювали за допомогою набору ДНК NeoPrep DNA Magnet plant, а з крові свиней – за допомогою реагенту “Chelex 100”. Ампліфікацію фрагментів ДНК проводили за допомогою ПЛР з подальшим електрофоретичним розділенням ампліфікатів у 2 % агарозному гелі. **Результати.** У ході дослідження було проведено аналіз первинної структури генів MT2A у щурів та свиней. Здійснено дизайн праймерів, які охоплюють ділянки промоторів генів MT2A у цих двох видів тварин. Очікуваний розмір ампліфікатів складає 583 п.н. та 512 п.н. для щурів та свиней відповідно. Підібрано умови для синтезу ампліфікатів у ПЛР, оптимальність яких підтверджується наявністю на електрофореграмі відповідних ПЛР-ампліфікатів. **Висновки.** Розроблена система ПЛР-аналізу за генами MT2A щурів та свиней дозволяє досліджувати поліморфізми у промоторних областях, які містять сайти MRE. Враховуючи значення послідовностей MRE для регуляції експресії металотіонеїнів під впливом металів, а також участь металотіонеїнів

---

Саєнко Артем Михайлович, к. с.-г. н., ст. дослідник, в.о. зав. лаб. генетики,

e-mail: saenko\_artem@meta.ua

<https://orcid.org/0000-0002-0527-5367>

Пека Микита Юрійович, н. с. лаб. генетики,

e-mail: pekapoltava@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-0612-1164>

Болотова Юлія Сергіївна, м. н. с. лаб. генетики,

e-mail: bolotovakharkov@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0003-2526-1776>

Лобченко Олександра Вікторівна, лаборант,

e-mail: oleksandra.lobchenko@gmail.com,

<https://orcid.org/0009-0006-8662-2012>

Корінний Сергій Миколайович, к. с.-г. н., с. н. с., с. н. с. лаб. генетики,

e-mail: korinny\_sergey@ukr.net

<https://orcid.org/0000-0002-1649-3079>

Балацький Віктор Миколайович, д. с.-г. н., професор, гол. н. с. лаб. генетики,

e-mail: vnbalatsky@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-6034-3852>

у різних фізіологічних та патологічних процесах, можна очікувати, що поліморфізми у досліджуваних ділянках можуть мати зв'язки з адаптаційним потенціалом, стійкістю до важких металів, господарськими якостями організмів тощо. Надалі мають перспективу дослідження із залученням гена MT2A як кандидатного для розроблення молекулярно-генетичних маркерів та їх використання у практиці маркер-асоційованої селекції.

**Ключові слова:** металотіонеїни, поліморфізм, полімеразна ланцюгова реакція, промотор, регуляція експресії, щури, свині.

Посилатися на статтю так:

**БІБЛІОГРАФІЯ за ДСТУ:** Саєнко А. М., Пека М. Ю., Болотова Ю. С., Лобченко О. В., Корінний С. М., Балацький В. М. Техніка ПЛР-аналізу генів MT2A у різних видів тварин. *Свинарство і агропромислове виробництво* : міжвідом. темат. наук. зб. / Ін-т свинарства і АПВ НААН. Полтава, 2024. Вип. 3(81). С. 22–28. doi: 10.37143/2786-7730-2024-3(81)2

**REFERENCES за APA style:** Saienko, A. M., Peka, M. Y., Bolotova, Yu. S., Lobchenko, O. V., Korinnyi, S. M., & Balatsky, V. M. (2024). Tekhnika PLR-analizu heniv MT2A u riznykh vydiv tvaryn [Technique of PCR analysis of MT2A genes in different animal species]. *Svynarstvo i ahropromyslove vyrobnytstvo* [Pig Breeding and Agroindustrial Production]. Poltava, 3(81), 22–28 [in Ukrainian]. doi: 10.37143/2786-7730-2024-3(81)2

**Вступ.** Металотіонеїни – це родина багатих на цистеїн внутрішньоклітинних білків, що зв'язують метали, присутніх в еукаріотів і прокаріотів [1]. Молекули MT є одноланцюговими поліпептидами, які містять від 61 до 68 амінокислот, і 20 з них є цистеїном. Для MT властива низька молекулярна маса (6 – 7 кДа), вміст цистеїну близько 30 % і відсутність ароматичних амінокислот [2, 3]

Своєрідна хімічна структура MT визначає їхню роль у різних фізіологічних і патологічних процесах [1–4]. MT беруть участь в метаболізмі есенціальних металів (Zn, Cu), захищають від токсичності важких металів (Cd), запобігають окислювальному стресу, а їх синтез пов'язаний із процесами клітинного росту та апоптозу. В той же час, основна біологічна функція MT полягає саме в підтримці гомеостазу таких металів, як Zn і Cu.

У ссавців існує чотири основні ізоформи MT з різними амінокислотними послідовностями, експресією та характеристиками, які можуть позначатися як MT1, MT2, MT3 та MT4 [3, 5]. У деяких видів, зокрема людини, відомо про існування більшої кількості ізоформ MT. У той же час, MT є високо консервативними білками, з високою подібністю амінокислотних послідовностей як між ізоформами одного біологічного виду, так і між MT на міжвидовому рівні [6].

Великий інтерес для дослідження представляє регуляція експресії MT. Відомо, що у промоторних ділянках генів MT містяться елементи, які відповідають на дію металів (MRE) антиоксидантів (ARE) та глюкокортикоїдів (GRE) [7, 8]. Зміна нуклеотидних послідовностей у ділянках, що містять ці елементи може впливати на експресію MT. Тому дослідження поліморфізмів у промоторах генів MT у різних біологічних видів являє собою актуальну наукову задачу, що може вирішуватися з використанням молекулярно-генетичних методів, і, зокрема, ПЛР-аналізу.

**Метою** дослідження було розробити та оптимізувати техніку ПЛР-аналізу ортологічних генів металотіонеїнів у різних біологічних видів на прикладі ізоформи MT2A щурів та свиней.

**Матеріали та методи досліджень.** Для дослідження первинної структури генів MT2A використовувались бази даних NCBI [9] та Ensembl [10]. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей під час аналізу первинної структури генів MT2A свиней та щурів проводилось за алгоритмом Needleman-Wunsch [11] 7 за допомогою онлайн-сервісу EMBL Needle [12]. Підбір структури олігонуклеотидних праймерів для ПЛР здійснювали за допомогою сервісу Primer3 [13].

Для проведення дослідження використовували зразки біоматеріалу щурів та свиней. Зразки печінки щурів лінії Wistar (4 гол.) були надані Науково-дослідним інститутом біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна; зразки крові свиней великої білої породи внутрішньопородного типу УВБ-1 (4 гол.) від ремонтних свиноматок отримано на Державному підприємстві «ДГ «Степне» (с. Степне Полтавського району Полтавської області).

Експериментальна частина проводилась у 2023 році. Виділення ДНК з печінки щурів здійснювали за допомогою набору магнітної пробопідготовки ДНК Neoprep DNA Magnet plant, відповідно до рекомендацій виробника [14]. Виділення ДНК з крові свиней проводили за допомогою реагенту “Chelex 100” за відповідною методикою [15].

Апробацію синтезованих праймерів на виділеній ДНК здійснювали за допомогою синтезу у ПЛР [16–20]. ПЛР проводили у мікроцентрифужних пробірках Eppendorf, 0,5 мл (Eppendorf, Німеччина) в програмованому термостаті «Терцик-2» («ДНК-технологія») у загальному об’ємі 25 мкл ПЛР-суміші. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації проводився у 2 % агарозному гелі, за сили струму 76 мА та напруги 275 В. Візуалізацію здійснювали за допомогою фарбування гелю бромистим етидієм та подальшим переглядом в ультрафіолетовому світлі на транслюмінаторі.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Використовуючи ресурси баз даних NCBI та Ensembl було проаналізовано первинну структуру генів MT2A щурів та свиней. У якості референтних у цьому дослідженні розглядалися послідовності генів MT2A з номерами записів у базах даних (табл. 1).

**Таблиця 1. Референтні послідовності генів MT2A у генетичних базах даних**

Біологічний вид	Номер запису	
	NCBI	Ensembl
Щур ( <i>Rattus norvegicus</i> )	M11794.1, NM_001137564.1	ENSRNOG00000043098
Свиня домашня ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	XM_003355808.4	ENSSSCG00000030300

Дизайн праймерів для ампліфікації у ПЛР проводився таким чином, щоб вони обмежували частини промоторних областей генів MT2A у свиней та щурів, де мають розташовуватись MRE. Структура та характеристика праймерів наведена у табл. 2.

**Таблиця 2. Характеристика праймерів для ампліфікації фрагментів генів МТ2А свиней та щурів**

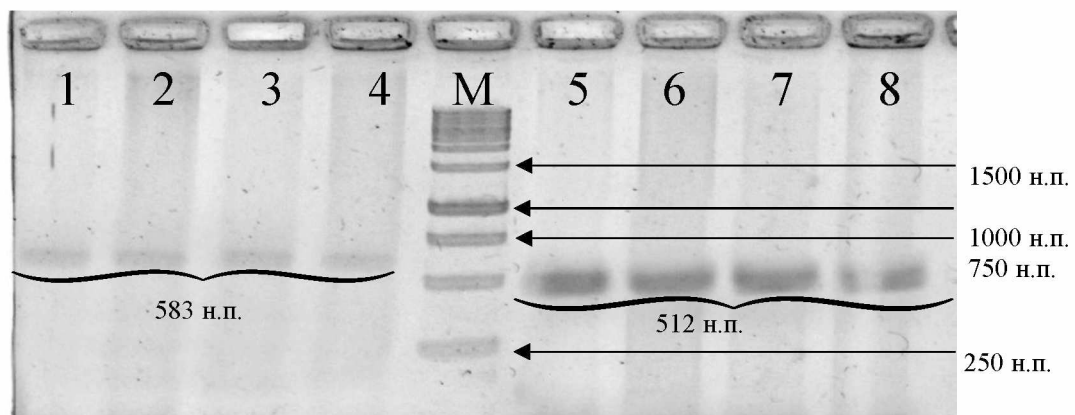
Ген	Праймер	Послідовність	Довжина, бр	GC, %	Довжина фрагменту, бр
МТ2А щурів	F1	5' CTCCAAGCCCCGCTTTTCAC 3'	19	63.2	583
	R1	5' CTCCGGTTACAGAGGCCCGTC 3'	21	66.7	
МТ2А свиней	F2	5' ACCTGCCCTCTAACCTCTAA 3'	20	50.0	512
	R2	5' GTGGGGAGTCAGAAATTGCT 3'	20	50.0	

Для праймерів проводився вибір умов ампліфікації зокрема визначалась оптимальна температура відпалу, яка становить 60 °С для ампліфікації фрагменту гена МТ2А щурів та 56 °С для ампліфікації фрагменту гена МТ2А свиней (табл. 3).

**Таблиця 3. Умови ампліфікації фрагментів у ПЛР**

Ген	Температура	Час	Кількість циклів
МТ2А щурів	94 °С	3 хв	1
	94 °С	30 с	31
	60 °С	26 с	
	72 °С	40 с	
	72 °С	2 хв	1
МТ2А свиней	94 °С	3 хв	1
	94 °С	30 с	31 цикл
	56 °С	26 с	
	72 °С	40 с	
	72 °С	2 хв	1

Результати електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації у 2 % агарозному гелі представлено на рис. 1.



**Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації у агарозному 2 % гелі генів МТ2А свиней та щурів**

Примітка: М – маркер молекулярної маси 1Кb DNA Ladder; Ампліфікати генів МТ2А відповідають позначенням 1–4 для щурів та 5–8 для свиней.

Розміри отриманих ДНК-фрагментів відповідають очікуваним відповідно до нуклеотидних послідовностей промоторних ділянок генів MT2A свиней та щурів. Фрагменти ампліфікації знаходяться на рівні 583 п.н. для щурів та 512 п.н. для свиней відносно маркера молекулярної маси *1Kb DNA Ladder*.

**Висновки.** У ході дослідження було проведено аналіз первинних структур ортологічних генів MT2A у двох біологічних видів: свиней та щурів. Зважаючи на роль промоторних ділянок у регуляції експресії генів MT2A, ці ділянки були обрані як цільові для подальшого аналізу молекулярно-генетичними методами. Зокрема, було здійснено розроблення техніки ампліфікації промоторних ділянок, що містить сайти MRE генів MT2A досліджуваних видів тварин та електрофоретичного розділення ПЛР-продуктів. Підібрані праймери та відповідні умови ампліфікації дозволяють синтезувати фрагмент гена MT2A розміром 583 п.н. для щурів та фрагмент гена MT2A розміром 512 п.н. для свиней.

**Перспективи подальших досліджень.** Розроблена система ДНК-типуювання методом ПЛР за генами MT2A щурів та свиней дозволяє досліджувати поліморфізми у сайтах MRE, і може використовуватись у популяційних і асоціативних дослідженнях для встановлення зв'язку між відповідними поліморфізмами та адаптаційним потенціалом, стійкістю до важких металів, господарськими якостями організмів тощо. Пропонується продовжити подальші дослідження із залученням гена MT2A як кандидатного для розроблення молекулярно-генетичних маркерів господарсько-корисних ознак для маркер-асоційованої селекції, що зокрема має відношення до свиней як цінних видів сільськогосподарських тварин.

**Подяка.** Автори висловлюють вдячність колективу Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за допомогу в отриманні біологічного матеріалу щурів для подальших досліджень.

## БІБЛІОГРАФІЯ

1. Sekovanić A., Jurasović J., Piasek M. Metallothionein 2A gene polymorphisms in relation to diseases and trace element levels in humans. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2020. Vol. 71(1). P. 27–47. doi: 10.2478/aiht-2020-71-3349
2. Babula P., Masarik M., Adam V., Eckschlagler T., Stiborova M., Trnkova L., Skutkova H., Provaznik I., Hubalek J., Kizek R. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics : Integrated Biometal Scie.* 2012. Vol. 4(8). P. 739–750. doi: 10.1039/c2mt20081c
3. Vašák M., Meloni G. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J. of biological inorganic chemistry : JBIC : a Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*. 2011. Vol. 16(7). P. 1067–1078. doi: 10.1007/s00775-011-0799-2
4. Kelly E. J., Sandgren E. P., Brinster R. L., Palmiter R. D. A pair of adjacent glucocorticoid response elements regulate expression of two mouse metallothionein genes. *Proceedings of the National Academy of Scie. of the United States of America*. 1997. Vol. 94(19). P. 10045–10050. doi: 10.1073/pnas.94.19.10045
5. Sakulsak N. Metallothionein: An Overview on its Metal Homeostatic Regulation in Mammals. *International J. of Morphology*. 2012. Vol. 30(3). P. 1007–1012. doi: 10.4067/S0717-95022012000300039
6. Peka M., Balatsky V., Korinnyi S., Saienko A. Phylogenetic affinity of rat and some mammalian species metallothionein genes. *ГРААЛІ НАУКИ*. 2021. Vol. 6. P. 103–108. doi: 10.36074/grail-of-science.25.06.2021.019

7. Laukens D., Waeytens A., De Bleser P., Cuvelier C., De Vos M. Human metallothionein expression under normal and pathological conditions: mechanisms of gene regulation based on in silico promoter analysis. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 2009. Vol. 19(4). P. 301–317. doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v19.i4.40
8. Takahashi S. Positive and negative regulators of the metallothionein gene (review). *Molecular Medicine Reports*. 2015. Vol. 12(1). P. 795–799. doi: 10.3892/mmr.2015.3459
9. Sayers E. W., Bolton E. E., Brister J. R., Canese K., Chan J., Comeau D. C., Connor, Sherry S. T. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research* 2022. Vol. 50(D1). D 20–D26. doi: 10.1093/nar/gkab1112
10. Cunningham F., Allen J. E., Allen J., Alvarez-Jarreta J., Amode M. R., Armean I. M., Austine-Orimoloye, Flicek P. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*. 2022. Vol. 50(D1). P. D988–D995. doi: 10.1093/nar/gkab1049
11. Needleman S. B., Wunsch C. D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. of Molecular Biology*. 1970. Vol. 48(3). P. 443–453. doi: 10.1016/0022-2836(70)90057-4
12. Madeira F., Pearce M., Tivey A. R. N., Basutkar P., Lee J., Edbali O., Madhusoodanan N., Kolesnikov A., Lopez R. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*. 2022. Vol. 50(W1). P. W276–W279. doi: 10.1093/nar/gkac240
13. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012. Vol. 40(15). e115. doi: 10.1093/nar/gks596
14. Neogene (n.d.). *Nabir mahnitnoi probopidhotovky DNK NeoPrep DNA Magnet plant (probopidhotovka HMO-roslyna)* [Magnetic DNA sample preparation kit NeoPrep DNA Magnet plant (GMO plant sample preparation)]. Retrieved June 1, 2023,
15. 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(3). P. 134–139. doi: 10.2144/000114018
16. Waters D. L., Shapter F. M. The polymerase chain reaction (PCR) : general methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2014. Vol. 1099. P. 65–75. doi: 10.1007/978-1-62703-715-0\_7
17. Dai S., Long Y. Genotyping analysis using an RFLP assay. *Plant Genotyping. Series: Methods in Molecular Biology / J. Batley (eds)*. New York: Humana Press, 2015. Vol. 1245. P. 91–99. doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6\_7
18. Garibyan L., Avashia, N. Polymerase chain reaction. *The J. of investigative dermatology*. 2013. Vol. 133(3). P. 1–4. doi: 10.1038/jid.2013.1
19. Lorenz T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. of Visualized Experiments : JoVE*. 2012. Vol. (63). e3998. doi: 10.3791/3998
20. Harbison A. M., Nguyen J. N. T. PCR: Identification of Genetic Polymorphisms. *Molecular Profiling. Series: Methods in molecular biology / V. Espina (eds)*. New York: Humana Press, 2017. Vol. 1606. P. 193–203. doi: 10.1007/978-1-4939-6990-6\_13

## TECHNIQUE OF PCR ANALYSIS OF MT2A GENES IN DIFFERENT ANIMAL SPECIES

A. M. Saienko, M. Y. Peka, Yu. S. Bolotova, O. V. Lobchenko,  
S. M. Korinnyi, V. M. Balatsky

Institute of Pig Breeding and Agroindustrial Production NAAS  
1 Shvedska Mohyla St., Poltava, Ukraine, 36013

*Metallothioneins are a family of low-molecular-weight cysteine-rich proteins that participate in the metabolism of essential metals and protect against heavy metal toxicity. Metallothioneins are represented by different isoforms in many eukaryotic and prokaryotic species. The promoter regions of metallothionein genes contain sequences of elements that regulate expression in response to metals (MRE), which makes it an urgent task to investigate polymorphisms in the promoter regions of metallothionein genes.*

**Objective.** *To develop and optimize the technique of PCR analysis of orthologous metallothionein genes in various biological species using the example of the MT2A isoform of rats and pigs.*

**Methods.** *Analysis of the primary structure of MT2A isoform genes was performed using the NCBI and Ensembl databases. The design of primers for PCR analysis was carried out using the Primer3 program. Biomaterial samples were used for the study: livers of Wistar rats and blood of large white pigs of intrabreed type ULW-1. DNA was isolated from rat liver using the NeoPrep DNA Magnet plant DNA kit, and from pig blood using Chelex 100 reagent. Amplification of DNA fragments was carried out using PCR followed by electrophoretic separation of the amplicons in a 2 % agarose gel.*

**Results.** *In the course of the study, the primary structure of the MT2A genes of rats and pigs was analyzed. Primers were designed to cover the promoter regions of the MT2A genes of these two animal species. The expected sizes of the amplicons are 583 bp and 512 bp for rats and pigs, respectively. The conditions for the synthesis of PCR amplicons were selected, the optimality of which is confirmed by the presence of the corresponding PCR amplicons on the electrophoregram.*

**Conclusions.** *The developed PCR analysis system for the MT2A genes of rats and pigs allows to study polymorphisms in the promoter regions that contain MRE sites. Considering the importance of MRE sequences for the regulation of metallothioneins' expression under the influence of metals, as well as the participation of metallothioneins in various physiological and pathological processes, it can be expected that polymorphisms in the studied areas may have associations with adaptation potential, resistance to heavy metals, economic qualities of organisms, etc. In the future, research involving the MT2A gene as a candidate for the development of molecular genetic markers and their use in the practice of marker-associated selection is promising.*

**Keywords:** *metallothioneins, polymorphism, Rattus norvegicus, Sus scrofa domesticus, polymerase chain reaction, promoter.*

Отримано 02.04.2024

Отримано після доопрацювання 15.04.2024

Затверджено до видання 27.06.2024