

ВЫЯВЛЕНИЕ LoF-МУТАЦИЙ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

М.М. Трусова, магистрант

Научный руководитель – О.А. Епишко, к.б.н., доцент

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы

На долю животных голштинской и голштинизированной черно-пестрой пород в общем поголовье молочного скота в Беларуси приходится более 60 %. Однако на фоне постоянного увеличения молочной продуктивности у коров голштинской породы наблюдается снижение репродуктивной способности [1, с. 27]. В настоящее время такое снижение связывают с генетическими факторами. Исследование генома крупного рогатого скота позволяет узнать больше информации о корове в молодом возрасте, а также обнаружить признаки, которые раньше были неизвестны или их невозможно было измерить из-за специфики их проявления.

Так американскими учёными были открыты (2011 год) три гаплотипа, оказывающих влияние на плодовитость коров голштинской породы, обозначаемые как НН1, НН2 и НН3. В 2013 году к ним добавилось ещё два гаплотипа НН4 и НН5 [2, с. 91-94].

НН1 (Голштинский гаплотип 1) расположен на 5 хромосоме. В 2012 году внутри гаплотипа идентифицирован рецессивный аллель гена ARAF1. Гомозиготность по этому аллелю приводит к спонтанным абортам.

С 2013 года всё поголовье быков США анализируется по этому гену. Частота встречаемости – 1,92% [3, с. 42].

Цель исследования: выявление LoF-мутаций у крупного рогатого скота молекулярно-генетическими методами.

Исследования проводились на базе УО “Гродненский государственный аграрный университет” в отраслевой научно-исследовательской лаборатории ДНК–технологий, в качестве объектов использовались бычки и быкородящие коровы голштинской и белорусской черно-пестрой пород. Объектом наших исследований являлся генетический материал (ушной выщип, сперма) (n=200), содержащихся на племпредприятиях и в племенных хозяйствах Гродненской и Брестской областях Республики Беларусь.

Для исследований был отобран гаплотип НН1 (ген ARAF1), влияющий на фертильность крупного рогатого скота. ДНК-диагностику генотипов гена ARAF1, проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ). Ядерную ДНК выделяли перхлоратным методом. Для амплификации участка гена ARAF1, использовали праймеры и ПЦР-программу:

- ARAF1-1: 5' -TAT AGA CTG TGA GAA TTT CCA GG- 3';

- ARAF1-2: 5'- TTA TCG ACC TCC TGC TTG TCC TGC -3'.

ПЦР-программа: «Горячий старт» –7 минут при 95⁰С; 40 циклов: денатурация – 30 сек при 94⁰С, отжиг – 30 сек при 59⁰С, синтез – 45 сек. при 72⁰С; достройка– 7 минут при 72⁰С. Продукт амплификации разделяли в 2% агарозном геле в течение 30-40 минут, используя напряжение 110V и ДНК-маркер молекулярного веса (50bp). Рестрикция ПЦР-продуктов проводилась с помощью эндонуклеазной рестриктазы Bstc8I при температуре 55⁰С. Рестрицированные фрагменты разделяли в 3% агарозном геле в течение 40-50 минут, используя напряжение 130V и ДНК-маркер молекулярного веса. При расщеплении фрагментов ПЦР с помощью эндонуклеазы идентифицирова-

лись следующие генотипы: - ARAF1^{QQ} – 123, 33 п.н. (свободный от мутации) - ARAF1^{QX} – 156, 123, 33 п.н. (скрытый носитель мутации) ARAF1^{XX} – 156 п.н. (носитель мутации, летальный).

В результате проведенных исследований адаптирована методика определения полиморфизма гена ARAF1 методом ПЦР-ПДРФ-анализа. Установлено при расщеплении фрагментов ПЦР с помощью эндонуклеазы идентифицируются три генотипа: ARAF1^{QQ}. (свободный от мутации); ARAF1^{QX} (скрытый носитель мутации); ARAF1^{XX} (носитель мутации, летальный). На основе ПЦР-ПДРФ-анализа, нами получен обеспечиваемый заявленным способом технический результат, выраженный в эффективной идентификации искомых генотипов (ARAF1^{QQ}, ARAF1^{QX}, ARAF1^{XX}) ввиду корректной интерпретации генерируемых генотип-специфических фрагментов, где ДНК-фрагменты с длинами 156, 123 и 33 бр являются идентификационными.

Список использованных источников

1. Гладырь Е.А., Романенкова О.С., Волкова В.В., Виноградова И.В., Зиновьева Н.А. Гаплотипы фертильности голштинского и голштинизированного скота. Материалы II Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». – Минск. – 2015. – С.153

2. Романенкова О.В., Гладырь Е.А., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Разработка тест-системы для диагностики гаплотипа фертильности крупного рогатого скота ННЗ, ассоциированного с ранней эмбриональной смертностью. Достижения науки и техники АПК, 2015, 11: 91-94

3. Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, et al. (2009) A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol* 10: R42.