



УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНТЕНСИВНОГО РАЗВИТИЯ ЖИВОТНОВОДСТВА

*Материалы XIV международной научно-практической
конференции, посвященной образованию кафедр
кормления сельскохозяйственных животных;
физиологии, биотехнологии и ветеринарии
и 15-летию кафедры ихтиологии и рыбоводства
УО «БГСХА»*



Горки 2011

УДК 631.151.2:636
ББК 65.325.2
А 43

Редакционная коллегия: **А.П. Курдеко** (гл. редактор), **Н.И. Гавриченко** (зам. гл. редактора), **Н.А. Садо́мов** (зам. гл. редактора), **И.Б. Измайлович** (отв. секретарь), **М.В. Шалак**, **А.В. Соляник**, **И.С. Серяков**, **Г.Ф. Медведев**, **Н.В. Подскребкин**.

А 43 Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной образованию кафедр кормления сельскохозяйственных животных; физиологии, биотехнологии и ветеринарии и 15-летию кафедры ихтиологии и рыбоводства УО «БГСХА». – Горки: Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, 2011. 245 с.

В материалах конференции опубликованы результаты исследований ученых Беларуси, Российской Федерации, Украины, в области кормления, содержания, разведения, селекции и генетики животных, воспроизводства и биотехнологии, ветеринарной медицины, технологии производства, переработки и хранения продукции животноводства.

УДК 631.151.2:636
ББК 65.325.2

© Коллектив авторов, 2011
© Учреждение образования
«Белорусская государственная
сельскохозяйственная академия», 2011

МЕТОД ОЦЕНКИ ДОСТОВЕРНОСТИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО ПОЛИМОРФИЗМУ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК

О.А. ЕПИШКО, Т.И. ЕПИШКО, Н.А. ГЛИНСКАЯ, О.М. ДУБЕНЕЦКАЯ
УО «Полесский государственный университет»
г. Пинск, Брестская обл., Республика Беларусь, 225710

Введение. Согласно статистическим данным в селекционном процессе по различным причинам участвуют 20-30% животных, не соответствующих по своим генетическим характеристикам селекционным требованиям, что в значительной мере сдерживает селекционный процесс племенного животноводства.

В соответствии с международными нормами и требованиями по сертификации племенной продукции необходимо обязательное проведение генетической экспертизы происхождения племенных животных.

В настоящее время во всем мире единственным способом, позволяющим достичь уровня 99,999% достоверности, подтверждающего происхождение КРС, является ПЦР – диагностика по микросателлитным локусам ДНК [1-9].

В настоящее время проведение генетической экспертизы крупного рогатого скота по нуклеотидным последовательностям ДНК требует не только закупки дорогостоящего оборудования (стоимость генетического анализатора – более 750 млн. белорусских рублей), но и полного комплекта реагентов (стоимость только стандартного набора для проведения амплификации на 100 тестов составляет 10 450 тыс. бел. руб.). Учитывая столь высокую стоимость оборудования, реактивов и расходных материалов себестоимость тестирования одного животного составит более 200 тыс., а семьи более 600 тыс. белорусских рублей. Совершенно очевидно, что тестирование племенных животных в этом случае может быть только выборочным. Единственным выходом из сложившейся ситуации является разработка методических подходов для оценки достоверности происхождения крупного рогатого скота по нуклеотидным последовательностям ДНК, основанных на использовании набора реактивов, произведенных в республике, адаптированных для работы на генетическом анализаторе «Applied Biosystems» ABI Prism 3130.

Основной целью разработки метода проведения генетической экспертизы КРС по полиморфизму нуклеотидных последовательностей ДНК с использованием генетического анализатора типа «Applied Biosystems» ABI Prism 3130, является реализация возможности проведения генетической экспертизы КРС по нуклеотидным последовательностям ДНК, замена дорогостоящих импортных наборов реагентов реактивами отечественного производства, значительное снижение стоимости тестирования, адаптация к требованиям массового анализа племенного поголовья Республики Беларусь по происхождению.

Материал и методика исследований. Работа выполнялась в НИЛ промышленной биотехнологии УО «Полесский государственный университет», а также сельскохозяйственных племенных предприятиях республики.

Для разработки метода проведения генетической экспертизы КРС по полиморфизму нуклеотидных последовательностей ДНК использовали биопробы ткани либо спермы быков-производителей, ткани - быкопроизводящих коров и бычков племпредприятий республики. ДНК выделяли перхлоратным методом.

Концентрацию ДНК оценивали спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра Nanodrop 1000 (при длине волны 260 нм и 280 нм).

Оптимальная концентрация геномной ДНК, необходимой для проведения мультиплексной реакции, составляет 100-200 нг/мкл (рисунок 1).

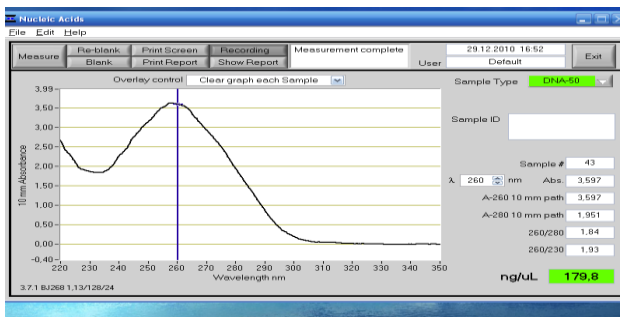


Рисунок 1 - Результат определения концентрации ДНК на спектрофотометре Nanodrop 1000

Для этого исходный раствор ДНК разбавляли в 200-400 раз и измеряли его оптическую плотность в УФ-свете с длиной волны 260 нм.

Концентрацию ДНК рассчитывали по следующей формуле:

$$C = OD_{260} \times 50 \times f / 1000,$$

где:

OD_{260} – оптическая плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм;

f – фактор разбавления;

1000 – коэффициент для приведения концентраций в мкг/мкл;

50 – концентрация ДНК (мкг/мл) при $OD_{260} = 1$.

Степень очистки, нативность и подвижность ДНК оценивали методом электрофореза в 0,8% - 1,5% агарозном геле (при напряжении 120 В в течение 20 минут). В качестве маркера использовали ДНК известной концентрации.

Степень очистки ДНК устанавливали соотношением оптических плотностей раствора ДНК при длине волны 260 нм и 280 нм. Для чистых препаратов ДНК это соотношение равно 1,8-2,0 (рисунок 2).

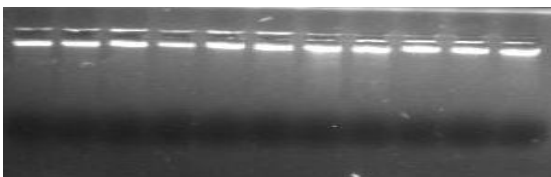


Рисунок 2 - Результаты определения концентрации, степени очистки, нативности и подвижности ДНК методом электрофореза

Синтез необходимых последовательностей микросателлитных локусов проводили на амплификаторе типа T Professional basic. Визуализацию и анализ результатов амплификации осуществляли с помощью системы гель-документирования Quantum.

Для определения размерностей стандартной панели микросателлитных локусов на начальном этапе исследований полимеразную цепную реакцию проводили с использованием набора реагентов «Stock-Marks for the Bovine Kit», который служил контролем и набора реагентов, произведенного в Республике Беларусь, на амплификаторе *T Professional basic* в объеме 15 мкл реакционной смеси. Режим амплификации состоял из следующих шагов: (1) 95°C – 10 мин, (2) 94°C – 45сек; (3) 61°C – 45 сек; (4) 72°C – 60 сек; (5) 72°C – 60 мин; (6) 25°C – 2 часа; (7) 4°C – hold. Шаги 2-4 были замкнуты в цикл, повторяющиеся 31 раз.

Анализ амплифицированных участков ДНК каждого микросателлитного локуса определяли путем разделения продуктов ПЦР на генетическом анализаторе «ABI Prism 3130».

Определение длин выявленных генотипов ДНК в исследуемых локусах проводили при помощи программы GenneMapper Software Version 4.0.

Результаты исследований и их обсуждение. Для проведения мультиплексной ПЦР - полимеразной цепной реакции были тщательно отобраны микросателлитные локусы и подобраны их варианты комбинации, для исключения негативных эффектов, обусловленных взаимодействием реагентов и продуктов реакции разных локусов (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов, рекомендованных ISAG для проведения достоверности происхождения крупного рогатого скота

Локус	Длины фрагментов, (bp)	Метка праймера, Dye	Цвет
TGLA227	64-115	FAM	Синий
BM2113	116-146	FAM	Синий
TGLA53	147-197	FAM	Синий
ETH10	198-234	FAM	Синий
SPS115	235-265	FAM	Синий
TGLA126	104-131	JOE	Зеленый
TGLA122	134-193	JOE	Зеленый
INRA23	193-235	JOE	Зеленый
ETH3	90-135	NED	Желтый
ETH225	136-165	NED	Желтый
BM1824	170-218	NED	Желтый
CSSM036	157-187	JOE	Зеленый
HEL1	103-117	JOE	Зеленый

В наших исследованиях использовались две мультиплексные реакции, состоящие из 8 и 4 микросателлитных локусов, сформированы мультиплексные варианты из 8 (BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126) и 4 (ETH3, TGLA227, TGLA53, HEL1) микросателлитных локусов для проведения ПЦР.

Успех проведения мультиплексной реакции в значительной степени зависит от степени очистки и концентрации ДНК. В связи с чем, для проведения мультиплексной реакции использовались образцы геномной ДНК концентрация которых не превышала 200 нг/мкл.

Следующим этапом в подготовке проведения мультиплексной реакции является подбор последовательности праймеров, которые при взаимодействии друг с другом будут отжигаться на матрице при одних и тех же температурных и временных условиях.

Характеристика последовательностей микросателлитных локусов ДНК представлена в таблице 2.

Таблица 2. Характеристика праймеров, используемых при проведении мультиплексной реакции для определения достоверности происхождения крупного рогатого скота

Локус	Структура праймера (5'-->3')	Температура отжига, °C
BM1824 F BM1824 R	gagcaaggtgttttccaatc cattctccaactgcttcctg	70
BM2113 F BM2113 R	gctgccttctaccaaatacc cttctgagagaagcaacacc	70,5
CSSM036 F CSSM036 R	aagaagtactggtgccaatctg ggataactcaaccacacgtctctg	55
ETH10 F ETH10 R	gttcaggactggccctgctaaca cctccagcccactttctctctc	72
ETH225 F ETH225 R	gatcacctggccactatttct acatgacagccagctgctact	70,9
ETH3 F ETH3 R	gaacctgcctctctgcatgg actctgcctgtggccaagtagg	72
HEL1 F HEL1 R	aggctacagtccatgggatt gaacagctatttaacaagga	67
INRA023 F INRA023 R	gagtagagctacaagataaacttc taactacaggtgttagatgaactc	62
SPS115 F SPS115 R	aaagtgacacaacagccttccag aac- gagtgctcctagttggctgtg	72
TGLA122 F TGLA122 R	ccctctccaggtaaatcagc aatcacatggcaataagtacatac	68
TGLA126 F TGLA126 R	ctaattagaatgagagaggctct ttggtctctattctgaaatccc	67
TGLA227 F TGLA227 R	cgaattccaatctgtaatttct acagacagaaactcaatgaaagca	71
TGLA53 F TGLA53 R	gctttcagaaatggttcattca atctcacatgatattacagcaga	67

Реакционную смесь для проведения мультиплексной реакции готовили в объеме 15 мкл в составе следующих компонентов (таблица 3):

При составлении реакционной смеси особое внимание уделили оптимальной концентрации $MgCl_2$.

Проведение мультиплексной полимеразной цепной реакции требует тщательного подбора оптимальных температурных и временных параметров проведения ПЦР.

Для проведения реакции использовали ПЦР программу: «горячий старт» - 3 мин при $95C^0$; $97C^0$ -20сек; 32 цикла: денатурация – 30 сек при $95C^0$, отжиг – $65C^0$ – 1 сек и $59C^0$ – 1 мин 15 сек; синтез 30 сек при $68C^0$; достройка 30 сек – $70C^0$ и охлаждение $4C^0$.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали в 1,5% агарозном геле (при напряжении 130 В в течение 20 минут).

Во всех случаях для электрофореза использовали 1x TBE буфер.

Таблица 3. Состав реакционной смеси и концентрация используемых компонентов

№ п/п	компоненты	единицы измерения	количество компонента
1	ПЦР буфер	мкл	1,5
2	MgCl ₂ (25 mM)	мкл	2,1
3	dNTP mix (10-12 mM)	мкл	1,5
4	праймеры (mix)	мкл	3
5	Taq-полимераза	Ед (U)	1
6	ДНК 1 мкл (конц. 100-200 нг/мкл)	мкл	1
7	вода H ₂ O	мкл	до 15 мкл
Итого:		15 мкл	

Визуализацию и анализ результатов осуществляли с помощью системы гель-документирования Quantum (рисунок 3).

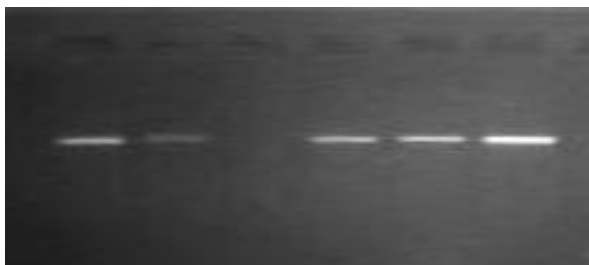


Рисунок 3. Концентрация и специфичность амплификата мультиплексной реакции

Фрагментный анализ нуклеотидных последовательностей ДНК проводили на генетическом анализаторе ABI Prism 3130.

При этом, соблюдали основные требования, предъявляемые к проведению фрагментного анализа с использованием генетического анализатора – автоматизированной системы ДНК анализа, основанной на многокрасочной флуоресцентной детекции с использованием капиллярного электрофореза параллельно в 4-х капиллярах, обеспечивающей загрузку образцов и весь их последующий анализ в автоматическом режиме:

Перед постановкой в секвенатор, проводили денатурацию образцов в смеси объемом 15 мкл, включающую: 1,2 мкл амплификата, 0,5 мкл LIZ-500 size standard и 13,3 мкл формамида в амплификаторе в течение 5 мин – при 95С⁰ и 8 мин – 4С⁰; затем загружали образцы в секвенатор, руководствуясь протоколом.

На рисунках 4 и 5 представлены результаты фрагментного анализа, и определения генотипа животного, обработанные с помощью программного обеспечения GeneMapper Software Version 4.0

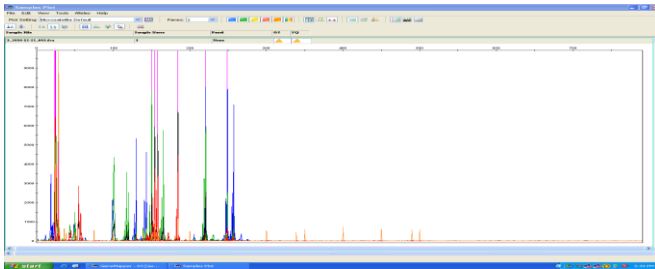


Рисунок 4 - Результаты фрагментного анализа, обработанные с помощью программного обеспечения GeneMapper Software Version 4.0

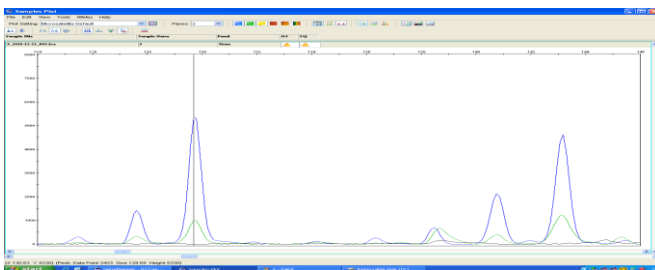


Рисунок 5 – Определение генотипа животного при проведении фрагментного анализа

Заключение. Разработанный метод проведения генетической экспертизы по нуклеотидным последовательностям ДНК, определяющий методические подходы и порядок проведения оценки достоверности происхождения крупного рогатого скота является импортозамещающим, так как позволяет исключить импорт дорогостоящих наборов реагентов, являющихся основной статьей затрат при проведении генетической экспертизы животных, заменив их отечественными, и снизить затраты тестирования животных минимум в 2,5-3,4 раза, с 65 до 18,6 у.е. (56440 руб.) за один тест.

Разработка внедрена в производство. Проводится генетическая экспертиза племенного молодняка крупного рогатого скота предприятий Минсельхозпрод.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stone R.T., Kappes S.M., Keele J.W., Beattie C.W. (1997): Characterization of 109 bovine microsatellites // *Animal Genetics*, 28: 62-66.
2. McGraw R.A., Grosse W.M., Kappes S.M., Beattie C.W., Stone R.T. (1997): Thirty-four bovine microsatellite markers // *Animal Genetics*, 28: 66-68.
3. Marquess F.L.S., Brenneman R.A., Schmutz S.M., Taylor J.F., Davis S.K. (1997): A highly polymorphic bovine dinucleotide repeat SOD1MICRO2 // *Animal Genetics*, 28: 70.
4. Jandurova O.M., Sablikova L., Wolf J., Dedkova L., Horačkova Š. (2001): Microsatellites on chromosome 6 and their association with milk production traits in Czech Pied cattle // *Czech J. Anim. Sci.*, 46(6): 247-251.

5. Czernekova V., Kott T., Dudkova G., Sztankóova Z., Soldat J. (2006): Genetic diversity between seven Central European cattle breeds as revealed by microsatellite analysis // *Czech J. Anim. Sci.*, 51: 1-7.
6. Čitek J., Řehout V., Mašková J. (1998): The analysis of some microsatellite loci in Cattle // *Czech J. Anim. Sci.*, 43: 390.
7. Čitek J., Řehout V. (2001): Evaluation of the genetic diversity in cattle using microsatellites and protein markers // *Czech J. Anim. Sci.*, 46(9): 393-400.
8. Handiwirawan E., Noor R.R., Muladno and Schüler L. (2003): The use of HEL9 and INRA035 microsatellites as specific markers for Bali cattle // *Arch. Tierz.*, 46(6): 503-512.
9. Rosa-Reyna X.F., Perez M.A.R., Sifuentes-Rincon A.M. (2006): Microsatellite polymorphism in intron 1 of the bovine myostatin gene // *J. Appl. Genet.*, 47(1): 1-3.