

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

СЕЛЬСКОЕ ХОЗЯЙСТВО – ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Сборник научных трудов

Основан в 2003 году

Под редакцией члена-корреспондента
НАН Республики Беларусь В. К. Пестиса

Том 37

ЗООТЕХНИЯ

Гродно
ГГАУ
2017

УДК 636 (06)

В сборнике научных трудов помещены материалы научных исследований по вопросам зоотехнии, отражающие современное состояние, проблемы и перспективы развития животноводческой отрасли сельского хозяйства.

Сборник предназначен для научных сотрудников, преподавателей, аспирантов, руководителей и специалистов предприятий агропромышленного комплекса.

Редакционная коллегия:

В. К. Пестис (ответственный редактор),
С. А. Тарасенко (зам. ответственного редактора),
А. В. Глаз, В. М. Голушко, Ю. А. Горбунов, Г. А. Жолик,
М. А. Кадыров, А. В. Кильчевский, К. В. Коледа,
В. П. Колесень, В. В. Малашко, В. А. Медведский,
Г. Е. Раицкий, А. П. Шпак, Н. С. Яковчик

ISBN 978-985-537-108-4

© УО «ГТАУ», 2017

УДК 636.2.082

**МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЭСТРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА
У ОВЕЦ МЕСТНЫХ ПОРОД**

**Е. С. Чебуранова¹, О. А. Епишко¹, А. В. Малец¹, Т. М. Комендант¹,
Н. А. Глинская²**

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28
e-mail: echeburanova@inbox.ru)

² – УО «Полесский государственный университет»

***Ключевые слова:** ген, рецептор, овца, ген эстрогенового рецептора (ESR), ПЦР-ПДФ.*

***Аннотация.** В настоящее время селекция в овцеводстве Республики Беларусь ведется традиционными методами. Во всем мире уже несколько десятков лет применяются современные молекулярно-генетические методы, позволяющие вести целенаправленную селекцию на сохранение или выбраковку из популяции определенного признака или мутации. Похожие исследования были проведены на популяции крупного рогатого скота и свиней, в результате которых было выявлено увеличение общего числа рожденных телят и поросят. Именно поэтому для увеличения репродуктивной функции у овец была разработана методика для определения мутации гена эстрогенового рецептора (ESR), ассоциированного с развитием вторичных половых признаков. Разработан метод ПЦР-ПДФ-анализа для генотипирования популяции овец, разводимых на территории Республики Беларусь, были подобраны праймеры, а также ПЦР-режим с помощью рестрикционной эндонуклеазы MhlI.*

**METHODICAL ASPECTS OF DETERMINATION OF ESTROGEN
RECEPTOR GENE POLYMORPHISM OF SHEEP**

**E. S. Cheburanova¹, O. A. Epishko¹, A. V. Malec¹, T. M. Komendant¹,
N. A. Glinskaya²**

¹ – EI «Grodno State Agrarian University»
(Belarus, Grodno, 230008, 28 Tereshkova st.
e-mail: echeburanova@inbox.ru)

² – EI «Polessky State University»
(Belarus, Pinsk, 225710, 23 Dnieper flotilla Str)

***Key words:** gene, receptor, sheep, estrogen receptor gene (ESR), PCR-RFLP*

***Summary.** Currently, breeding in the sheep breeding of the Republic of Belarus is conducted by traditional methods. In the whole world, for several decades,*

modern molecular genetic methods have been used that allow targeted selection to preserve or reject a specific trait or mutation from the population. Similar studies have been conducted on populations of cattle and pigs, which resulted in an increase in the total number of calves and pigs born. That is why, to increase the reproductive function in sheep, a technique was developed to determine the mutation in the estrogen receptor gene (ESR) associated with the development of secondary sexual characteristics. A PCR-RFLP-analysis method for genotyping a population of sheep bred on the territory of the Republic of Belarus, primers were selected, as well as PCR-mode, using the restriction endonuclease Mh11.

(Поступила в редакцию 01.06.2017 г.)

Введение. Овцеводство – отрасль животноводства, которая всегда являлась неотъемлемой частью народнохозяйственного комплекса страны. Экономическое благополучие овцеводства базировалось в основном на производстве шерсти, доля которой в общей стоимости продукции этой отрасли составляла 70-80%.

На 01.01.2017 г. в республике имеется всего 77 тыс. голов овец, в том числе в общественном секторе – 10 тыс., в фермерских хозяйствах – 14 тыс., в частном секторе – 53 тыс. голов овец.

Породный состав имеющегося в стране поголовья овец представлен в настоящее время следующими породами: прекос, тексель, романовская, суффолк, мерноландшаф, асканийская, лакауне и др.

Помимо продуктивных качеств важно учитывать и репродуктивные признаки животного, т. к. овцы являются скороспелыми и многоплодными животными, то экономический эффект очевиден. Однако традиционные методы селекции позволяют увеличить данный признак всего на 3-5% за 10 лет, поэтому необходим поиск более современных и инновационных методов, позволяющих ускорить процесс селекции и вести отбор животного уже в раннем возрасте.

С целью выявления наиболее успешных генотипов используют генетические маркеры. В конце 70-х гг. появилась возможность идентифицировать генетические маркеры репродуктивных признаков, которые позволяют вести отбор животного непосредственно на уровне ДНК, независимо от пола, возраста, а также воздействия факторов внешней среды.

Использование генетических маркеров репродуктивных признаков позволяет более достоверно оценить генетический потенциал пород, популяций и отдельно взятых особей, более точно контролировать селекционный процесс.

В настоящее время в литературных источниках имеется информация о генах, влияющих на репродуктивные признаки овец. К ним относится ген эстрогенового рецептора (ESR), влияющий на развитие

вторичных половых признаков, ген пролактинового рецептора (PRL), определяющий биологическую способность к многоплодию, выкармливанию и созреванию ооцитов, ген бета-субъединицы фолликулоstimулирующего гормона (FSH β), регулирующий фолликулогенез.

Наиболее широкое распространение в качестве генетического маркера плодовитости овец получил ген эстрагенового рецептора (ESR).

Эстрогены и их рецепторы играют главную роль в воспроизводительном цикле у многих сельскохозяйственных животных, включая овец. Стероидные гормоны и их рецепторы участвуют в регулировании экспрессии гена, а также влияют на быстрое увеличение и дифференцирование в целевых тканях. Мишенями для эстрогенов служат клетки матки и влагалища.

В период полового созревания резко увеличивается развитие яйцеводов, влагалища, молочных желез, пробуждается половой инстинкт у самок. В то же время эстрогены влияют на рост костей, с чем связано развитие телосложения по женскому типу, и обладают анаболическим эффектом, стимулируя транскрипцию и трансляцию, усиливая синтез белков, жиров, гликогена, тем самым задерживая в организме глюкозу, натрий, кальций, фосфор и воду, в результате снижается активность сальных желез [1, 2, 3].

Мутация в гене эстрагенового рецептора (ESR) приводит к изменению белкового рецептора эстрогена, что является причиной спонтанных абортс и рака молочной железы. С помощью различных рестрикционных ферментов найдены полиморфные участки в гене эстрагенового рецептора. Наибольший интерес представляет полиморфная система ESR/PvuII, расположенная в первом интроне гена, для которой идентифицировано два кодоминантных аллеля – ESR^A и ESR^B. Данная точковая мутация позволяет определять аллельные варианты гена эстрагенового рецептора методом ПЦР-ПДРФ-анализа [3, 4, 5, 6].

Цель работы: разработка методических подходов к определению полиморфизма гена эстрагенового рецептора (ESR) в популяциях овец, разводимых в Республике Беларусь.

Материал и методика исследований. Исследования проводились на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «Гродненский государственный аграрный университет». В качестве биологического материала использовался выщип кусочка ткани ушной раковины размером 0,5 x 0,5 см². Выделение нуклеиновых кислот из образцов проводилось перхлоратным методом с двойной очисткой.

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе научной работы отобран биологический материал баранов и ярок (n=50).

Для качественного проведения ПЦР важна не только концентрация геномной ДНК, но также и ее степень очистки, которая была определена с использованием современного спектрофотометра Implen P360 (при длине волны 260 нм). Оптимальная концентрация геномной ДНК, которой достаточно для проведения реакции, составила 10-100 нг/мкл. Степень очистки выделенной ДНК колебалась в пределах от 1,8 до 2,2. Нативность выделенной ДНК определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле по отсутствию «шлейфа» фрагментов ДНК, а также интенсивности свечения бромистого этидия в УФ свете на геле-документирующей системе GelDoc (BioRad, США).

В ходе выполнения исследований на основе литературных данных нами подобраны оптимальные последовательности олигонуклеотидов, синтезированных ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь), позволяющие получить продукт амплификации размером – 419 п.н.:

ESR-Exl-F: 5'- TGCACCAGATCCAAGCCAACGA-3',

ESR-Exl-R: 5'- CGGGTACCTGTAGAAGGCGGGAG-3'.

При наличии нуклеиновых кислот в образце во время прохождения реакции амплификации ДНК претерпевает значительные изменения, обеспечивающиеся уникальными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех основных этапов: 1) денатурации, во время которой происходит разрыв водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур, в результате данного цикла двухнитевая форма ДНК переходит в однонитевую; 2) отжига, в течение данного цикла происходит присоединение синтетических олигонуклеотидов к одноцепочечной ДНК-мишени. Подбор праймеров осуществляется таким образом, что они ограничивают искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК. Если данное условие не соблюдается, то отжиг праймеров не происходит. 3) Элонгации (синтез). Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.

При слишком большом количестве циклов возможно сокращение среды реакции по праймерам, нуклеотидам и полимеразе, приводящее к увеличению содержания неспецифических продуктов, поэтому в ПЦР программу включили 34 циклов.

Подобран оптимальный объем и соотношения реакционной смеси, которая включает: 1 x Таq-буфер – 2 мкл; 50 мМ MgCl₂ – 1,25 мкл; Смесь дНТФ – 2 мкл; Праймер 1(прямой) – 0,25 мкл; Праймер 2 (обратный) – 0,25 мкл; Таq-полимераза – 0,6 мкл; Н₂О (свободная от нуклеаз) – 17,65 мкл и геномная ДНК – 1 мкл.

ПЦР-анализ гена эстрогенового рецептора проводили по следующей ПЦР-программе: первоначальная денатурация 4 мин при 95°С,

денатурация при 94 °С – 1 мин, отжиг при 66,5 °С – 1 мин, синтез при 72 °С – 1 мин (34 цикла), завершающий синтез при 72 °С – 7 мин. Для проведения амплификации использовали термодиклер для амплификации нуклеиновых кислот C1000 Touch (BioRad, США).

Визуализацию амплифицированных фрагментов проводили с помощью гель-документирующей системы GelDoc (BioRad, США). Продукт амплифицированного участка гена эстрогенового рецептора (ESR) составил 419 п.н.

Нами соблюдались рабочие условия: при работе температура в помещении колебалась не более чем на ±2 °С и составляла от 20 до 22 °С; влажность 43-45% (без конденсации).

Полученные продукты амплификации подвергали расщеплению эндонуклеазой рестрикции MhI1 («СибЭнзим», Россия) в стандартных условиях при температуре равной 37 °С в течение 16 ч. После инкубирования рестриционные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в 3%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, при постоянном напряжении 130В. Результаты электрофореза анализировали под ультрафиолетовыми лучами с использованием GelDoc (BioRad, США). Для оценки длины фрагмента использовали маркер молекулярного веса «M50» фирмы ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь).

После расщепления эндонуклеазой MhI1 («СибЭнзим», Россия) амплифицированного фрагмента ДНК гена эстрогенового рецептора (ESR) проводилась визуализация продуктов с генерацией генотип специфических фрагментов: 276, 73, 70 п.н. соответствует генотипу АА; 276, 143, 73 и 70 п.н. – генотипу АВ, 276 и 143 п.н. – генотипу ВВ.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований нами разработаны методические подходы проведения ПЦР-ПДРФ-анализа гена эстрогенового рецептора (ESR), ассоциированного с репродуктивными признаками овец, подобраны оптимальные режимы, объемы и концентрация реакционных смесей, режимы амплификации и рестрикции, что позволит в дальнейшем проводить генотипирование животных в раннем возрасте или при рождении, тем самым вести целенаправленную селекцию на увеличение репродуктивных признаков, что будет способствовать интенсификации селекционного процесса в овцеводстве Республики Беларусь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Левин, К. Л. Физиология воспроизводства свиней / К. Л. Левин. – М. : Росагроиздат, 1990. – 255 с.
2. Лобан, Н. А. Влияние полиморфизма гена эстрогенового рецептора (ESR) на плодовитость свиней крупной белой породы / Н. А. Лобан, О. Я. Василюк // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2004. – № 3. – С. 68-71.

3. Широкова Н. В. Генетическое детерминирование плодовитости овец / Н. В. Широкова // Молодой ученый. – 2013. - № 6. – С. 785-787.
4. Jia L. H., Chu M. X., Chen H. Q., Fang L. Cloning and sequence analysis of exon 4 of estrogen receptor gene in Small Tail Han sheep // China Animal Husbandry and Veterinary Medicine. 2008-02.
5. Ozmen O., Seker I., Kul B.C., Ertugrul O. Haplotype variation of estrogen receptor- α (ER- α) gene exon 4 in Turkish sheep breeds // Генетика. 2012. Т. 48. – № 10. – С. 1185-1189.
6. Xiao-Dan B., Ming-Xing C., Hai-Guo J., Li F., Su-Cheng Y. Estrogen receptor as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep // Acta Genetica Sinica. 2005. V. 32. – P. 1060-1065.