

*Е.В. Барташевич, 3 курс**Научный руководитель – Т.И. Епишко, д. с./х. н., доцент**Полесский государственный университет*

Одной из важнейших проблем животноводства была и остается проблема недополучения здорового и жизнеспособного потомства. Использование искусственного осеменения и трансплантации эмбрионов значительно повысило роль одного животного и одновременно риск в распространении определенных полиморфных типов генов, детерминирующих генетические дефекты, что привело к насыщению популяций летальными мутациями. Распространению летальных мутаций в Беларуси также способствовала интенсивная голштинизация молочного скота [3, 4, 5, 6, 7].

Племенные животные данной породы ценятся во всем мире в связи с высокой молочной продуктивностью. В то же время, распространение выдающихся представителей голштинской породы сопровождается увеличением частот встречаемости некоторых генетически детерминированных заболеваний, в частности, уменьшенной адгезивностью лейкоцитов (BLAD), вызываемой точковой мутацией в кодирующей части аутосомного гена CD18 в результате замены аспаргиновой кислоты на глицин в 128 позиции. Клинические симптомы проявления мутации BLAD в гомозиготном состоянии включают в себя предрасположенность к респираторным инфекциям, диарее и низкую естественную резистентность организма к бактериальным инфекциям. Носители мутантного гена в гомозиготе не поддаются излечению, имеют замедленный рост, тусклую взъерошенную шерсть, язвы в ротовой полости, шаткость зубов, поносы. У них наблюдается повышенное содержание зрелых нейтрофилов – больше 47000 на 1 млн. (норма – около 4000 на 1 млн.). Болезнь фенотипически проявляется только у животных с гомозиготным рецессивным генотипом, которые погибают в первые месяцы постнатального развития. У гетерозигот фенотипических отклонений не выявлено [8].

Ранее проведенный мониторинг генетической структуры быков-производителей госплемпредприятий Республики Беларусь по локусу гена BLAD выявил, что в среднем по исследованным популяциям 2,6% животных являлись носителями синдрома иммунодефицита. Частота встречаемости данной мутации по отдельным племпредприятиям достигла 5,6%, а у высокопродуктивных коров – 11,8%. В РСУП «Брестплемпредприятие» выявлено 1,8% животных – носителей мутации CD18^{TL/BL}, частота встречаемости аллеля CD18^{BL} составила 0,009.

В странах с развитым молочным скотоводством подсчитано, что ежегодный экономический ущерб от этого заболевания составляет только в США 5 млн. долларов [1, 2].

На базе УО «Полесский государственный университет» в научно-исследовательской лаборатории промышленной биотехнологии было проведено генетическое тестирование 45 быков-производителей РСУП «Брестплемпредприятие».

Целью исследования служило изучение генетической структуры популяции быков производителей по гену CD18.

ДНК-тестирование по гену CD18, мутация в котором обуславливает синдром иммунодефицита, проведено методом ПЦР-ПДРФ с идентификацией генотипов CD18^{TL/TL} (здоровые животные) и CD18^{BL/TL} (животные – носители мутации).

Объектом исследований являлись быки-производители, а также биопробы спермы (гранулы либо пайетты).

Ядерную 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 амплификации, составляет 150-250 нг/мкл (рисунок 1).

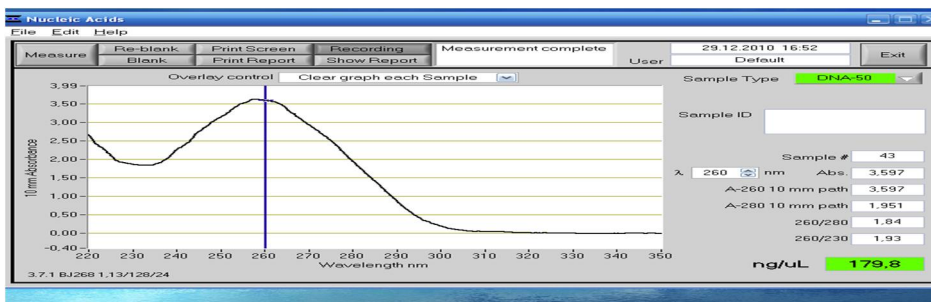


Рисунок 1 – Результат определения концентрации ДНК на спектрофотометре Nanodrop 1000

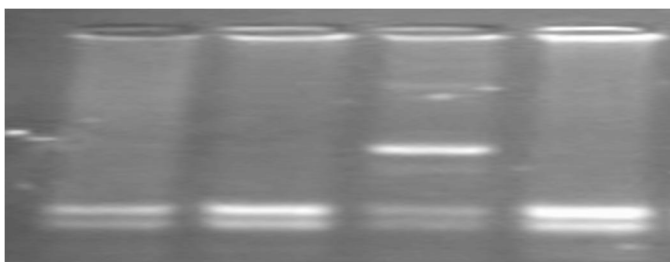
Синтез фрагмента гена CD18 проводили на амплификаторе типа TProfessional basic с использованием праймеров:

BLAD1: 5' -TGA GAC CAG GTC AGG CAT TGC GTT CA- 3'

BLAD2: 5'- CCC CCA GCT TCT TGA CGT TGA CGA GGT C -3',

и ПЦР - программы: «горячий старт» - 5 мин при 93⁰ С; 35 циклов: денатурация - 1 мин при 93⁰ С, отжиг - 1 мин при 60⁰ С, синтез - 1 мин при 72⁰ С; достройка– 5 мин при 72⁰ С.

Результаты расщепления продуктов ПЦР рестриктазой TaqI оценивали с использованием системы гель-документирования Quantum (рисунок 2).



Дорожки 1,2,4-соответствуют животным с генотипом CD18^{TL/TL} – фрагменты 71 и 61 п.о.
Дорожка 3 – генотипу CD18^{BL/TL} - фрагменты 132, 71 и 61 п.о.

генотип CD18^{BL/BL} отсутствует

Рисунок 2 – Результаты рестрикции амплификатов, полученных с использованием рестриктазы TaqI. Электрофорез проводили в 4 % агарозном геле, 40 мин, 110 В

В ходе проведения ПЦР-ПДРФ анализа идентифицируются животные генотипов CD18^{TL/TL} и CD18^{TL/BL}. Гомозиготный генотип CD18^{BL/BL} не выявляется. Согласно данным научной литературы, животные носители рецессивного генотипа погибают на ранней стадии онтогенеза [2].

В наших исследованиях анализ генетической структуры популяций КРС по локусу гена CD18, не выявил наличие точечной мутации в данном гене. Протестированные животные были резистентны к синдрому иммунодефицита. Это является результатом того, что все особи носители летальных аллелей отбраковываются на ранних стадиях.

Результаты исследований свидетельствуют о целесообразности применения ДНК-диагностики синдрома иммунодефицита племенного поголовья КРС. Своевременное выявление носителей данной мутации позволит избежать скрещивания двух гетерозиготных особей или, наоборот, использовать при разведении под контролем в случае их высокой препотентности.

Список использованных источников

1. Введение в ДНК – технологию / Глазко В.И. [и др.] // М., ФГНУ «Росинформагротех», 2001.- 434 с.
2. Калашникова Л.А., Дунин И.М., Глазко В.И. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко // Лесные Поляны. – 1999. – 147с.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук.-М.: “Мир”.- 1984.- 480 с.

4. Марзанов Н.С. Скрининг гена BLAD-синдрома у животных черно-пестрого корня / Н.С. Марзанов [и др.] // Ветеринарная медицина. – 2000. - № 3. – С.59-61.
5. Меркурьева, Е.К., Березовский Н.Д., Шангин, Г.Н. Генетика с основами биометрии. – М.: Колос, 1983. – С.357.
6. Engelhardt I. Inzucht, bedeute Ahnen und Warschaeinlichtkeit fur BLAD-Merkmalstrauger in der Deutschen Schwarzbuntzucht, Hannover, 1996.
7. Kaminski S., Czarnik U. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carries using a new PCR test // J.Appl. Genet., 1997, P.51-55
8. Kehrli V.E., Schmalstieg F.C., Anderson D.C. Molecular definition of the bovine granulocytopathy syndrome: identification of deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein // Am. J. Vet. Res. – 1990.-51.- № 11.-P. 1826-1936.