

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК
ДЛЯ ОЦЕНКИ ДОСТОВЕРНОСТИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА****Н.В. Журина**

НПЦ НАН Беларуси по животноводству

Метод контроля происхождения сельскохозяйственных животных по микросателлитным последовательностям ДНК введен в практику во всех странах с развитым животноводством и стал обязательным элементом первичного зоотехнического учета, так как позволяет проводить генетическую идентификацию каждого животного и максимально повысить уровень контроля происхождения племенных животных. Тестирование крупного рогатого скота по 11 микросателлитным локусам обеспечивает доказательство происхождения с 99,99% степенью достоверности.

В РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству» совместно с ГУ «НИИ криминалистики и судебной экспертизы Министерства юстиции Республики Беларусь» проводятся исследования, направленные на разработку способа оценки достоверности происхождения крупного рогатого скота по полиморфизму нуклеотидных последовательностей.

Для анализа полиморфизма ДНК были отобраны локусы с учетом сведений о частоте использования их в исследованиях популяций КРС, их информативности, рекомендации Международного общества генетиков и состава коммерческих наборов: BM2113, BM1824, SPS115, TGLA227, TGLA126, TGLA122, TGLA53, ETH3, ETH225, ETH10 и INRA023.

Исследование влияния параметров проведения ПЦР на эффективность амплификации ДНК свидетельствует о том, что оптимальные температуры отжига праймеров для локусов BM2133, BM1824, SPS115, ETH225, ETH10, TGLA227, TGLA126, TGLA122 лежат в диапазоне температур 58-60°C. Отчетливое снижение интенсивности амплификации при температуре 66 °С наблюдается для локусов BM1824, ETH225, ETH10, TGLA227 и TGLA122. Для локуса TGLA126 предельная температура отжига при проведении ПЦР лежит в диапазоне 62-63°C.

Концентрация $MgCl_2$ в реакционной смеси - 1,5 мМ для большинства исследуемых локусов близка к оптимальной и в корректировке не нуждается.

Для исследуемых локусов проводилось определение диапазона концентрации праймеров, при котором наблюдается устойчивое протекание ПЦР с образованием детектируемого количества продуктов реакции. Установлено, что для локусов BM2113, BM1824, SPS115, ETH225, INRA023, TGLA053, TGLA227, TGLA126, TGLA122 продукты ПЦР начинают выявляться при концентрациях 0,05-0,075 мкМ с оптимумом и при концентрациях более 0,1 мкМ их интенсивность увеличивается незначительно. Для эффективного протекания ПЦР в локусе ETH10 требуется более высокая концентрация праймеров (0,2-0,3 мкМ).

Исследование условий электрофоретического разделения продуктов ПЦР в микросателлитных локусах проводили в трех вариантах систем:

1. Нативный электрофорез в камере «Hoefер SE600» («Hoefер Scientific Instruments», США) в триформатной системе. Использовались блоки ПААГ (полиакриламидный гель) размером 16x18 см, толщиной 0,75 и 1,0 мм. Для заливки разделяющего геля длиной 14,5-15 см готовили смесь состава: Т = 8,5%; С = 5,5 %, 5-6 % глицерин, 1× TFB (рН 9,0), 0,1% ТЕМЕД, 0,1% ПСА.

2. Денатурирующий электрофорез в камере «IBI Base Runner 100» («Eastman Kodak Company», США) в системе с мочевиной. Использовались блоки ПААГ размером 22x24 см и 22x36 см, толщиной 0,4 мм. Для заливки геля готовили смесь состава: Т = 5%; С = 5 %, 7 М мочевины, 0,5× ТВЕ, 0,1% ТЕМЕД, 0,1% ПСА.

3. Разделение в секвенаторе «MegaBACE 750» («Amersham Biosciences», США) в денатурирующих условиях в капиллярах длиной 40 см, диаметром 0,2 мм, заполненных фирменным гелевым матриксом на основе линейного ПААГ.

Для пластинчатых вариантов электрофореза в ПААГ достаточное разделение достигается при 900-1300 В-часов и зависит от молекулярных размеров разделяемых фрагментов. Установлено, что эффективное фракционирование продуктов ПЦР для локуса TGLA227 достигается при продолжительности электрофоретического разделения 1000 В-час. Для достижения максимального разрешения в других локусах продолжительность проведения электрофореза должна быть увеличена до 1200-1300 В-час для локусов TGLA126, TGLA122, BM2113, ETH225. Для остальных локусов продолжительность электрофореза может быть увеличена до 1600-1800 В-час и более. При изучении результатов разделения продуктов ПЦР в нативном и денатурирующем гелях установлено, что сравнительный анализ ДНК, при котором продукты ПЦР для анализируемых образцов располагаются в соседних дорожках геля, может осуществляться с использованием нативного ПААГ. В то же время, установление истинного размера фрагментов в нативном ПААГ осложнено как его более низкой разрешающей способностью, так и появлением экстрааллельных полос вследствие достаточной стабильности продуктов вторичного взаимодействия амплифицированных фрагментов в нативных условиях электрофореза.

Исследования полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК крупного рогатого скота позволили выявить наличие 10-ти аллелей в локусе BM2113 (диапазон молекулярных размеров (121-141 п. о.), 6-ти аллелей в локусе BM1824 (178-190 п. о.), 11-ти аллелей в локусе SPS115 (240-262 п. о.), 7-ми аллелей в локусе ETH225 (140-152 п. о.), 10-ти аллелей в локусе INRA023 (200-218 п. о.), 13-ти аллелей в локусе TGLA053 (154-178 п. о.), 9-ти аллелей в локусе TGLA227 81-103 п. о.), 8-ми аллелей в локусе TGLA126 (109-123 п. о.), 15-ти аллелей в локусе TGLA122 (139-183 п. о.).