

## АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЧЕРНО-ПЕСТРОГО КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО STR - ЛОКУСАМ

Н.А. Глинская, Т.И. Епишко, О.А. Епишко

*УО «Полесский государственный университет»*

**Введение.** Микросателлиты (STR-локусы) – особый класс ДНК-маркеров, представляющий собой фрагменты ДНК с большим количеством tandemно повторяющихся коротких последовательностей из нескольких пар нуклеотидов [1]. Микросателлиты высокополиморфны, имеют десятки аллелей в каждом локусе, легко выявляются и идентифицируются, а так же обладают высокими темпами мутирования [2]. Аллели микросателлитного локуса отличаются друг от друга длиной (в основном числом повторов). Небольшие размеры STR-локусов позволяют применить метод полимеразной цепной реакции в целях генотипирования с высокой воспроизводимостью [3].

Микросателлиты встречаются в большом количестве у всех эукариотических организмов и используются для изучения как природных популяций, так и популяций сельскохозяйственных животных и растений [4].

В настоящее время выделено и описано более 2000 микросателлитов в геноме крупного рогатого скота (база данных INRA, Франция) и их количество увеличивается с каждым днем.

Высокая информативность микросателлитов делает их удобным инструментом для решения практических задач, таких как установление отцовства и материнства, а также анализа генетических взаимоотношений между популяциями. При решении такого рода вопросов достоверность выводов зависит от информативности исследованных полиморфных локусов, которую можно оценить на основе данных популяционного анализа (частота аллелей и дисперсия микросателлитных повторов). В связи с чем, целью наших исследований служило проведение генетико-популяционного анализа черно-пестрого скота по 11 микросателлитным локусам для изучения генетического разнообразия популяций.

**Материалы и методы исследований.** Проведено генетическое тестирование по 11 микросателлитным локусам: TGLA53, TGLA227, ETH3, SPS115, BM2113, TGLA122, BM1824, INRA023, ETH10, TGLA126, ETH225 (таблица 1) на базе УО «Полесский государственный университет» в научно-исследовательской лаборатории промышленной биотехнологии. Всего протестировано 325 голов черно-пестрого крупного рогатого скота, в том числе 216 животных, разводимых в КСУП «Племенной завод «Красная звезда», и 109 – в СПК «Агрокомбинат Снов».

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

Локус	Длины фрагментов, п.о.	Метка праймера, краситель	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

Геномную ДНК выделяли из ткани животных перхлоратным методом, концентрацию которой измеряли на спектрофотометре «NanoDrop 1000».

Реакционная смесь для проведения мультиплексной реакции готовилась в объеме 15 мкл и включала следующие компоненты:

1. ПЦР буфер 10X – 1,5 мкл
2. MgCl<sub>2</sub> (25 mM) – 1,8 мкл
3. dNTP mix (10-12 mM) – 1,5 мкл
4. Праймеры (mix) – 3 мкл
5. Таq-полимераза – 1 ед
6. Вода – до 15 мкл
7. Раствор ДНК 1 мкл (конц. 100 – 200 нг/мкл)

Для проведения амплификации использовались меченные праймеры. В качестве меток использовались FAM, JOE и NED метки, флюоресцирующие синим, зеленым и желтым, соответственно.

Полимеразная цепная реакция была проведена на амплификаторе TProfessional basic, Германия. Режим амплификации состоял из следующих шагов: «горячий старт» – 3 мин при 95°C; 97°C – 20 сек; 32 цикла: денатурация – 30 сек при 95°C, отжиг – 65°C – 1 сек и 59°C – 1 мин 15 сек; синтез 30 сек при 68°C; элонгация 30 сек – 70°C и охлаждение 4°C.

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

Визуализацию и анализ результатов осуществляли на трансиллюминаторе Quantum, Франция.

Перед постановкой в секвенатор, образцы помещали в амплификатор на денатурацию в смеси объемом 15 мкл, включающую: 1,2 мкл амплификата, 0,5 мкл LIZ-500 Size Standart и 13,3 мкл формамида extra pure.

Денатурацию проводили в течении 5 мин при 95°C.

Затем производили непосредственную загрузку образцов в секвенатор «ABI Prism 3130», руководствуясь протоколом Applied Biosystems.

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

Дисперсия числа повторов рассчитывалась по Животовскому Л.А., а ожидаемые и наблюдаемые уровни гетерозиготности – по Харди-Вайнбергу.

**Результаты и их обсуждение.** Для выполнения поставленной цели нами проведен анализ генетического разнообразия популяций черно-пестрого крупного рогатого скота, разводимого в КСУП «Племенной завод «Красная звезда» и СПК «Агрокомбинат Снов» (таблица 2).

**Таблица 2 – Популяционно-генетические характеристики черно-пестрого крупного рогатого скота по 11 микросателлитным локусам**

Характеристики	КСУП «ПЗ «Красная звезда» n=216	СПК «Агрокомбинат Снов» n=109
<b>BM1824</b>		
Число аллелей	31	12
Число генотипов	54	41
Наблюдаемая гетерозиготность	0,93	0,85
Ожидаемая гетерозиготность	0,81	0,85
Дисперсия числа повторов	13,40	2,70
<b>BM2113</b>		
Число аллелей	23	15
Число генотипов	90	40
Наблюдаемая гетерозиготность	0,93	0,83
Ожидаемая гетерозиготность	0,92	0,85
Дисперсия числа повторов	5,57	2,29

Продолжение таблицы 2

<b>ETH10</b>		
Число аллелей	22	16
Число генотипов	72	41
Наблюдаемая гетерозиготность	0,92	0,83
Ожидаемая гетерозиготность	0,88	0,80
Дисперсия числа повторов	4,17	3,67
<b>ETH225</b>		
Число аллелей	25	14
Число генотипов	84	31
Наблюдаемая гетерозиготность	0,94	0,90
Ожидаемая гетерозиготность	0,90	0,77
Дисперсия числа повторов	6,59	2,78
<b>ETH3</b>		
Число аллелей	18	11
Число генотипов	56	24
Наблюдаемая гетерозиготность	0,95	0,79
Ожидаемая гетерозиготность	0,89	0,63
Дисперсия числа повторов	5,90	2,13
<b>INRA023</b>		
Число аллелей	28	16
Число генотипов	91	37
Наблюдаемая гетерозиготность	0,96	0,92
Ожидаемая гетерозиготность	0,89	0,83
Дисперсия числа повторов	7,50	3,45
<b>SPS115</b>		
Число аллелей	22	14
Число генотипов	73	31
Наблюдаемая гетерозиготность	0,92	0,81
Ожидаемая гетерозиготность	0,86	0,57
Дисперсия числа повторов	4,20	2,49
<b>TGLA122</b>		
Число аллелей	34	20
Число генотипов	91	48
Наблюдаемая гетерозиготность	0,97	0,92
Ожидаемая гетерозиготность	0,86	0,85
Дисперсия числа повторов	16,60	5,16
<b>TGLA126</b>		
Число аллелей	21	11
Число генотипов	73	22
Наблюдаемая гетерозиготность	0,89	0,82
Ожидаемая гетерозиготность	0,87	0,59
Дисперсия числа повторов	12,40	2,17
<b>TGLA227</b>		
Число аллелей	33	15
Число генотипов	97	48
Наблюдаемая гетерозиготность	0,98	1,00
Ожидаемая гетерозиготность	0,94	0,87
Дисперсия числа повторов	14,68	2,39

Окончание таблицы 2.

<b>TGLA53</b>		
Число аллелей	31	15
Число генотипов	94	22
Наблюдаемая гетерозиготность	0,90	0,95
Ожидаемая гетерозиготность	0,94	0,98
Дисперсия числа повторов	13,10	2,46
<b>В общем по исследованным локусам</b>		
Средняя наблюдаемая гетерозиготность	0,93	0,87
Средняя ожидаемая гетерозиготность	0,81	0,78
Среднепопуляционная дисперсия	9,46	2,88

Была проведена оценка гетерозиготности исследованных животных, так как она является важным параметром в вопросах динамики генетического состояния популяций. Гетерозиготность – это состояние, присущее гибриднему организму, при котором его гомологичные хромосомы несут разные формы (аллели) того или иного гена или различаются по взаиморасположению генов. Она служит мерой генетической изменчивости популяции и определяется как средняя частота гетерозиготных особей по определенным локусам.

Увеличение гомозиготности сопровождается снижением генетического и фенотипического разнообразия и приводит к повышению однородности популяций.

В группе исследованных животных КСУП «Племенной завод «Красная звезда» наибольшим уровнем наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности характеризовался локус TGLA227 (0,98 и 0,94, соответственно), а наименьшим значением наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности – локусы TGLA126 (0,89) и BM1824 (0,81), соответственно.

В популяции животных СПК «Агрокомбинат Снов» наибольшей наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью отличались локусы TGLA227 (1,00) и TGLA53 (0,98), соответственно, в то время как наименьшей наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью характеризовались локусы ETH3 (0,79) и SPS115 (0,57), соответственно.

В общем, уровень гетерозиготности в обеих выборках по одиннадцати исследованным микросателлитным локусам превысил 50%, что свидетельствует о высоком полиморфизме изучаемых микросателлитных маркеров и целесообразности их использования для оценки генетического разнообразия популяции и достоверности происхождения животных с высокой степенью точности (99,999).

Однако для STR-локусов более адекватными оценками изменчивости являются не показатели, основанные на частотах аллелей (поскольку для полиаллельных систем фиксируемые в относительно небольших выборках частоты имеют высокую вероятность быть смещенными относительно генеральной совокупности), а показатели, характеризующие молекулярную вариабельность локуса, такие как число аллелей и дисперсия числа повторов.

По уровню молекулярного разнообразия к высоковариабельным локусам в популяции животных КСУП «Племенной завод «Красная звезда» можно отнести локусы TGLA122 и TGLA227, а в популяции животных СПК «Снов» локусы TGLA122, ETH10 и INRA023, так как они характеризовались наибольшим числом аллелей 34, 33, 20, 16, 16 и уровнем дисперсии 16,6; 14,68; 5,16; 3,67; 3,45 соответственно.

Ко второй группе низковариабельных локусов в обеих популяциях можно отнести локусы ETH3 и TGLA126, т. к. они отличались наименьшим числом аллелей (18 и 11, соответственно) и уровнем дисперсии (5,9 и 2,13, соответственно). Все остальные локусы имели промежуточные значения (средний уровень молекулярных различий).

Таким образом, в исследованных популяциях обнаружен высокий «запас» генетического разнообразия по микросателлитным локусам, что свидетельствует о возможности их использования для паспортизации, идентификации, подтверждения происхождения отдельных индивидов и изучения генетического разнообразия пород и популяций черно-пестрого крупного рогатого скота.

## Литература

1. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci / D.B. Goldstein [et al.] // *Genetics*. – 1995a. – Vol. 139. – P. 463–471.
2. Henderson, S.T. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae* / S.T. Henderson, T.D. Petes // *Mol. Cell. Biol.* – 1992. – Vol.12 – P. 2749–2757.
3. Weber, J.L. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction / J.L. Weber, P.E. May // *Am. J. Human Genetics*. – 1989. – Vol. 44. – P. 388.
4. Zhivotovsky, L.A. Microsatellite variability and genetic distances / L.A. Zhivotovsky, M.W. Feldman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – Vol. 92. P. 11549–11552.