

ed. Possibilities of using ISSR-marking for intra- and interbreed variation estimation for resolving strategic questions of selection and scanty pig population preservice as well as for studying genetic processes of breeding divergence were demonstrated.

PCR-amplifikaciya, ISSR-marketing, population, changeability, genetic likeness, lokus, amplikon

УДК 577.21:575.113:636.2

Н.Б. МОХНАЧОВА

Институт розведення і генетики тварин УААН

ЗАСТОСУВАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ГЕНОТИПУВАННЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Висвітлено результати застосування мікросателітних локусів при дослідженні генотипу великої рогатої худоби.

ДНК-технології, мікросателіти, генетичні маркери, поліморфний локус, ПЛР, ампліфікація, праймер

На сучасному етапі реорганізації тваринництва ДНК-технології стають одним з ключових факторів, які повинні забезпечувати не тільки реалізацію комплексу завдань у системі збереження генетичного різноманіття структури порід і виявлення генетичного потенціалу тварин щодо показників продуктивності, а й генотипування та підтвердження походження племінних тварин.

Унаслідок високого рівня поліморфізму при дослідженні генома та генотипування тварин широко застосовуються поліморфні локуси, значна частина яких представлена тандемними повтора-

ми. Цей клас поліморфних локусів складається з міні-сателітів (VNTRs) та мікросателітів (STRs), які виступають у ролі генетичних маркерів відповідного генетичного матеріалу [1].

Алельний поліморфізм мікросателітів і міні-сателітів у першу чергу ґрунтується на різниці чисел тандемних повторів, що містяться в різних алелях, тобто на поліморфізмі "довжини". Число тандемних повторів у конкретному алелі може змінюватись від одного до декількох десятків. Зазвичай у популяції виявляється спектр алелів, що відрізняються один від одного за кількістю повторюваних одиниць, а у кожної тварини є строго по 2 алелі кожного поліморфного локусу рівної (гомозиготний генотип) або різної (гетерозиготний генотип) довжини. Таким чином, алельний поліморфізм міні-сателітів і мікросателітів може бути ефективно використаний для ідентифікації тварин, оскільки профіль генотипів за декількома поліморфними локусами є унікальним для кожної тварини (виключаючи однайцевих близнюків).

Відповідно до International Society of Animal Genetics- ISAG/FAO 2004 визначено дев'ять мікросателітів як стандарт при генотипуванні та підтвердженні походження тварин великої рогатої худоби, а саме: ETH10, ETH225, BM 1824, BM2113, INRA 023, SPS 115, TGLA 122, TGLA 126, TGLA 227 [7].

Генотипування великої рогатої худоби за мікросателітними локусами розпочали проводити з початку 90-х років. Результати цих робіт на даний час дають змогу ідентифікувати тварин за генотипами. Мікросателітний локус ETH10 (D5S3) розташований на 5-й хромосомі і має розміри 207–231 п.н. При дослідженні цього локусу у польської червоної худоби було виявлено 8 алелів, у німецьких сименталів – 4, у шведських сименталів – 3, у голштинів – 7, у польської чорно-рябої – 7, у польської червоно-рябої – 7, у п'яти аборигенних порід Китаю – 36 [2–6].

ETH 225 (D9S1) визначений на 9-й хромосомі і має розміри 131–159 п.н. Ряд авторів відмічають, що при роботі з ETH 225 у польської червоної худоби виявлено 8 алелів, у німецьких сименталів – 7, у шведських сименталів – 6, у голштинів – 7, у польської чорно-рябої – 6, у польської червоно-рябої – 6, у п'яти аборигенних порід Китаю – 34 [2–6].

© Н.Б. Мохначова, 2008

Розведення і генетика тварин. 2008. Вип. 42.

ETH 3 (D19S2) знаходиться на 19-й хромосомі і має розміри 103–133 п.н. У результаті тестування цього локусу у польської червоної худоби виявлено 9 алелів, у німецьких сименталів – 6, у шведських сименталів – 6, у голштинів – 6, у польської чорно-рябої – 7, у польської червоно-рябої – 7, у п'яти аборигенних порід Китаю – 31 [2–6].

INRA 023 (D3S10) ідентифікований на 3-й хромосомі і має розміри 195–225 п.н. При застосуванні цього маркера у польської червоної худоби було виявлено 9 алелів, у німецьких сименталів – 9, у шведських сименталів – 7, у голштинів – 7, у польської чорно-рябої – 7, у польської червоно-рябої – 8 [2–4,6].

BM 1824 (D1S34) міститься на 1-й хромосомі і має розміри 176–197 п.н. Опубліковані нині дані свідчать, що у польської червоної худоби було виявлено 5 алелів, у німецьких сименталів – 6, у шведських сименталів – 4, у голштинів – 5, у польської чорно-рябої – 4, у польської червоно-рябої – 3, у п'яти аборигенних порід Китаю – 25 [2–6].

Мета досліджень. З метою оптимізації умов ПЛР та визначення генотипу проведено аналіз поліморфізму за мікросателітними локусами ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, BM1824 у тварин червоно-рябої молочної породи.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили на зразках ДНК, які отримали із крові великої рогатої худоби української червоно-рябої молочної породи з племзаводу "Христинівське" Христинівського району Черкаської області. Зразки крові (3 мл) відбиралися з яремної вени у теличок, бугайців та корів у стерильні пробірки з цитратом натрію. Заморожену сперму відбирали з паєт у стерильні пробірки.

Виділення ДНК із крові проводили за допомогою стандартного набору реагентів комплексу "ДНК-сорб-В" виробництва фірми АмпліСенс (Росія) згідно з протоколом.

Для виділення ДНК із сперми використовували стандартний набір реагентів комплексу "ДНК-сорб-А" виробництва фірми АмпліСенс (Росія) згідно з протоколом. До сперми також додавали 3 мкл протеїнази К і 7 мкл дітіотрейтолу.

Ампліфікацію здійснювали в 25 мкл реакційної суміші, 10-х ПЛР-буфер (100 mM Tris HCL, pH 8,8; 500 mM KCl, 0,8%

Nonidet P40); 25 mM MgCl₂ – 1,5 mM, 2 mM dNTP – 0,5 mM кожного, Tag – полімераза (1,25 U/50 мкл), ДНК 50–100 нг/25 мкл, 2 мкл відповідного праймеру, суміш доводили до загального об'єму 25 мкл деіонізованою водою. Для запобігання випаровуванню зразків нашаровували 20 мкл мінеральної олії.

Оцінку генотипу тварин за досліджуваними мікросателітними локусами здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для ампліфікації використовували наступні праймери:

ETH10 5'-GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA-3' і 5'-CCTCCAGCCCACT TTCTCTTCTC-3'; ETH 225 5'-GATCACCTTGCCACTATTTCTC-3' і 5'-ACATGA CACCAGCTGCTACT-3'; ETH 3 5'-GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG-3' і 5'-ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG-3'; INRA 023 5'-GAGTAGAGC-TACAAGATAAAC TTC-3' і 5'-CAGGGTGTTAGATGAACTC-3'; BM 1824 5'-GAGCAAGGTGTTTT TCCAATC-3' і 5'-CATTCTC-CAACTGCTTCCTTG-3'.

Реакція проходила на програмованому термоциклері ТЕР-ЦИК (ДНК-Технологии, Росія). Електрофорез продуктів ампліфікації проводили в 10%-му денатуруючому поліакриламідному гелі в тріс-боратному буфері (ТВЕ) наступного складу: 0,089 М тріс-борат, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА. Для нанесення проб у лунки гелю використовували наступний буфер: 0,25%-й бромфеноловий синій, 30%-й гліцерин, 0,25%-й ксилолціанол.

Візуалізацію продуктів ампліфікації здійснювали на транслюмінаторі в УФ світлі з наступним фотографуванням електрофореграм цифровою камерою. Диференціювання ампліконів за розміром виконували за допомогою маркера молекулярної маси DNA-Ladder 50bp ("Fermentas").

Результати досліджень. З метою відпрацювання методу визначення генотипу тварин за мікросателітними локусами та умов кращого перебігу ампліфікації нами було підібрано оптимальні температурні та часові режими проведення ПЛР, а також склад реакційної суміші.

Для ETH 10, ETH 225 Денатурація 95°C – 2 хв, синтез фрагментів ДНК – 30 циклів при 94°C початкової денатурації –

30 сек, випал праймеру 65°C – 30 сек, синтез 72°C – 1 хв. Реакцію завершували етапом елонгації – 72°C – 5 хв.

ЕТН 3 Денатурація 95°C – 2 хв, синтез фрагментів ДНК – 30 циклів при 94°C початкової денатурації – 30 сек, випал праймеру 56°C – 30 сек, синтез 72°C – 1 хв. Реакцію завершували етапом елонгації – 72°C – 5 хв.

INRA 023 Денатурація 95°C – 2 хв, синтез фрагментів ДНК – 30 циклів при 94°C початкової денатурації – 30 сек, випал праймеру 54°C – 30 сек, синтез 72°C – 1 хв. Реакцію завершували етапом елонгації – 72°C – 5 хв.

ВМ 1824 Денатурація 95°C – 2 хв, синтез фрагментів ДНК – 30 циклів при 94°C початкової денатурації – 30 сек, випал праймеру 55°C – 30 сек, синтез 72°C – 1 хв. Реакцію завершували етапом елонгації – 72°C – 5 хв.

У результаті проведення досліджень із генотипування 15 голів тварин української червоно-рябої молочної породи за локусом ЕТН 225 було отримано алельні варіанти, розмір яких становив 130 п.н., 140 п.н., 154 п.н., 158 п.н.

Тестування локусу ЕТН 3 виявило алелі розміром 110 п.н. і 130 п.н.

При роботі з INRA 023 встановлено алель у 225 п.н., а з локусом ЕТН 10 – 210 п.н., 215 п.н., 225 п.н. і 230 п.н.

Алелі довжиною в 180 п.н. і 190 п.н. було отримано при дослідженні локусу ВМ 1824.

Висновок. Таким чином, у результаті проведення досліджень було підбрано умови й отримано результати, які вказують на можливість застосування мікросателітних локусів у дослідженнях із визначення генотипу тварин великої рогатої худоби з перспективою в подальшому застосуванні їх для паспортизації вітчизняних порід.

1. Canon J., Alexandrino P., Beja-Pereira A. The use of microsatellites for measuring genetic diversity of European local beef cattle breeds for conservation purposes Proceedings of the 27th International conference on Animal Genetics. – 2000. – USA. – P. 30.

2. Mac Hugh D.E., Loftus R.T., Cunningham P. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellites markers // Anim. Genet. – 1998. – № 29. – P. 333–340.

3. Grzybowski G., Prusak B. Genetic integrity of the Polish Red cattle. – 2004. – № 1. – Polish Academy of Sciences Institute of Genetics and Animal Breeding, Poland. – P. 45–56.

4. Grzybowski G., Prusak B. Genetic variation in nine European cattle breeds as determined on the basis of microsatellite markers. II. Gene migration and genetic distance // Animal Science Papers and Reports. – 2004. – № 1. – P. 37–44.

5. Guo Li Zhou, Hai Guo Jin, Qi Zhu Genetic diversity analysis of five cattle breeds native to China using microsatellites // Journal of Genetics. – 2005. – V. 84, № 1. – P. 77–80.

6. Lubieniecka J., Grzybowski G., Lubieniecki K. Genetic variation in nine European cattle breeds as determined on the basis of microsatellite markers. I. Within-breed variation // Animal Science Papers and Reports. – 2001. – № 4. – P. 249–264.

7. Bicalho H.M.S., Pimenta C.G., Mendes I.K.P. Determination of ancestral proportions in synthetic bovine breeds using commonly employed microsatellite markers // Genetics and Molecular Research. – 2006. – V. 5, № 3. – P. 432–437.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА.

Н.Б. Мохначёва

Освещены результаты использования микросателлитных локусов при исследовании генотипа крупного рогатого скота.

ДНК-технологии, микросателлиты, генетические маркеры, полиморфный локус, ПЦР, амплификация, праймер

THE USE OF MICROSATELLITE MARKERS FOR GENOTYPING OF CATTLE. N. Mohnachova

The results of application of microsatellite markers are reflected in research of genotype of cattle.

DNA-technology, microsatellite, genetic markers, polymorphic locus, PCR, amplification, primer