

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ**

**ВИЗНАЧЕННЯ АДАПТАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ  
ПЛЕМІННИХ РЕСУРСІВ МОЛОЧНОЇ ХУДОБИ ТА  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ У СИСТЕМІ  
ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ**

**методичні рекомендації**

**Чубинське – 2020**

УДК 636.2.034:575.113:612.017:502.211

В 41

**Методичні рекомендації розробили:**

*К. В. Копилов*, доктор с.-г. наук, голов. наук. співробітник;  
*О. Д. Бірюкова*, кандидат с.-г. наук, завідувачка відділу;  
*А. В. Шельов*, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник;  
*М. Л. Добрянська*, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник;  
*Н. Б. Мохначова*, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник;  
*Н. М. Маковська*, науковий співробітник;  
*Л. Ф. Стародуб*, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник

Методичні рекомендації розглянуто і схвалено вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (протокол № 7 від 29.09.2020 року.)

**Визначення** адаптаційної здатності племінних ресурсів молочної худоби та молекулярно-генетичні методи у системі збереження біологічного різноманіття : методичні рекомендації / *К. В. Копилов, О. Д. Бірюкова, А. В. Шельов, М. Л. Добрянська, Н. Б. Мохначова, Н. М. Маковська, Л. Ф. Стародуб* ; за ред. *Б. Є. Подоби*. Чубинське, 2020. 36 с.

У методичних рекомендаціях висвітлені концептуальні засади та методологічні підходи, які можуть бути застосовані для виявлення генетичної специфічності та селекційних особливостей племінних ресурсів молочної худоби. Вони можуть бути ефективно використані у системі збереження біорізноманіття.

Рекомендації розраховані на спеціалістів тваринництва, науковців, викладачів і студентів вищих навчальних закладів аграрного профілю.

**Рецензенти:**

*Супрович Тетяна Михайлівна* – доктор с.-г. наук, професор, завідувачка кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби національної поліції України Подільського державного агротехнічного університету Міністерства освіти і науки України;

*Ковтун Світлана Іванівна* – доктор с.-г. наук, професор, перший заступник директора з наукової роботи Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН.

УДК 636.2.034:575.113:612.017:502.211

© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН, 2020 р.

## ЗМІСТ

ВСТУП ( <i>О. Д. Бірюкова, Б. Є. Подоба</i> ).....	4
1. ДОСЛІДЖЕННЯ АДАПТАЦІЙНОЇ СПЕЦИФІКИ ТВАРИН В СИСТЕМІ ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ ( <i>О. Д. Бірюкова, Н. М. Маковська</i> ).....	5
1.1. Теоретичні засади досліджень з адаптації.....	5
1.2. Оцінювання адаптаційної здатності великої рогатої худоби..	8
Перелік використаних джерел.....	17
2. ДОСЛІДЖЕННЯ АБОРИГЕННИХ ТА МАЛОЧИСЕЛЬНИХ ПОРІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ МАРКЕРАМИ ( <i>К. В. Копилов, А. В. Шельов, М. Л. Добрянська, Н. Б. Мохначова, Л. Ф. Стародуб</i> ).....	20
2.1. Виділення ДНК з біологічного матеріалу та проведення етапів полімеразної ланцюгової реакції.....	20
2.2. Визначення генотипу тварин за мікросателітними маркерами (STR-локусами).....	23
2.3. Визначення генотипу тварин за локусами кількісних ознак (QTL) методом ПЛР-ПДРФ.....	27
2.4. Цитогенетичний аналіз.....	33
Перелік використаних джерел.....	35

## ВСТУП

В результаті процесів, що відбуваються в складних системах взаємовідносин природи і людини, екологічні аспекти розвитку суспільства стали пріоритетними і спрямовані на захист природних ресурсів. Проблема охорони генофонду планети і процеси адаптації популяцій до мінливих умов навколишнього середовища стали провідними напрямками досліджень сучасної науки.

Схрещування місцевих популяцій худоби зі спеціалізованими молочними породами забезпечило підвищення її продуктивності, а застосування штучного осіменіння створило умови для програмованого широкомасштабного відтворення. Проведення інтенсивної селекції і породоутворення зменшили резерв генетичної мінливості племінних ресурсів, що не може не впливати на стратегічні перспективи селекційної роботи.

В даний час, надзвичайної актуальності набуває проблема збереження генофонду місцевих порід тварин, які за рівнем продуктивності не здатні конкурувати з високоспеціалізованими племінними ресурсами. В першу чергу, це стосується аборигенних високоадаптованих до місцевих умов розведення порід, що призводить до зрушення природної різноманітності і незворотньої втрати унікальних генів та генних комплексів, що притаманні породам. Найчастіше саме такі породи відзначаються кращою пристосованістю до несприятливих факторів зовнішнього середовища, мають міцну конституцію, підвищений рівень загальної резистентності, стабільно високу відтворювальну здатність та ряд інших цінних якостей, ефективно відтворення яких методами селекції неможливе або потребує значних витрат.

Комплексні дослідження адаптованості племінних ресурсів дають уявлення про генетичний матеріал необхідний для створення стад. Що найбільш пристосовані до нових технологій та умов відтворення. Визначення їх специфіки як на індивідуальному, так і на популяційному рівні за молекулярно-генетичними маркерами є одним із основних завдань проведення поглибленої оцінки біоматеріалу аборигенних та малочисельних порід. Поряд з цим про особливості племінного матеріалу дають додаткову інформацію інші біологічні тести, які можуть бути застосовані для виявлення генетичної специфічності та селекційних особливостей племінних ресурсів молочної худоби і ефективно використані у системі збереження біорізноманіття.

# 1. ДОСЛІДЖЕННЯ АДАПТАЦІЙНОЇ СПЕЦИФІКИ ТВАРИН В СИСТЕМІ ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ

## 1.1. Теоретичні засади досліджень з адаптації

В біологічному сенсі адаптація (лат. *Adaptation* – «пристосування») – морфологічна чи функціональна ознака організму, що забезпечує збереження гомеостазу в процесі пристосування до середовища існування. Адаптація тварини до певних умов середовища проявляється у морфологічних та функціональних змінах на різних рівнях організації організму, що проявляється у коливаннях імунологічних показників, неспецифічної резистентності організму, біохімічних, фізіологічних, гормональних, а також етологічних змінах. Особливу увагу привертає методологічний підхід до адаптації як генетичного механізму процесів розвитку і функціонування систем регулювання шляхом взаємодії прямого і зворотного зв'язку, які забезпечують циркуляцію інформації та її стабілізацію.

Інформація забезпечує організацію систем, їх впорядкованість на противагу ентропії (невпорядкованості інформації). З точки зору біорізноманіття дослідження племінних ресурсів молочної худоби спрямовуються на виявлення особливостей взаємодії природних та штучних генетичних процесів, дія яких пов'язана з адаптуванням до реалізації генетичної інформації певних конституціональних типів, класифікація яких передбачає врахування ієрархії залежно від типологічних підходів. В селекційному плані типізація полягає в розмежуванні реальної і конкретної ідеальної моделі об'єкту досліджень в процесі розвитку. Загальна теорія типів передбачає, що розрізняються об'єкти різних рівнів, зокрема, індивіди, породи, стада та ін. (тип 1), їх властивості (тип 2), властивості властивостей (тип 3). В генофондових стадах у локальних порід існують не лише особливості життєвого циклу тварин, що включають періоди росту та розвитку різних органів та систем та організму в цілому, а також ритми фізіолого-біохімічних процесів життєдіяльності. Адаптація організму до нових умов утримання може відбутися лише за умов успішної перебудови всього комплексу біологічних ритмів, які можуть бути преадаптовані чи не преадаптовані.

Доцільно розрізняти адаптованість – як характеристику племінного матеріалу. Зокрема, це стосується індекса адаптації, який дає уявлення про певні властивості, результат адаптування. Адаптування –

це процес, відповідь організму на зовнішні впливи. Таку інтерпретацію на індивідуальному рівні демонструють дослідження адаптації через фізіологічні, гематологічні, біохімічні тести.

При аналізі генофонду локальних порід особливу увагу приділяють не лише продуктивним якостям тварин, а й виявленню механізмів адаптації, які може забезпечувати не лише рекомбінаційна, а й мутаційна мінливість. Мутації, що сприяють адаптації та не позначаються негативно на життєздатності організму, мають бути закріплені в генофонді популяції, оскільки кожен генотип забезпечує свою норму реакції на умови середовища. Реалізація спадкової інформації в процесі онтогенезу, починаючи з мейозу і закінчуючи природною смертю організму, залежить від умов, що складаються на окремих етапах індивідуального розвитку, а розгортання генетичних програм відбувається при узгодженні з інформацією про вже реалізовану програму розвитку, яка, по суті, укладена у конкретному фенотипі особини. Таким чином, своєчасно не реалізована генетична інформація в подальшому вже не може бути прочитаною і, з точки зору селекції, все менше залишається можливостей оцінити всі закладені у генотипі потенції. Отже, в результаті оцінювання характеру реалізації спадкової інформації на ранніх стадіях розвитку особин можна скласти більш широке, хоч і менш конкретне уявлення про генотип. Це свідчить про перспективність дослідження особливостей саме ембріонального і раннього постембріонального періодів індивідуального розвитку для оцінки ступеня адаптованості організму тварини до умов утримання. Тому, актуальним завданням генетичних досліджень є пізнання загальних закономірностей процесів кількісних та якісних змін в онтогенезі. Це, в свою чергу, є основою для впровадження методів і прийомів, що дозволяють встановити ступінь адаптованості кожної особини за спрямованістю цих процесів та врахувати їх особливості на різних етапах розведення та селекції тварин.

Більшість селекційних ознак – це результат реалізації багатьох видів генетичної інформації в різні періоди розвитку тварини. В кінцевому результаті ми одержуємо фенотип, який лише приблизно відображає генотип, тобто характеризує лише один з можливих його проявів. Отже, і продуктивність як селекційна ознака – неточний, приблизний критерій племінних якостей тварини. Саме звідси постає завдання зменшити впливи зовнішнього середовища на результат оцінки генотипу тварини. Це може забезпечити оцінювання тварини в ранньому віці. Є необхідність доповнення існуючих нині традицій-

них методів добору та оцінки племінних тварин прийомами виявлення вже в якомога більш ранньому віці їх адаптаційних можливостей.

Більшість мутаційних змін елімінуються природним і штучним добром, до них належать, в першу чергу ті, що викликають спадкові хвороби. Але треба враховувати те, що не всі мутації одразу виявляються і створюють мобілізаційний ресурс мінливості за І. І. Шмальгаузенем (1968), який існує у вигляді множинних алелів, які можуть виявлятися як фактори адаптації при зміні умов годівлі, утримання, експлуатації тварин. Саме різноманітність генів забезпечує множинність ознак організму, його адаптаційну спроможність, коли поліморфна ознака реально сприяє кращій адаптації тварини.

Позитивна роль мутацій, що відбуваються в період раннього розвитку пов'язана з механізмами формування імунітету. Синтез важких ланцюгів імуноглобулінів контролюється трьома типами генних сегментів для V-доменів: V, D і J та десятьма сегментами для C-області відповідних імуноглобулінів. Всього відомо близько 500 V-генних сегментів, 15 D-сегментів і чотири J-сегмента. Контроль синтезу легких ланцюгів залежить від роботи 250 V-генів, чорирьох J-генних сегментів і C-гена для константної частини поліпептида. Вивчення хромосомної організації імуноглобулінових генів та етапів їх реорганізації в процесі розвитку B-клітин дозволило достатньо точно встановити першопричину варіабельності імуноглобулінів. Її основу створює випадкове об'єднання окремих генних сегментів в результаті рекомбінації: V, D, J – для важких ланцюгів та V, J – для легких ланцюгів. Крім перегрупування на певному етапі утворення лімфоцитів в V генах виникають мутації шляхом випадкових заміन нуклеотидів. Гіпермутагенез, процес виникнення точкових мутацій, запланований і відбувається під час імуногенеза в лімфоїдних фолікулах периферійних лімфоїдних органів та тканин. Це суттєво підвищує різноманітність імуноглобулінів, яка обумовлюється мільонами специфічностей – загальне число варіантів антигензв'язуючих центрів (відповідно, специфічних імуноглобулінів) складає  $2.4 \cdot 10^8$  (В. Г. Галактионов, 2004). Отже, кожен організм під час індивідуального розвитку виробляє свій адаптаційний набір генів імуноглобулінів. Імуноглобуліни, що залишилися не запитуваними в особини певного виду протягом її життя, можуть бути необхідні іншій особині даної популяції або особинам інших генерацій.

В цілому рівень специфічності імуноглобулінів, що є у вищих хребетних тварин, створює необхідний запас міцності виду. Не ви-

ключено, що такі зміни відбуваються з іншими генами в ранньому онтогенезі. Для життєдіяльності виду, його стабільності не настільки важливо, проявляється чи ні певна ознака у конкретної особини, проте істотним є наявність генів, що детермінують дану ознаку, якщо вона є адаптивною.

## 1.2. Оцінювання адаптаційної здатності великої рогатої худоби

Оцінювання адаптації найчастіше здійснюється за матеріалами первинного зоотехнічного обліку, що переважно характеризують племінні ресурси в постморфогенетичний період онтогенезу. В цей період, переважно, оцінюють адаптованість організму тварин до умов утримання та технологічного навантаження. Ознакою адаптованості тварини є тривалість її продуктивного життя, відтворювальна здатність, стабільність продуктивності (коефіцієнт сталості лактації).

Визначення адаптації дорослої тварини проводять за показниками продуктивності та відтворювальної здатності. Відтворювальну здатність корів оцінюють за віком першого плідного осіменіння та першого отелення, тривалістю тільності, сервіс-, міжотельного та сухостійного періодів за загальноприйнятими методиками; вираховують коефіцієнт відтворювальної здатності (КВЗ) (Д. Т. Винничук *и др.*, 1991). Для корів використовують індекс адаптації (І) (Й. З. Сірацький *та ін.*, 1992), математичний вираз якого поєднує показники відтворення та продуктивності, що є основними проявами життєдіяльності тварини.

Ступінь адаптованості організму тварини до технологічного стресу можна оцінювати шляхом дослідження характеру лактаційної діяльності залежно від типу вищої нервової діяльності і стресостійкості корів. Метод ґрунтується на виявленні ступеня прояву рефлексу молоковіддачі у відповідь на доїння «чужою дояркою» (Э. П. Кокорина *и др.*, 1978). Висока і стійка лактаційна крива відображає адаптивну здатність корови тривалий час витримувати фізіологічні навантаження, пов'язані з виробництвом молока. Для оцінювання лактаційної діяльності корів застосовують індекси: Х. Тернера (1926) – співвідношення надою за всю лактацію до максимального надою за місяць; В. Б. Веселовського (1930) – фактичний надій за лактацію виражають у відсотках до максимально можливого (добуток максимального удою та кількості діб лактації); індекс спадання лактації Д. В. Єлпатьєвського (1932) – середнє від суми щомісячних від-



носних приростів надою; І. Іоаганссона, А. Ханссона (1940) – процентне відношення удою за другі 100 діб лактації до удою за перші 100 діб; індекс сталості лактації (Д. Т. Вінничук, Л. А. Олейник, 1997) враховує величину надою за лактацію (К):

$$ІСЛ = \frac{\text{Надій за лактацію, кг}}{(\text{Вищий місячний надій} - \text{середній місячний надій}) \times 10} \times K$$

Адаптованість тварин до технологічних умов утримання та годівлі протягом періоду господарського використання можна оцінити за показниками позитивної продуктивності (вихід продукції та приплоду). Тривалість продуктивного використання корів визначають за кількістю отриманих від них лактацій. Коефіцієнт господарського використання (КГВ) представляє (%) відношення тривалості періоду господарського використання корови до тривалості життя (М. С. Пелехатий та ін., 1999).

Ступінь адаптації організму бугаїв до промислового навантаження визначають за кількістю та якістю спермопродукції, яку від них одержують. За часткою вибракування сперми можна визначити тип стресостійкості бугаїв (В. І. Барабаш та ін, 2005). Для оцінювання адаптаційної здатності у ремонтних бугайців та бугаїв-плідників розроблено індекс (ІТСі) (О. М. Черненко, 2016), що враховує концентрацію кортизолу і тестостерону та вміст аланін- й аспартатамінотрансферази та креатинфосфаткінази, і представляє суму відсотків їх максимальних зрушень, що виникають під впливом навантажуючих чинників. Порівняння індивідуальних індексів з індексом, визначеним за діапазоном показників референтної норми (ІТСРН), забезпечує розподіл тварин на два типи: за  $ІТСі \leq ІТСРН$  – високостресостійкі, за  $ІТС > ІТС$  – низькостресостійкі.

Для характеристики лінійного росту, екстер'єру та загального розвитку тварин використовують матеріали зоотехнічного обліку. За допомогою мірних стрічки, циркуля і палиці беруть наступні проміри та обраховують індекси екстер'єру, які можуть вказувати на конституціональний тип. Існує певна взаємообумовленість типу конституції, рівня неспецифічної резистентності (в тому числі, стійкості до хвороб та стресорів).

Перше завдання оцінки особини це визначення особливості її розвитку в ембріональний період за комплексом показників, основним з яких є жива маса при народженні і тривалість ембріонального періоду. Враховують середньодобові прирости в процесі вирощу-

вання (0–18 міс.), обчислюють відносну швидкість росту (К) (С. Броді, 1945). Певне уявлення про адаптаційні особливості організму дає оцінка тварин за постнатальною швидкістю росту з врахуванням особливостей їх внутріутробного розвитку. Для такої оцінки визначають оціночну швидкість росту (А) (А. П. Свиридов, 1986). Цей показник виступає критерієм зоотехнічної оцінки племінних тварин в ранньому віці. А для генофондових стад дозволяє визначити особин, що проявляють більшу адаптованість.

Ознакою специфіки пренатального розвитку є жива маса новонароджених. Її враховували поряд з десятиденним періодом випробування в селекції майнівських швіців. Тут особлива увага надавалась адаптації новонароджених (Г. Ф. Подоба, 1943). Перші десять днів з проміжним контролем в п'ятиденному віці відводяться для випробувальної годівлі, в результаті якої виявляють індивідуальну енергію росту телят. Цього часу достатньо, щоб розділити телят на групи швидкоростучих, середньо- та повільно ростучих та встановити кормовий раціон для самців та самок кожної групи. Основний принцип селекційного вирощування молодняка – форсувати проходження стадій розвитку, орієнтуючись на стислі строки швидкоростучих. Саме в морфогенетичний період створюються умови типізації молодняка в ранньому віці.

Після народження теляти крім екстер'єрної оцінки враховують етологічні характеристики (И. В. Гусев, 1996), за якими визначають інтегральний оціночний індекс життєздатності (ІЖ). Цей комплексний показник складається з п'ятьох послідовних оцінок (кожна має градацію прояву в 10 балів): терміну підняття голови, часу до першої спроби звестися на ноги, адаптування до умов гравітації, реакція на екзогенні подразники оточуючого середовища, прояву рефлексу смоктання.

Більшість показників природної резистентності характеризує загальні конституційні особливості тварин, чим обумовлюються їх взаємозв'язки з продуктивністю та адаптаційною здатністю. Отже, оцінка пов'язана з реалізацією молочної фази розвитку молодняка, ґрунтується на врахуванні загальноклінічних, морфологічних та екстер'єрно-конституційних критеріїв. Їх визначення в ранньому віці дає можливість скласти уявлення про генотипові особливості тварин і здійснити попередній відбір адаптованих особин.

Природну резистентність тварин оцінюють за комплексом клітинних та гуморальних факторів. Для об'єктивної оцінки фагоцитозу

враховують активність нейтрофілів крові (ФА), інтенсивність фагоцитозу (ІФ), фагоцитарне число (В. Е. Чумаченко *и др.*, 1990); бактерицидну активність сироватки крові (БАСК) визначають фотонелометричним кюветним методом (О. В. Смирнова, Т. А. Кузьмина, 1966), лізоцимну (ЛАСК) – нефелометричним методом (В. Г. Дорофейчук, 1968). Визначають вміст в сироватці крові загального білка, альбумінів, глобулінів, білкових фракцій за І. П. Кондрахіним (1985), загальної кількості імуноглобулінів, концентрацію гемоглобіну, вміст еритроцитів, лейкоцитів, ШОЕ, гематокрит, в'язкість, основні індекси еритроцитів за загальноприйнятими в лабораторній практиці методами (І. П. Кондрахин *и др.*, 2004).

Інтер'єрні характеристики дають можливість здійснити інтегральну оцінку природної резистентності за модульним принципом. Комплексну оцінку природної резистентності піддослідних корів здійснюють згідно шкали В. Є. Чумаченка та ін. (В. Е. Чумаченко *и др.*, 1990) за морфологічними й біохімічними показниками крові та показниками природної резистентності. За кожен з 20-ти наявних в цій шкалі тестів, було надано оцінку від 1 до 5 балів. Загальний показник резистентності складеться з суми балів ознак. Нормальний рівень – 50–80 балів, нижче норми – 31–49 балів, низький рівень резистентності – 19–30 балів.

Дослідження генофонду локальних порід охоплює не лише продуктивні якості тварин, а і їх адаптаційний потенціал, який пов'язаний з рекомбінаційною і мутаційною мінливістю. Рациональне використання і збереження генофонду сільськогосподарських тварин забезпечується застосуванням широкого спектру генетичних методів для оцінювання генетичних ресурсів на індивідуальному та популяційному рівнях (рис.).

Ці дослідження спрямовуються на визначення адаптаційного потенціалу порід, типів і окремих популяцій сільськогосподарських тварин за результатами оцінки резистентності, конституціональних особливостей тварин за генетичними тестами на популяційному та індивідуальному рівнях.

Додаткові тести для поглибленого визначення адаптаційних особливостей тварин: гематологічні дослідження, біохімічні показники, рівень специфічних гормонів; тести на чутливість організму до стресу; визначення неспецифічної резистентності; цитобіофізичний метод визначення адаптованості організму, різні генетичні підходи (імуно-, цито-, молекулярно-).



### **Етапи генетичного моніторингу біорізноманіття та адаптаційної здатності сільськогосподарських тварин**

Визначення еритроцитарних антигенів, алелофонда та контроль походження великої рогатої худоби здійснюють за загальноприйнятою методикою (Б. Е. Подоба, 1980). Для оцінювання адаптаційної здатності визначають селективну цінність маркерів на хромосомному рівні (групи крові, мікросателіти), пов'язаних з конкретним спадковим матеріалом. Суттєвим методичним підходом при цьому є ідентифікація алелів за їхнім походженням через вивчення родоводів тварин. Узагальнюючим критерієм оцінки селективної цінності того чи іншого алеля є його частота в популяції, що аналізується. Конституціональні особливості тварин з альтернативними алелями розглядаються з точки зору адаптаційних процесів з урахуванням ознак тривалості продуктивного життя, відтворення, по життєвої продуктивності.

Головний момент аналізу генетичних процесів за маркерами – визначення ролі штучного і природного добору, а один з конструктивних методичних підходів дослідження процесів природного добору ґрунтується на спостереженні за розподілом маркерних алелів в потомстві плідників. Переважне успадкування одного з алелів

пов'язують з презиготичним добором, який зумовлений різним ступенем поєднуваності гамет батьків. Крім презиготичного добору до механізмів відхилення від теоретично очікуваного розподілу батьківських алелів у потомстві найчастіше відносять перевагу над гомозиготами. До таких механізмів відносять також мейотичний добір при сперматогенезі, вплив матері на життєздатність зигот, утворення генних комплексів, що зберігаються завдяки блокуванню кросинговеру (Б. Є. Подоба та ін., 2015).

Доцільно використовувати результати селекційного-ветеринарного моніторингу в стадах для виявлення резистентних особин, що адаптовані до впливу патогенних чинників та технологічних навантажень.

Теорія про стрес, яка розроблена Г. Сельє (1936), визначає його як неспецифічну захисну, адаптаційну нейро-гуморальну реакцію організму у відповідь на вплив сильних подразників, що загрожують гомеостазу організму.

За ступенем прояву адаптаційно-захисної реакції організму на неспецифічні зовнішні подразники (стресори) визначають стресчутливість або стресостійкість тварини. Отже, стрес має загальнобіологічний адаптаційний сенс. Стресори для сільськогосподарських тварин – екстремальні температури, недоотримання їжі або води, токсичні впливи, патогенні мікроорганізми, неналежний догляд та утримання, пригнічення в ієрархії стада, транспортний стрес та ін.

Процес адаптації до стресових впливів супроводжується гормональними, біохімічними, метаболічними, етологічними змінами, що спрямовані на утримання гомеостазу організму. Система крові є однією з основних гомеостатичних систем організму та відіграє надважливу роль у формуванні адекватних компенсаторно-приспосувальних реакцій організму за дії стресорів (Semenza G. L., 2009). Гематологічні показники є відображенням загального адаптаційного статусу організму. Зокрема, лейкоцитарна формула використовується для оцінювання неспецифічної реакції адаптації, оскільки є інтегральним показником балансу всіх гомеостатичних систем організму. Індекс напруженості адаптації (ІНА) (Л. Х. Гаркаві та др., 1990) відображає відношення кількості лімфоцитів до кількості сегментоядерних нейтрофілів в лейкоцитарній формулі. За теорією Л. Х. Гаркаві існує декілька п'ять типів адаптаційних реакцій організму в залежності від ступеня відхилення співвідношення від нормального для даного виду тварин діапазону значень. Співвідношення в лейкограмі лімфоцитів

та сегментоядерних нейтрофілів дозволяє діагностувати адаптаційні реакції різного рівня (Ч. Авылов, 2000). Індекс імунореактивності (ІР) (Д. О. Иванов и др., 2002), що відбиває відношення відносного вмісту лімфоцитів та еозинофілів в крові до кількості моноцитів, що відображає баланс лімфокінів та монокінів.

Маркерами стресового стану у великої рогатої худоби може бути рівень кортикостероїдів, глюкози, натрію в крові (В. М. Головач та ін., 1990). Відомо, що при розвитку стрес-реакції відбувається активація глюкокортикоїдної системи, викид в кров'яне русло гормонів, що призводить до зниження чисельності еозинофілів.

**Визначення стресчутливості за еозинофільним тестом.** Еозинофільний тест побудований на тому явищі, що стресовий вплив на тварину відображається на кількості еозинофільних клітин у крові. Для постановки цього тесту використовують гепаринізовану кров (И. С. Пираллишвили, 1962; Е. А. Юрьев и др., 2007). Отримані проби крові обробляють розчином, що викликає лізис всіх форм лейкоцитів окрім еозинофілів. Склад основного розчину: еозин калію – 0,5 г, формалін 40% – 1,5 мл, дистильована вода – 100 мл.

Еозин калію розчиняють у воді та додають формалін. Основний розчин зберігають у темному посуді в холодильнику протягом 6 місяців. Для приготування робочого розчину 2 об'ємні частини основного розчину змішують з 2 частинами хімічно чистого ацетону, потім розводять з 6-ма об'ємними частинами дистильованої води. Робочий розчин зберігають протягом двох тижнів.

Хід визначення. У чисті сухі пробірки наливають по 0,4 мл робочого розчину, вносять по 0,02 мл досліджуваної крові та ретельно перемішують протягом 30–60 с. Підрахунок кількості еозинофілів проводять у рахунковій камері Горяєва при збільшенні у 150–200 разів. Розрахунок кількості еозинофілів проводять за формулою:  $X = 21 * a / F$ , де  $X$  – кількість еозинофілів у  $1 \text{ мм}^3$  досліджуваної крові;  $a$  – кількість еозинофілів, по всій сітці камери Горяєва;  $F$  – об'єм рахункової камери; 21 – ступінь розведення досліджуваної крові робочим розчином.

При оцінці окремих особин до стрес-стійких відносять тих, що мають вміст еозинофільних клітин вищий за середній, а до стресчутливих – нижче за середні показники по конкретному стаду або групі досліджуваних тварин. Саме на фіксації різкого зниження еозинофільних гранулоцитів в крові ґрунтується тест Торна (М. Ковальчикова, К. Ковальчик, 1978), в якому застосовують

ін'єкцію адреналокоритикотропного гормону для стимуляції функції наднирників.

**Оцінювання загальної імунологічної реактивності організму.** Тестом імунологічної реактивності є величина реакції на ін'єкцію гістаміну у складку шкіри (гістамінова проба) (Б. Е. Подоба *и др.*, 1988). За силою відгуку на ін'єкцію – потовщення шкірної складки, швидкість розсмоктування набряку складають уявлення про імунореактивність тварини.

Методика постановки:

- вистригти шерсть на ший тварини;
- виміряти товщину шкірної складки штангенциркулем;
- ввести 0,1 мл розчину гістаміну (розведення 1:1000);
- виміряти товщину шкірної складки через 60 хв. після ін'єкції;
- розраховують абсолютну реактивність та відносну реактивність:

$$Pa = Ti - Tn$$

$$Pv = \frac{Pa}{Tn} \times 100\% ,$$

де  $Tn$  – товщина шкірної складки до ін'єкції гістаміну;

$Ti$  – товщина шкірної складки після ін'єкції гістаміну.

**Цитобіофізичний метод визначення адаптованості.** На кафедрі генетики і цитології Харківського національного університету (В. Г. Шахбазов *и др.*, 1994, 1996) створений експрес-метод визначення біологічного віку та здоров'я людини за змінами показника електрорітмічного потенціалу клітинних ядер нативних епітеліальних клітин. Застосовується метод виявлення ступеня електронегативності ядер (ЕНЯ, %) як об'єктивний показник функціонального стану організму при запуску механізмів адаптації до певних чинників. Визначення енергетичного стану та біологічного віку організму на клітинному рівні є актуальним не лише в медицині, а й у тваринництві, зокрема при селекції та розведенні генетично цінних тварин. Цитобіофізичний тест адаптовано для сільськогосподарських тварин (О. А. Шаламова *и др.*, 2001; О. Д. Бірюкова, Н. М. Маковська, 2011).

Методика проведення:

Для аналізу найбільш придатними є епітеліальні клітини, зокрема клітини букального епітелію. Для аналізу необхідно: прилад для внутрішньоклітинного мікроелектрофорезу «Біотест», «Біотест-1», «Біотест-М» (Харків), мікроскоп типу МБІ-4, тупі шпателя для відбору проб клітин; покривні скельця (20×20 мм); фільтрувальній папір;

шприц; пінцет; фосфатний буфер (рН 7,0) або відстояна водопровідна вода.

Пробу букального епітелію з внутрішньої сторони щоки (верхній шар) розчиняють краплею фосфатного буфера, розміщують між двома покривними скельцями. Залишки розчину необхідно зібрати фільтрувальним папером. Потім пробу розміщують в камері для мікроелектрофорезу та забезпечують провідність електричного струму стрічками фільтрувального паперу, що змочені буфером.

Камеру встановлюють під об'єктивом мікроскопу (x200, x400), спостерігають за переміщенням ядер нативних клітин. Зсув ядра в бік аноду свідчить про те, що воно має негативний електричний заряд.

Електрофорез проводять в режимі, який забезпечує клітинам досить довгу життєздатність (напруга 15 В на см, сила току 100 мкА). На винесеній панелі приладу підраховують клітини з активними та пасивними ядрами. Після підрахунку 100 клітин прилад подає звуковий сигнал та висвічує показник – відсоток електронегативних ядер (ЕНЯ%) в пробі.

Поглиблений аналіз і оцінювання племінних ресурсів молочної худоби в генофондових стадах доцільно здійснювати за комплексом генетичних, селекційних, фізіологічних тестів для встановлення специфіки адаптованих до конкретних умов тварин; генетичний моніторинг здійснювати на хромосомному рівні за групами крові та мікросателітами для контролю походження та мікроеволюційних процесів, на рівні генному – за генами, що асоційовані з господарськи корисними ознаками для добору бажаних генотипів та отримання генофондової продукції. Основним завданням збереження біологічного різноманіття в тваринництві України є виявлення і збереження специфічних генних комплексів, що визначають адаптованість генетичних ресурсів.

Таким чином, висвітлені стратегічні підходи до вивчення адаптивних систем, що зформувалися у генофондових стадах. Виявлення механізмів формування цієї адаптації може стати основою для розробки адаптивних технологій, що можуть бути застосовані до певного виду чи породи сільськогосподарських тварин.



## ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Авылов Ч. Стресс-факторы и резистентность животных. *Животноводство России*. 2000. № 11. С. 20–21.
2. Спосіб визначення стресу та стресостійкості у бугаїв-плідників : пат. 10208 Україна, А01 К67/02 ; опубл. 15.01.2005, Бюл. 11.
3. Бірюкова О. Д., Маковська Н. М. Визначення резистентності молодняку сільськогосподарських тварин. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького*. 2011. Т. 13, № 4 (50), ч. 3. С. 39–44.
4. Винничук Д. Т., Сирацкий И. З., Шаран П. И., Данилків Я. Н., Омеляненко А. А., Козырь В. С. Оценка создаваемых типов и пород крупного рогатого скота на Украине. Киев : УкрНИИТИ, 1991. 188 с.
5. Галактионов В. Г. Происхождение специфических иммуноглобулинов. *Природа*. 2004. № 7. С. 1–10.
6. Гаркави Л. Х. Активационная терапия. Антистрессорные реакции активации и тренировки и их использование для оздоровления, профилактики и лечения. Ростов-на-Дону : РГУ, 2006. 256 с.
7. Головач В. М., Снітинський В. В., Стояновський В. Г. Стреси сільськогосподарських тварин і птиці. Київ : Урожай, 1990. 41 с.
8. Горизонтов П. Д. Стресс и система крови. Москва : Медицина, 1983. 240 с.
9. Гузев И. В. Селекционно-генетическая оценка и раннее прогнозирование естественной резистентности молочного скота : дис. ... канд. с.-х. наук : 06.00.15. Киев, 1996. 136 с.
10. Дорофейчук В. Г. Определение лизоцимной активности сыворотки крови нефелометрическим методом. *Лабораторное дело*. 1968. № 1. С. 28–31.
11. Зубець М. В., Буркат В. П., Єфіменко М. Я., Подоба Б. Є., Коновалов В. С., Антоненко В. І., Гавриленко М. С., Гузев І. В., Дзіцюк В. В., Кругляк А. П., Чернякова Н. Є., Демчук М. П., Пахалюк В. С., Стоянов Р. О., Заблудовський Є. Є. Генетико-селекційний моніторинг у молочному скотарстві / за наук. ред. В. П. Бурката. Київ : Аграрна наука, 1999. 88 с.
12. Иванов Д. О., Шабалов Н. П., Шабалова Н. Н. Лейкоцитарные индексы клеточной реактивности как показатель наличия гипо- и гиперэргического вариантов неонатального сепсиса. *Опыт лечения детей в многопрофильной детской больнице*. СПб, 2002. С. 22–28.
13. Ковалева А. И., Пышнов Ю. Г. Электроотрицательность клеток как критерий оценки функционального состояния организма оператора. *Український медичний часопис*. 2003. № 6 (38). С. 126–129.
14. Ковальчикова М., Ковальчик К. Адаптация и стресс при содержании и разведении сельскохозяйственных животных / пер. со словацкого Г. Н. Мирошниченко. Москва : Колос, 1978. 271 с.
15. Кокорина Э. П., Туманова Э. Б., Филлипова Л. А., Задальский С. В. Метод оценки стрессоустойчивости коров. *Бюллетень Всесоюзного научно-*

исследовательского института разведения и генетики с.-х. животных. СПб., 1978. С. 12–20.

16. Кондрахин И. П., Архипов А. В., Левченко В. И., Фролова Л. А., Таланов Г. А. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики : справочник / под ред. И. П. Кондрахина. Москва : Колос, 2004. 520 с.

17. Макаров В. М. Совершенствование методов оценки характера лактационной деятельности молочного скота. *Научно-технический бюллетень* / Ин-т животноводства. Харьков, 1995. Вып. 70. С. 3–10.

18. Подоба Б. Є., Бірюкова О. Д., Бодряшова К. В., Маковська Н. М. Рекомендації з оцінки гетерозиготності, адаптаційної здатності та регулювання генетичної структури генофондових популяцій. Чубинське, 2015. 20 с.

19. Пелехатий М. С., Шипота Н. М., Волківська З. О., Федоренко Т. В. Відтворювальна здатність чорно-рябих корів різного походження і генотипів в умовах українського Полісся. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 1999. Вип. 31–32. С. 180–182.

20. Подоба Г. Ф. Селекционные методы выращивания молодняка крупного рогатого скота (из опыта и практики индивидуального выращивания). Чернігів, 1943. – Рукопис.

21. Подоба Б. Е., Качура В. С., Леонтьева З. Л., Гузев И. В., Свиридов А. П., Дидык М. В., Яган В. Ф. Методические рекомендации по организации генетической экспертизы крупного рогатого скота в хозяйствах Киевской области. Киев, 1988. 33 с.

22. Пиралишвили И. С. К методике подсчета эозинофилов в периферической крови. *Лабораторное дело*. 1962. № 2. С. 20–23.

23. Подоба Б. Е. Методические рекомендации по использованию генетических маркеров при изучении генофонда локальных пород крупного рогатого скота. *Методические рекомендации по селекции и воспроизводству крупного рогатого скота*. Киев, 1980. С. 77–89.

24. Ройт А., Бростофф Дж, Мейл Д. Иммунология / пер. с англ. В. И. Кандрора и др. Москва : Мир, 2000. 592 с.

25. Сірацький Й. З., Данилків Я. Н., Пахолок А. А., Климович Н. А., Данилків Е. І. Господарська оцінка молочних корів. Київ : Урожай, 1992. 191 с.

26. Сірацький Й. З., Данилків Я. Н., Данилків О. М., Федорович Є. І., Меркушин В. В., Мельник Ю. Ф., Чуприна О. П., Кадиш В. О., Любинський О. І. Екстер'єр молочних корів: перспективи оцінки і селекції : монографія / за ред. Й. З. Сірацького, Є. І. Федорович. Київ : Науковий світ, 2001. 146 с.

27. Сіренко С. П., Григор'єва Н. М., Шахбазов В. Г. Зміни електрокінетичних властивостей ядер клітин букального епітелію людини під впливом електромагнітних хвиль лінійної та кругової поляризації. *III з'їзд Українського біофізичного товариства* : тези доповідей. Львів, 2002. С. 263.

28. Смирнова О. В., Кузьмина Т. А. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейлометрии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1966. № 4. С. 20–22.

29. Чумаченко В. Е., Высоцкий А. М., Сердюк Н. А., Чумаченко В. В. Определение естественной резистентности и обмена веществ у сельскохозяйственных животных. Киев : Урожай, 1990. 136 с.

30. Шаламова О. А., Литвин В. М., Бойко Е. А., Шахбазов В. Г. Изменение эмбриональной терморезистентности тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. после обработки гены электромагнитными полями сверхвысокочастотного диапазона длин волн. *Фотобиология и фотомедицина*. 2001. № 1–2. С. 36–39.

31. Шахбазов В. Г., Григор'єва Н. М., Колупаева Т. В. Новый цитобиофизический показатель биологического возраста и физиологического состояния человека. *Физиология человека*. 1996. № 6 (22). С. 71–75.

32. Способ определения функционального состояния человека : пат. 2009494С1 РФ. № 4953957/14 ; заявл. 10.06.1991 ; опубл. 15.03.1994, Бюл. № 5.

33. Шкорбатов Ю. Г. Структурні та електрокінетичні властивості ядер клітин букального епітелію людини у зв'язку з дією фізико-хімічних факторів та зміною функціонального стану організму : дис. ... д-ра біол. наук : 03.00.11. Харків, 2004. 349 с.

34. Шмальгаузен И. И. Факторы эволюции (теория стабилизирующего отбора). Москва : Наука, 1968. 458 с.

35. Юшков Б. Г. Система крови и адаптация организма к экстремальным воздействиям. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2006. № 3. С. 3–5.

36. Юрьев Е. А., Кортиков А. В., Чуякова Н. В. Стресс сельскохозяйственных животных. *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. 2007. № 2. С. 3–8.

37. Semenza G. L. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood*. 2009. Vol. 114, № 10. P. 2015–2019.

## 2. ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ АБОРИГЕННИХ ТА МАЛОЧИСЕЛЬНИХ ПОРІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ ДНК-МАРКЕРАМИ

### 2.1. Виділення ДНК з біологічного матеріалу та проведення етапів полімеразної ланцюгової реакції

Для молекулярно-генетичних досліджень придатним є різноманітний біологічний матеріал: кров, біоптати, волосся (шерсть), ембріони, молоко, ооцити, а також нативна, охолоджена та кріоконсервована сперма та інші тканини.

Забір *крові* проводиться з яремної вени одноразовим шприцем об'ємом 5–10 мл або вакуумними системами типу *Venoject*, *Vacutainer* і т. ін. (з ЕДТА або цитратом натрія). При заборі в шприц, кров переноситься в одноразові пробірки з антикоагулянтом (3% розчин ЕДТА (трилон Б) із розрахунку 10:1 або 3,8% розчином цитрата Na у співвідношенні 1:9). *Гепарин як антикоагулянт – не використовувати!*

Пробірку з кров'ю необхідно зберігати у холодильнику при температурі ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) до 5 годин. При неможливості швидкої доставки матеріалу для тривалого зберігання кров заморожують при ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Наступне транспортування здійснюється в замороженому стані.

*Сперма* відбирається в одноразові стерильні пробірки або паєти. Сперму для виділення ДНК можна використовувати як нативну, так і заморожену. Транспортування та зберігання аналогічне з вимогами зберігання крові.

*Відбір біоптатів.* Біоптати можуть мати різне походження. Для ДНК-аналізу можна використовувати вищипи з вуха, які залишаються при міченні тварин. Термін зберігання шматочків розміром від 5x5 мм при температурі  $4^{\circ}\text{C}$  – 3–4 доби, у замороженому стані ( $-20^{\circ}\text{C}$  і нижче) – необмежений.

Під час відбору кожену пробу маркують індивідуальним номером. Складають акт про відбір проб у довільній формі, в якому вказують повну назву підприємства/власника, де зроблено відбір біоматеріалу, час відбору, його вид, записують номери тварин та відповідні номери проб.

*Виділення ДНК проводять за декількома методиками в залежності від мети дослідження.* За умови, якщо метою дослідження є скринінговий експрес-аналіз певної групи тварин на наявність генетичних

аномалій чи особливостей, ДНК виділяють експрес-методом у невеликій кількості, термін зберігання такої проби – 1–2 доби.

З метою зберігання проби тривалий час і використання для ряду аналізів – ДНК виділяють відповідним методом. Такий ДНК-зразок може зберігатися декілька років.

*Методи виділення ДНК:*

*Експрес-метод виділення ДНК з різних тканин за допомогою реагента "Chelex-100".*

*Виділення ДНК із крові:* до 2–500 мкл крові або гомогенізованих тромбів додають 1000 мкл стерильної дистильованої води та перемішують на мікрозмішувачі типу «Vortex»; суміш інкубують протягом 15–30 хв. за кімнатної температури, періодично перемішують шляхом струшування; центрифугують протягом 1 хв. при 6000 об/хв.; обережно видаляють надосадову рідину, залишають 20–30 мкл рідини над осадом додають 170–180 мкл 5%-ного стерильного водяного розчину «Chelex-100»; інкубують протягом 15–30 хв. за температури 56°C; ретельно перемішують шляхом струшування та витримують 8 хв. на водяній бані за температури 100°C; ретельно перемішують шляхом струшування; центрифугують протягом 5 хв. при 6 000 об/хв.

Для ампліфікації використовують 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК. Зразки зберігають при температурі -20°C. Після кожного розморожування зразки перемішують та центрифугують протягом 5 хв. при 6000 об/хв.

*Виділення ДНК із сперми:*

до 3 мкл нативної сперми додають 200 мкл 5% стерильного водного розчину, «Chelex-100»; до суміші додають 2 мкл протеїнази К концентрацією 10 мг/мл та 7 мкл дітіотрейтолу; обережно перемішують шляхом струшування та інкубують зразки 30–60 хв. за температури 56°C; перемішують вміст пробірок на мікрозмішувачі та інкубують 8 хв. при температурі 100°C; перемішують на мікрозмішувачі та центрифугують 2–5 хв. при 8000–10000 об/хв.

Зразки зберігають за температури -20°C. Для ампліфікації використовують 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК.

Концентрацію та ступінь очищення ДНК визначають спектрофотометрично (спектрофотометр СФ-46) при довжині хвилі 260 та 280 нанометрів. Нативність ДНК визначають шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі за умови відсутності "шлейфу" фрагментів ДНК та інтенсивності флуоресценції бромистого етидію при ультрафіолетовому опромінюванні електрофореграм.

*Метод виділення ДНК за Соколовим-Джемелінським (для проведення ряду аналізів і тривалого зберігання препаратів ДНК):* 5 мл крові, що містить антикоагулянт, змішують з 30 мл холодного (4°C) буферу для лізису клітин (0,32 М сахарози, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1% Трилон X-100, 0,01Мтрис-НСl/рН 7,6) і витримують при температурі 4°C протягом 30 хв.; ядра клітин осаджують шляхом центрифугування при 4000 об/хв. Термін осаджування 30 хв. при температурі 4°C; осад ресуспендують у розчині, що містить 1,5 мл солі ЕДТА (75 мМ NaCl, 25 мМ ЕДТА /рН 8,0/), 200 мкл 10% SDS, 25 мкл (10 мг/мл) протеїнази К, та інкубують протягом 16 годин при температурі 37°C; до одержаного лізату додають 0,75 мл 5М ацетату калію (рН 4,8), обережно перемішують, витримують 30 хв. при температурі 4°C та центрифугують (40 хв., 5000 об/хв., 4°C); до супернатанту додають два об'єми холодного (4°C) 96% етанолу та вимотують ДНК на скляну паличку; підсушують за кімнатної температури, ДНК двічі промивають 70% етанолом та розчиняють у 0,5 мл буферу ТЕ (10 мМ Тріс-НСl /рН 7,4/), 1 мМ ЕДТА (рН 8,0) або 0,5 мл деіонізованої води. Проби ДНК зберігають при температурі -20°C.

*Виділення ДНК фенол – хлороформним методом.* До прозорого лізату додають 1 об. (400 мкл) суміші (25 об. фенолу, еквілібрований з буфером ТЕ, рН = 7,5–8,0; 24 об. хлороформу; 1 об. ізоамілового спирту) і після інтенсивного струшування (біля 3 хв.) центрифугують при 14000 об/хв. протягом 10 хв. При цьому протеїни і жири, які присутні у розчині, переходять у нижню фенольну фазу, а ДНК залишається у верхній водній фазі. Обережно, не торкаючись проміжної фази, фракцію, яка містить ДНК, переносять у чисту центрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл і додають 1 об. (400 мкл) суміші (24 об. хлороформу; 1 об. ізоамілового спирту). Інтенсивно струшують і центрифугують при 14000 об/хв. протягом 10 хв. для розділення фаз. Верхню фазу переносять у чисту пробірку.

Для осадження ДНК із розчину додають 1/10 об. 3М розчину ацетату натрію, рН = 5,2 (30 мкл) і 2,5 об. 96%-ного етанолу (800 мкл), обережно перемішують до появи кульки ДНК. Після видалення рідкої фази кульку ДНК промивають у 70% спирті, охолоджену до +4°C чи до -20°C, висушують при кімнатній температурі і додавали 50–100 мкл дистильованої/деіонізованої води.

Для ДНК-ампліфікації використовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Суть методу – багатократний направлений синтез ДНК із дезоксирибонуклеотидтрифосфатів, *in vitro*, за допомогою

термостабільної ДНК-полімерази. Специфічність синтезу (ампліфікації) вибраної ділянки ДНК визначається синтетичними праймерами-затравками.

*Обладнання для проведення ПЛР:* ампліфікатор (інша назва приладу – термоциклер або термостат, що програмується для проведення ампліфікації); генетичний аналізатор; автоматичні мікропіпетки (0,5 – 200 мкл) для відбору зразків; центрифуга для пробірок типу «Eppendorf» (частота обертання ротора до 14000 об/хв); прилади для вертикального (у поліакриламідному гелі) та горизонтального (в агарозному гелі) електрофорезу; транслюмінатор; система для фото- або цифрової документації результатів.

Реакційна суміш для проведення ПЛР (уміщує реакційний буфер для проведення ПЛР з  $MgCl_2$  або без нього, оптимізований для конкретної термостабільної ДНК-полімерази, та суміш чотирьох дезоксинуклеотид-трифосфатів; високоочищена (деіонізована) вода. Реактиви поставляються у готовому вигляді фірмами-виробниками.

Електрофоретичне розділення ISSR-маркерів та рестриктних фрагментів ДНК проводять в 2%, 4% агарозному гелях у трісборатному електрофорезному буфері (ТВЕ: 0.0879 М Тріс, 0.089 М борна кислота, 0.002 М ЕДТА рН 8.0). Для нанесення зразків на гель використовують буфер такого складу: 0,25% бромфеноловий синій, 0,25% ксилолцианол, 30% гліцерин. Електрофорез проводять 1–3 години при напрузі 2 в\см геля. Фарбування гелів здійснюють за допомогою бромистого етидію (0,5 мкг/мл) 10 хв. з послідуною їх багаторазовою відмивкою у дистильованій воді. Візуалізація проводиться на транслюмінаторі в УФ-світлі при довжині хвилі 380 нм після забарвлення гелю етидієм бромідом.

Розміри, отриманих в ПЛР або в результаті рестрикції продуктів, виявляють за допомогою маркеру молекулярних мас, наприклад, *GeneRuler DNA Ladder Mix ready-to-use*, “*Fermentas*”. Детекцію результатів проводять фотографуванням гелів цифровою камерою.

## **2.2. Визначення генотипу тварин за мікросателітними маркерами (STR-локусами)**

На сьогодні, відповідно до рекомендацій ISAG/FAO (*International Society of Animal Genetics*), запропоновані панелі найбільш інформативних мікросателітних маркерів для різних видів тварин, в тому числі і для ВРХ, які дають можливість оцінки гене-

тичної структури та достовірності походження тварин та племінного матеріалу з вірогідністю 99,99%;

Дослідження генетичної структури за мікросателітними маркерами проводять на генетичних аналізаторах, наприклад ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). STR-ПЛР-аналіз проводять у 3 етапи:

Склад реакційної ПЛР-суміші: 67мМ Тріс-НСl, рН 8,3; 17мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2,5мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Твін-20; 0,12 мг/мл БСА; 8% гліцерину; 0,2мМ дНТФ суміші; 5пкМ кожного з праймерів (послідовність і характеристику праймерів наведено у табл. 1.; Таq-полімераза – 5 од/мкл

Таблиця 1

**Мікросателіти і праймери для проведення STR-аналізу у великої рогатої худоби**

Локус / хромосома	Розмір в п. н.	Структура мікросателіта	Праймер (5'–3')F/R
BM1824 (D1S34)	170–218	(GT) <sub>n</sub>	F- GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC R- CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG
BM2113 (D2S26)	114–146	(CA) <sub>n</sub>	F- GCT GCC TTC TAC CAA ATA CCC R- CTT CCT GAG AGA AGC AAC ACC
INRA023 (D3S10)	193–235	(AC) <sub>n</sub>	F- GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTC R- TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C
SPS115 (D15S21)	235–265	(CA) <sub>n</sub> TA(CA) <sub>6</sub>	F- AAA GTG ACA CAA CAG CTT CTC CAG R- AAC GAG TGT CCT AGT TTG GCT GTG
TGLA122 (D21S6)	134–193	(AC) <sub>n</sub> (AT) <sub>n</sub>	F- AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA C R - CCC TCC TCC AGG TAA ATC AGC
TGLA126 (D20S1)	104–131	(TG) <sub>n</sub>	F- CTA ATT TAG AAT GAG AGA GGC TTC T R- TTG GTC TCT ATT CTC TGA ATA TTC C
TGLA227 (D18S1)	64–115	(TG) <sub>n</sub>	F- CGA ATT CCA AAT CTG TTA ATT TGC T R- ACA GAC AGA AAC TCA ATG AAA GCA
ETH10 (D5S3)	198–234	(AC) <sub>n</sub>	F- GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA CA R- CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC
ETH225 (D9S1)	135–165	(TG)4CG (TG)(CA) <sub>n</sub>	F- GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T R- ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT
ETH 3 D19S2	90–135	(GT) <sub>n</sub> AC(GT) <sub>6</sub>	F-GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG R-ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG

*Додаткові реактиви:* деіонізована вода, Ні-Di формаїд (Applied Biosystems), GeneScan-350 ROX стандарт (Applied Biosystems), контрольні проби: негативна контрольна проба – деіоні-



зована вода, позитивна контрольна проба – ДНК корови (10 нг/мкл). Реактиви для проведення ПЛР і контролі зберігають за температури  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для проведення ПЛР відбирають пробірки ємністю 0,2 мл та маркують. Розморожують пробірку з ПЛР-сумішшю і ретельно перемішують вміст на вортексі. Осаджують краплі центрифугуванням при 5 тис. об/хв упродовж 15 с. Готують реакційну суміш для досліджуваних проб із розрахунку 18,8 мкл ПЛР-суміші та 0,2 мкл Таq-полімерази на одну пробу. Суміш ретельно перемішують, краплі осаджують центрифугуванням. По 19 мкл готової реакційної суміші розносять в чисті пробірки. Використовуючи наконечник з аерозольним фільтром, додають по 1 мкл ДНК-проби в пробірки з реакційною сумішшю. У пробірки з негативними і позитивним контролем додають по 1 мкл контрольних проб. Задають відповідні параметри ампліфікації (табл.2.):

Таблиця 2.

### Умови та параметри ампліфікації

Умови ампліфікації		
Температура	Час	Кількість циклів
95°C	10 хв	1
94°C	45 с	40
61°C	45 с	
72°C	60 с	
72°C	60 хв	1
25°C	120 хв	1
4°C	зберігання	

Після закінчення реакції пробірки переміщують в зону для проведення аналізу результатів на генетичному аналізаторі. Детекцію результатів проводять на генетичному аналізаторі, наприклад, ABI Prism 3130. Для цього до кожної ПЛР-проби додають 100 мкл деіонізованої води і готують суміш, яка складається з 1 мкл розбавленої ПЛР-проби, 11,5 мкл Hi-Di формаміду (Applied Biosystems) і 0,5 мкл стандарту GeneScan-350 ROX (Applied Biosystems). Ретельно перемішують на вортексі і осаджують центрифугуванням при 5 тис. об/хв упродовж 15 с. Проби денатурують впродовж 2 хв за 95°C, після чого витримують 3 хв за 0°C. Далі проби переносять в генетичний ана-

лізатор ABI Prism і виконують аналіз згідно з інструкцією виробника.

У ході капілярного електрофорезу досліджуваних проб комп'ютерна програма GeneScan визначає розмір флюоресцентно мічених ПЛР-продуктів (у парах нуклеотидів). Отримані дані переносять у комп'ютерну програму Genotyper або GeneMapper для визначення генотипів.

Результати програмної обробки можуть бути представлені як у графічному вигляді (карта піків, із зазначеним розміром фрагментів і відносною інтенсивністю піків (рис. 1), так і у формі таблиці. Варіація розмірів фрагментів відповідних алелів і локусів у деяких випадках може виходити за вказані межі (табл. 3), що є нормою і відображає різноманітність популяцій і процеси мінливості геномів.

В ході обробки даних, піки сигналів (фактично, це ПЛР-фрагменти аналізованих локусів), отримані на досліджуваних пробах, порівнюють за таблицями або матрицями з піками сигналів.

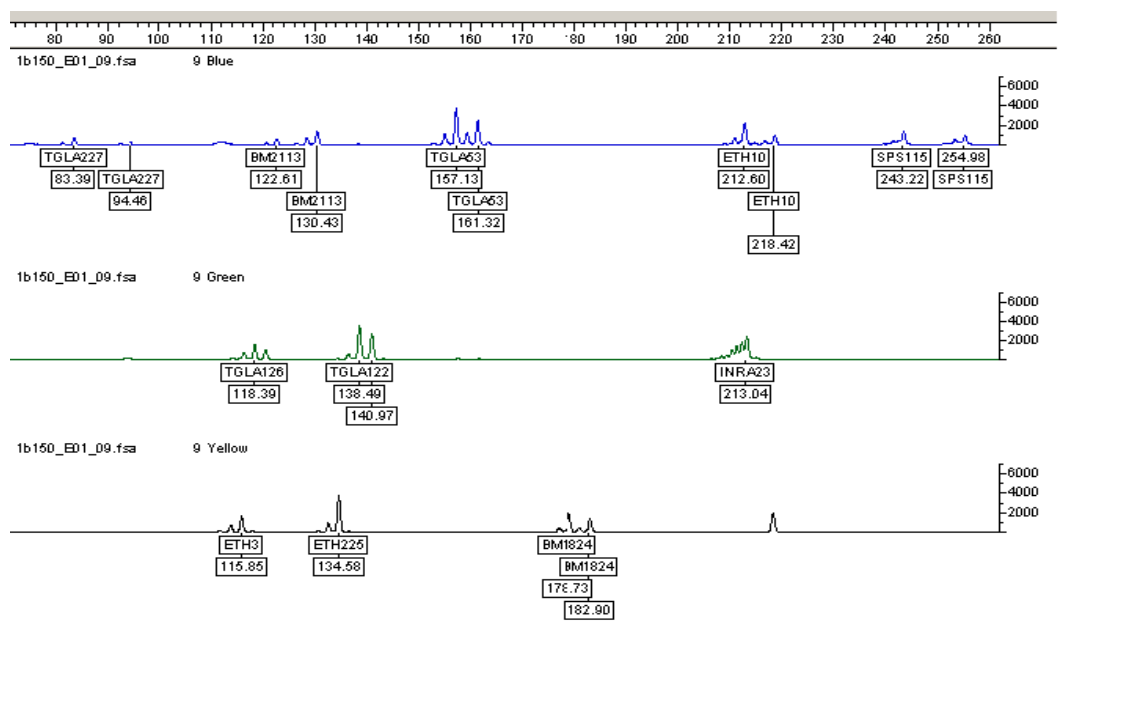


Рис. 1. Визначення генотипу великої рогатої худоби за мікросателітними маркерами ISAG/FAO, IKAR. А – панель розміру алельних леддерів мікросателітних локусів; В – результати ідентифікації розмірів алелей у тварини відповідно до кожного піку за кожним локусом.

**Мікросателітні локуси великої рогатої худоби**

Назва локусів	Барвник	Колір	Розмір (п. н.)
TGLA227	FAM	Blue	64–115
BM2113	FAM	Blue	116–146
ETH10	FAM	Blue	198–234
SPS115	FAM	Blue	235–265
TGLA126	JOE	Green	104–131
TGLA122	JOE	Green	134–193
INRA23	JOE	Green	193–235
ETH3	NED	Yellow	90–135
ETH225	NED	Yellow	135–165
BM1824	NED	Yellow	170–218

Результат успішної ампліфікації алелю представляє собою пік, асоційований з низкою додаткових піків меншої інтенсивності, які утворюються внаслідок так званого ковзання полімерази. Максимальне відхилення додаткових піків від основного становить 8 пар нуклеотидів. Число піків алелю залежить від того, яким є генотип тварини – гомозиготним чи гетерозиготним.

### **2.3. Визначення генотипу тварин за локусами кількісних ознак (QTL) методом ПЛР-ПДРФ**

*Визначення генотипу тварин за геном капа-казеїну ( $\kappa$ -Сп).* Для ампліфікації фрагменту гену  $\kappa$ -Сп використовують наступні праймери:

5' GAAATCCCTACCATCAATACC-3'

5' CCATCTAC CTAGTTTAGATG-3'.

Довжина ампліфікованого фрагменту складає 273 п. н. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції використовують реакційну суміш об'ємом 10 мкл.

Склад реакційної суміші наступний: 4,6 мкл H<sub>2</sub>O; 2,0 мкл буфера ПЛР 5-х (67 мМ Трис-НС1 (рН 8,3), 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>2</sub>, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8% гліцерин); 1,0 мкл dNTP суміші 10-х (2мМ кожного); 0,8 мкл двох праймерів (70 нг кожного); 0,1 мкл Таq-полімерази (1мол/1000 U); 1,5 мкл. ДНК 50-100 нг.

Температурний режим ПЛР-ампліфікації: початкова денатурація –

4 хв. при 94°C; 34 циклу: денатурація 94°C – 15 сек.; випал праймерів 58°C – 15 сек.; синтез 72°C – 15 сек.; термінальна елонгація 72°C – 5 хв.

Суть методу ПЛР-ПДРФ полягає в аналізі довжин рестрикційних фрагментів, відмінності за якими можуть бути виявлені безпосередньо за допомогою гель-електрофорезу. Для аналізу поліморфізму використовують рестриктази, підібрані до певних праймерів кожного гена.

Склад суміші для рестрикції: вода – 3,5 мкл; буфер R (10mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA) – 1,5 мкл; рестриктаза Hinf I – 0,5 мкл; ПЛР суміш – 10 мкл. Для рестрикції гену к-Сп використовують рестриктазу Hinf1 при t 37°C 8–12 год. Продукт ампліфікації гену к-Сп з вказаними праймерами включає ділянку 4-го екзона і 4-го інтрона гену. Після рестрикції цього фрагменту рестриктазою Hinf1, виявляють два алельні варіанти А і В гену к-Сп. У тварин з генотипом АА спостерігають фрагменти довжиною 133 , 91, 49 п. н.; генотип АВ представлений фрагментами 224, 113, 91, 49 п. н., а тварини з гомозиготним варіантом ВВ мають два фрагмента розміром 224 та 49 п.н. (рис. 2.).

	ПЦР	АА	АВ	ВВ
273	—			
224			—	—
133		—	—	
91		—	—	
49		—	—	—

Рис. 2. Схема розташування на гелелектрофореграмі рестрикційних фрагментів гену к-Сп в залежності від генотипу тварин при застосуванні рестриктази Hinf1

*Визначення генотипу тварин за геном бета-лактоглобуліну (βLG). Для ампліфікації фрагменту гена βLG використовують наступні праймери:*

5' TGTGCTGGACACCGACTACAAAAAG-3'

5' GCTCCCGGTATATGACCACCCTCT-3'.

Довжина ампліфікованого фрагменту складає 247 п. н. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції використовують реакційну суміш об'ємом 10 мкл.

Склад реакційної суміші наступний: 4,6 мкл H<sub>2</sub>O; 2,0 мкл буфера ПЛР 5-х (67 mM Трис-НС1 (рН 8,3), 17 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>2</sub>, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8% гліцерин); 1,0 мкл dNTP

суміші 10-х (2мМ кожного); 0,8 мкл двох праймерів (70 нг кожного); 0,1 мкл Таq-полімерази (1мол/1000U); 1,5 мкл ДНК 50-100 нг.

Температурний режим: початкова денатурація – 94°C – 4 хв.; 34 цикла: денатурація 94°C – 15 сек.; випал праймерів 63°C – 15 сек.; синтез 72°C – 15 сек.; термінальна елонгація 72°C – 5 хв.

Для рестрикції гена  $\beta$ LG використовували рестриктазу *Bsu* RI (HaeIII) при t 37 °C 8 – 12 год. Склад суміші для рестрикції: вода – 3,5мкл; буфер R (10mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA) – 1,5 мкл; рестриктаза *Bsu* RI (HaeIII) – 0,5 мкл; ПЛР суміш – 10 мкл.

Продукт ампліфікації гену  $\beta$ LG – ділянка довжиною 247 п. н. включає фрагмент 4-го екзона і 4-го інтрона. Для алельних варіантів гену  $\beta$ LG після рестрикції рестриктазою *Bsu* RI. визначають такі генотипи тварин: AA – один сайт рестрикції і, в результаті, на фореграмі продуктів рестрикції виявляють два фрагменти довжиною 148 і 99 п. н., а для генотипу BB характерна присутність двох сайтів рестрикції, що призводить до формування трьох фрагментів рестрикції довжиною 99 п.н. і двох фрагментів з довжиною 74 п. н. (рис. 3).

	ПЦР	AA	AB	BB
247	—			
148		—	—	
99		—	—	—
74			—	—

Рис. 3. Схема розташування на гелелектрофореграмі рестрикційних фрагментів гену  $\beta$ LG в залежності від генотипу тварин при використанні рестриктази *Bsu* RI.

*Визначення генотипу тварин за геном калпаїну (CAPN1 530).*  
Для ампліфікації послідовності гену калпаїна (CAPN 530) використовують праймери:

CAPN1 530 f: 5'- TCT TCT CAG AGA AGA GCG CAG – 3'

CAPN1 530 r: 5'- CTG CGC CAT TAC TAT CGA TC – 3'.

Суміш для ПЛР на 10 мкл: 4,6 мкл води для ПЛР; 2,0 мкл 5-х буфера ПЛР (67 мМ Трис-НС1 (рН 8,3), 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>2</sub>, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8% гліцерин); 1,0мкл 10-х суміші dNTP; по 0,4 мкл (70нг) кожного праймера; 0,1 мкл Таq-полімерази (10000 U/1мл); 1,5 мкл ДНК (50-100 нг).

Режим проведення ПЛР: денатурація 95°C – 4 хв., 35 циклів: денатурація 95°C – 30 сек.; випал праймерів 63°C – 30 сек.; синтез 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація 72°C – 5 хв.

Для виявлення алельних варіантів А і G гена CAPN1 530 продукт ампліфікації обробляють рестриктазою *Pvu*I на протязі 3-х годин при температурі 37°C.

Суміш для рестрикції на 15 мкл: вода – 3,5 мкл; буфер Tango – 1,5 мкл; рестриктаза *PsuI* – 0,5 мкл; ПЛР суміш – 10 мкл. Розділення продуктів рестрикції проводять у 2% агарозному гелі. Довжина ампліфікованого фрагменту складає 341 п. н. У тварин носіїв генотипу AA один сайт рестрикції (рис. 4), з довжиною фрагмента 341 п. н., у AG – три сайти рестрикції, довжиною фрагментів 341 п. н., 195 п. н., 146 п. н., а GG – мають довжину фрагментів 195 п. н., 146 п. н.

	ПЛР	AA	AG	GG
341	—	—	—	
195			—	—
146			—	—

Рис. 4. Схема розташування на гелі-електрофореграмі рестрикційних фрагментів гену калпаїну (маркер *CAPN1 530*) в залежності від генотипу тварин при застосуванні рестриктази *PsuI*.

*Визначення генотипу тварин за геном тиреоглобуліна (TG 5).* Для ампліфікації послідовності гену тиреоглобуліна (TG 5) використовують праймери:

TG5 f: 5'- GGG GAT GAC TAC GAG TAT GAC TG – 3'

TG5 r: 5'- GTG AAA ATC TTG TGG AGG CTG T – 3'.

Суміш для ПЛР на 10 мкл: 4,6 мкл води для ПЛР; 2,0 мкл 5-х буфера ПЛР (67 мМ Трис-НС1 (рН 8,3), 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>2</sub>, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8% гліцерин); 1,0 мкл 10-х суміші dNTP; по 0,4 мкл (70 нг) кожного праймера; 0,1 мкл Таq-полімерази (10000 U/1мл); 1,5 мкл ДНК (50-100 нг).

Режим проведення ПЛР: денатурація 95°C – 4 хв., 35 циклів: денатурація 95°C – 30 сек.; випал праймерів 62°C – 30 сек.; синтез 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація 72°C – 5 хв.

Для виявлення алельних варіантів С і Т гену TG 5 продукт ампліфікації обробляють рестриктазою *PsuI* на протязі 3-х годин при температурі 37°C. Суміш для рестрикції на 15 мкл: вода – 3,5 мкл; буфер Tango – 1,5 мкл; рестриктаза *PsuI* – 0,5 мкл; ПЛР суміш – 10 мкл. Розділення продуктів рестрикції проводять у 2%-ному агарозному гелі. Довжина ампліфікованого фрагменту складає 548 п. н. У тварин з генотипом CC продукт ПЛР має три сайти рестрикції (рис. 5) з фрагментами довжиною 295 п. н., 178 п. н., 75 п. н., у TT – два сайти рестрикції, довжиною фрагментів 473 п. н., 75 п. н., а СТ – мають довжину фрагментів 473 п. н., 295 п. н., 178 п. н., 75 п. н.

	ПЛР	СС	СТ	ТТ
548	—			
473			—	—
295		—	—	
178		—	—	
75		—	—	—

Рис. 5. Схема розташування на гелелектрофореграмі рестрикційних фрагментів гену тиреоглобуліну (маркер TG5) в залежності від генотипу тварин при застосуванні рестриктази *PsuI*.

Визначення генотипу тварин за геном *BoLA-DRB3* головного комплексу гістосумісності. Для ампліфікації у 2-етапи використовують наступні праймери:

HLO 30-5' - TCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3'

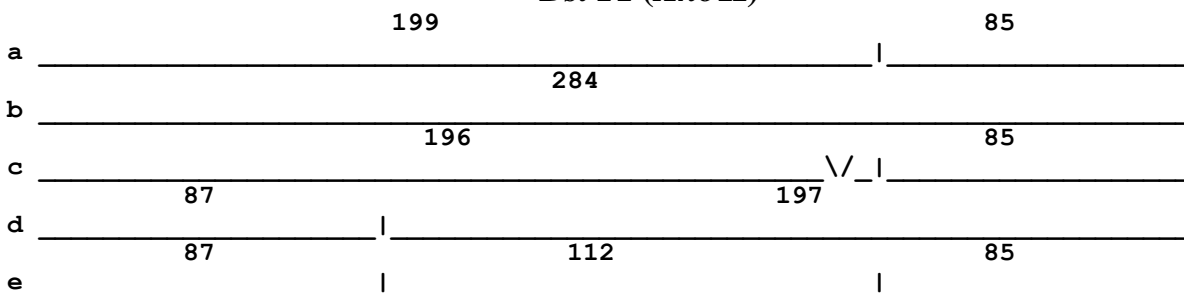
HLO 31-5' - ATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3'

HLO 32-5' - TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC-3'

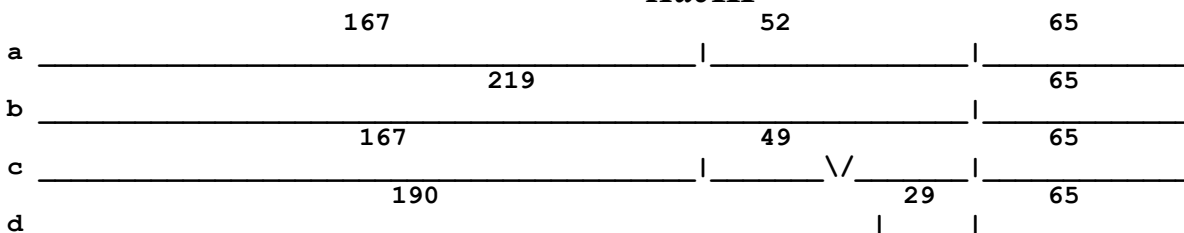
Довжина ампліфікованого фрагменту складає 284 п. н. Температурний режим ПЛР – ампліфікації 1: початкова денатурація – 95°C – 5 хв.; 35 циклів: денатурація 94°C – 60 сек.; випал праймерів 62,5°C – 2 хв; синтез 72°C – 1 хв.; термінальна елонгація 72°C – 7 хв. Температурний режим ПЛР – ампліфікації 2: початкова денатурація – 95°C – 5 хв.; 35 циклів: денатурація 94°C – 30 сек.; випал праймерів 68°C – 30 сек; синтез 72°C – 30 сек.; термінальна елонгація 72°C – 7 хв.

Для рестрикції гену *BoLa-DRB3.2*. використовують рестриктази *RsaI*, *HaeIII*, *XhoII* (*BstYI*). Склад реакційної суміші: 0,5 мкл – *Bsa*; 2,5 мкл – бифера; 9,5 мкл – ddH<sub>2</sub>O; 0,5 мкл – рестриказ, 7 мкл – matrix. На рис. 7 представлено сайти рестрикції.

***BstYI (XhoII)***



***HaeIII***



e	167			117		
f	167	4	48	65		
g	164			55		
h	167			46	6	65
i	167			4	113	
<b><i>RsaI</i></b>						
a	78	33	30	39	54	50
b	111		30	39	54	50
c	111		30	93		50
d	111		30	143		
e	141		39		51	50
f	141		39		54	50
g	141		39		104	
h	111		69		54	50
i	180			54		
j	78	63		93		50
k	78		156			50
l	234			50		
m	111		69		104	
n	180			104		
o	284					
p	111		30	39	51	50
q	141		90		50	50
r	111		30	90		50
s	141		93		50	
t	141			143		
u	111		123			50
v	78	102		54		50
w	78	33	69		54	50
x	78	33	69		104	
y	78	63		39	54	50

∖ - присутність делеції

Рис. 7. Сайти рестрикції гену *BoLA-DRB3*



Визначення алелей гену *BoLA-DRB3* на основі даних рестрикційного аналізу за використання рестриктаз (*RsaI-BstYI (XhoII)-HaeIII*) наведено у таблиці 4.

Таблиці 4.

**Визначення алелей гену *BoLA-DRB3* на основі даних рестрикційного аналізу**

DRB3*0501	1	aaa	DRB3*1501	16	jbd	DRB3*2401	32	maa
DRB3*0503	1	aaa	DRB3*1502	16	jbd	DRB3*2704	33	nbf
DRB3*1301	2	bba	No sequence	17	kbb	DRB3*3001	34	lab
DRB3*1001	3	bbb	DRB3*1801	18	lbf	DRB3*3002	34	lab
DRB3*1002	3	bbb	DRB3*1802	18	lbf	DRB3*2101	35	cbb
No sequence	4	caa	DRB3*2601	19	sbb	DRB05	36	lba
DRB3*3301	5	rcc	DRB3*2301	20	lbb	DRB07	37	oba
DRB3*2201	6	daa	DRB3*2901	20	lbb	DRB18	38	bda
DRB3*2202	6	daa	DRB3*3601	20	lbb	No sequence	39	tba
DRB3*0201	7	ecc	DRB3*0801	21	lbe	No sequence	40	uba
DRB3*1201	8	faa	DRB3*1101	22	mba	DRB3*0502	41	aba
DRB3*0301	9	fda	DRB3*2701	23	nba	DRB3*1901	41	aba
DRB3*0302	9	fda	DRB3*2702	23	nba	DRB3*3801	41	aba
DRB3*1601	10	fba	DRB3*2703	23	nba	DRB3*2802	42	hbf
DRB3*1602	10	fba	DRB3*2705	23	nba	DRB3*25012	43	kbf
DRB3*0901	11	gea	DRB3*2706	23	nba	DRB3*25011	44	kbi
DRB3*0902	11	gea	DRB3*2707	23	nba	DRB3*3401	45	sdb
DRB3*1202	11	gea	DRB3*0101	24	nbb	DRB3*3402	45	sdb
DRB3*1701	12	haa	DRB3*0102	24	nbb	DRB3*3501	46	vba
DRB3*1702	12	haa	No sequence	25	oaa	DRB3*1703	47	waa
DRB3*3201	12	haa	DRB3*0601	26	oab	DRB3*3901	48	wba
DRB3*3202	12	haa	DRB3*14011	27	obf	DRB3*3701	49	wbe
DRB3*3203	12	haa	DRB3*14012	27	obf	DRB3*4001	50	xba
DRB3*0401	13	hba	DRB3*3101	27	obf	DRB3*4201	51	gaa
No sequence	14	hbb	DRB3*0701	28	obb	DRB3*0303	52	sda
DRB3*20011	15	iba	DRB3*4101	29	pcc	DRB3*1902	53	yba
DRB3*20012	15	iba	Genotyping error	30	qcc	DRB3*4301	54	jdb
DRB3*2002	15	iba	DRB3*2801	31	ibf			

## 2.4. Цитогенетичний аналіз

Для визначення адаптаційного потенціалу тварин великої рогатої худоби автохтонних порід можна застосовувати цитогенетичний аналіз – проведення кількісної і якісної оцінки каріотипу.

Для цитогенетичного контролю використовували периферійну кров. Одержання препаратів із лімфоцитів периферійної крові здійснювалося у такій послідовності: взяття крові, її транспортування, підготовка стерильних флаконів із живильним середовищем, приготування препаратів, забарвлення, фотографування, аналіз метафазних пластинок. Класифікацію і облік хромосомних аберацій проводили відповідно до загальноприйнятих рекомендацій. В усіх дослідженнях, як параметри хромосомної нестабільності, визначали кількісні порушення хромосом (відсоток анеуплоїдних, поліплоїдних, гаплоїдних клітин від 100 проаналізованих), відсоток клітин із асинхронним розщепленням центромірних районів хромосом; структурні порушення хромосом (відсоток клітин із парними і поодинокими фрагментами, з розривами хромосом і хроматид від 100 проаналізованих).

Мікроядерний тест – тестування на мутагенність агентів різної природи.

На одержаних цитогенетичних препаратах підраховували кількість двоядерних лімфоцитів (ДЯ), одноядерних лімфоцитів із мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ). Частоту ДЯ, МЯ, МІ вираховували в проміле (‰) – кількість на 1000 клітин. Статистичну обробку отриманих даних здійснюють стандартними методами (середня величина частоти клітин із цитогенетичними порушеннями ( $M$ ), помилка середньої арифметичної ( $m_M$ ), достовірність різниці середніх величин ( $t_d$ ) за критеріями Ст'юдента ( $t_d$ )).

Проведення порівняльної характеристики хромосомного поліморфізму та поширення аберантних хромосом у тварин великої рогатої худоби автохтонних порід з тваринами великої рогатої худоби комерційних порід відповідного напрямку продуктивності.

## ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Дзіцюк В. В. Використання цитогенетичних методів у селекції плідників. Київ : Аграрна наука, 2009. 60 с.
2. Зубець М. В. Перспектива розвитку біотехнологій в УААН. *Використання сучасних молекулярно-генетичних і біотехнологічних розробок у генетико-селекційних дослідженнях* : зб. матеріалів 2-ї міжнар. конф. Київ : Аграрна наука, 1998. С. 3–6.
3. Копилов К. В., Заблудовський Є. Є. Генетичний моніторинг при збереженні племінних ресурсів тварин. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2008. Вип. 42. С. 119–125.
4. Копилов К. В. Сучасні методи ДНК-аналізу в селекційно-племінній роботі. *Розведення і генетика тварин*. Київ, 2009. Вип. 43. С. 178–187.
5. Копилов К. В. Стан та перспективи використання генотипного маркування в селекції тварин. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2010. Т. 8, № 1. С. 91–99.
6. Столповский Ю. А. Концепция и принципы генетического мониторинга для сохранения пород доместичированных животных. *Сельскохозяйственная биология*. 2010. № 6. С. 3–8.
7. Шельов А. В., Дзіцюк В. В. Методика приготування метафазних хромосом лімфоцитів периферійної крові тварин. *Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві*. Київ : Аграрна наука, 2005. С. 210–213.
8. Barendse W. Assessing lipid metabolism. International patent application PCT/AU98/00882, international patent publication No. WO99/23248, 1999.
9. Casas E., Shackelford S. D., Keele J. W. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J. of Anim. Science*. 2003. V. 81, n 12. P. 2976–2983.
10. Pinder S. J., Perry B. N., Skidmore C. J. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction. *Anim. Genet*. 1991. V. 21, n 1. P. 2–18.
11. Medrano J., Aquilar-Cordova E. PCR amplification of bovine  $\beta$ -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Anim. Biotechnology*. 1990. N 1. P. 73–77.
12. Barendse W. J. The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Austr. J. Exp. Agricult*. 2004. V. 44. P. 66.
13. Costello S. Association of polymorphisms in the caplain I, caplain II and growth hormone genes with tenderness in bovine *M. longissimus dorsi*. *Meat. Science*. 2007. V. 75. P. 551–557.
14. Page B. T. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci*. 2002. V. 80. P. 3077–3085.
15. Page B. T. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J. Anim. Sci*. 2004. V. 82. P. 3473–3481.

Науково-практичне видання

*Копилов К. В.*  
*Бірюкова О. Д.*  
*Шельов А. В.*  
*Добрянська М. Л.*  
*Мохначова Н. Б.*  
*Маковська Н. М.*  
*Стародуб Л. Ф.*

За редакцією професора Б. Є. Подоби

**ВИЗНАЧЕННЯ АДАПТАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ  
ПЛЕМІННИХ РЕСУРСІВ МОЛОЧНОЇ ХУДОБИ ТА  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ У СИСТЕМІ  
ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ**

Підписано до друку 29.09.2020.  
Формат 60 x 84 1/16.  
Ум. друк. арк. 2,2  
Наклад 100 прим.