

тання щодо використання партеногенетичних ембріонів ссавців як джерела ембріональних стовбурових клітин, є передумовою для вирішення проблем, пов'язаних з одержанням ембріональних стовбурових клітин у методичному та морально-етичному аспекті (Cibelli J. B. et al., 2002).

Застосування партеногенетичної активації *in vitro* ооцитів свиней може бути біологічною моделлю щодо визначення оптимальних критеріїв біологічної повноцінності ооцитів, оптимізації системи дозрівання ооцитів *in vitro* та культивування ембріонів. Так при одержанні ембріонів свиней *in vitro* однією з проблем є високий показник поліспермного запліднення дозрілих *in vitro* ооцитів, що значно впливає на рівень формування ембріонів на доімплантаційних стадіях розвитку (Abeydeera L. R., 2002). Тому застосування методу партеногенетичної активації яйцеклітин свиней створює передумови до нейтралізації негативного впливу поліспермії.

Таким чином, дослідження морфофункціональних та цитогенетичних особливостей формування партеногенетичних ембріонів ссавців *in vitro* дозволяють одержати нові теоретичні дані щодо механізмів реалізації генетичної інформації впродовж ембріонального розвитку, закономірностей та видових особливостей проходження оогенезу та раннього ембріогенезу, які належать до питань генетики раннього індивідуального розвитку.

УДК 637.5:636.082.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ В СЕЛЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА. ВЫЯВЛЕНИЕ НОСИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ. КОМПЛЕКСНЫЙ ПОРОК ПОЗВОНОЧНИКА (СVM)

**Л. А. Баранова, В. П. Емельянова, Е. В. Жорник,
А. М. Струкова, И. Д. Волотовский
Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси**

В конце прошлого века для улучшения промышленно-значимых признаков продуктивности проводилось активное скрещивание крупнорогатого скота черно-пестрой породы со скотом голштино-фризской породы. Одним из широко распространенных рецессивных генетических пороков голштинского скота является комплексный порок позвоночника (complex vertebral malformation, SVM). Установлено, что данное заболевание обуславливает получение большого количества абортів и мертворожденных телят. Комплексный порок позвоночника связан с мутацией в гене SLC35A3. Данный ген кодирует белок UDP N-acetylglucosamine transporter, регулирующий транспорт нуклеотидсвязанных сахаров, и участвует в гликозилировании белков. Он относится к семейству растворимых ферментов переносчиков, транспортирующих нуклеотидсвязанные сахара из

цитозоля в компартменты эндоплазматического ретикулума и/или аппарата Гольджи. В этих органеллах нуклеотидные сахара утилизируются с помощью гликозилтрансфераз при синтезе гликопротеинов, гликолипидов и углеводородных полимеров. Экспериментально показано, что организмы – мутанты, дефективные по генам таких переносчиков обнаруживают различные дефекты и повреждения при эмбриональном развитии, главным образом, обусловленные неспособностью транспортировать в органеллы нуклеотидные сахара-субстраты, необходимые для биосинтеза глюкозаминоглицина. Таким образом, UDP-транспортер играет важную роль в развитии осевого скелета, принимая участие в молекулярных механизмах формирования позвоночника и ребер у крупного рогатого скота.

Характерными признаками телят-носителей SVM являются общая недоразвитость, укороченная шея, слившиеся и деформированные позвонки, сколиоз, пороки ребер. Одним из симптомов является также деформация суставов передних и задних конечностей. Влияние мутации в этом рецессивном гене обуславливает кроме того пороки сердца. Поскольку физические дефекты при комплексном пороке позвоночника могут быть слабо выражены, точный диагноз, как правило, требует проведения сложных и узко специализированных исследований, а именно, некроскопии или аутопсии для выявления ненормальной изогнутости спины, сросшихся позвонков и сросшихся или отсутствующих ребер. Позвоночные аномалии сильно варьируют, поэтому для постановки окончательного диагноза используются радиографические исследования или анатомия позвоночника. Исходя из этого, мертворожденных телят-носителей SVM, особенно тех, которые рождаются раньше срока, зачастую относят к обычным случаям недоразвитости и не регистрируют как носителей заболевания. Хотя скрытые носители порока внешне ничем не отличаются от неносителей, 25 % стельностей, полученных от спаривания таких животных друг с другом, заканчиваются абортами или получением мертворожденных телят. В 50 % случаев появляются телята, скрытые носители порока, и лишь 25 % стельностей заканчиваются рождением потомства, свободного от SVM.

Проникновение заболевания в Беларусь происходит, главным образом, за счет завоза быков-производителей, их спермы или нетелей из Голландии и США, в меньшей степени из Германии и Канады.

В этой связи целью исследования была разработка собственной методики ДНК-анализа, основанной на применении метода PCR-PIRA, позволяющей достоверно выявлять скрытых носителей SVM. Использование методов ДНК-анализа по выявлению мутаций особенно важно для дорогостоящего скота, ввозимого в республику.

В качестве объектов исследования использовались образцы хрящевой ткани КРС различных пород и популяций. Разработку ДНК-диагностики животных для определения носителей SVM проводили с использованием метода PCR-PIRA (PCR-primer introduced restriction analysis) выявления мутации в гене белка SLC35A3. Метод основан на включении искусственного рестрикционного сайта в ПЦР-продукт с по-

мощью праймеров, содержащих нуклеотидные замены (mismatches) на 3'-конце. Для получения искусственного полиморфизма длин рестриционных фрагментов нуклеотидную замену вводили вблизи конца праймера, который находится рядом с интересующей нас мутацией.

Для определения точечной мутации в гене SLC35A3 методом PCR-PIRA использовали пару праймеров, один из них включает *EcoT22 I* сайт в амплифицируемый продукт для аллеля с мутацией (CVM аллель) для рестрикции рестриктазой *EcoT22 I*, другой – *Pst I* сайт в амплифицируемый продукт для аллеля дикого типа для рестриктазы *Pst I*. Оба праймера комплементарны нуклеотидной последовательности в области от 537 до 554 нуклеотида в гене SLC35A3, но 2 нуклеотида в 4-ом и 5-ом положениях с 3'-концов в обоих праймерах различаются. Три нуклеотида на 3'-концах обоих праймеров соответствуют нуклеотидам 556-558 как аллеля дикого типа, так и CVM аллеля.

Начальным этапом ДНК-диагностики на основе PCR-PIRA является получение ПЦР-фрагментов гена SLC35A3, содержащих искусственные рестриционные сайты. Полученный ПЦР-продукт подвергается рестрикции с использованием рестриктаз *Pst I* на дикий тип и *EcoT22 I* на мутацию CVM. Рестрикцию проводили в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 7,5 мкл ПЦР-смеси, Buffer 0 и 10 ед. активности рестриктазы *Pst I* или рестриктазы *EcoT22 I*. Смесь инкубировали в течение 16 час при 37 °С. Анализ рестриционных фрагментов проводили при помощи электрофореза в 3 % агарозном геле, приготовленном на TAE-буфере (0,04 М Трис-ацетат, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА). Перед нанесением пробы смешивали в соотношении 1:6 с раствором, содержащим 30 % глицерина, 0,25 % бромфенолового синего и 0,25 % ксилена цианола FF.

В результате рестрикции с рестриктазой *Pst I* для образца дикого типа и с рестриктазой *EcoT22 I* для мутантного генотипа образуются рестриционные фрагменты ожидаемого размера 212 п. о. У носителей мутации идентифицируются два фрагмента 233 п. о. и 212 п. о. как при использовании рестриктазы *Pst I*, так и при использовании рестриктазы *EcoT22 I*.

Наследственные заболевания крупного рогатого скота часто связаны с высокими показателями продуктивности, например с удоем. Поэтому исключение гена, ассоциированного с заболеванием, из селекционного процесса приведет к потере высоких продуктивных показателей. Поскольку большинство генетических заболеваний наследуется по рецессивному принципу, предпочтительным является контролирование генов, ассоциированных с наследственными заболеваниями, то есть экстенсивный скрининг поголовья для выявления носителей заболевания. Метод ПЦР-диагностики предназначен для выявления скрытого заболевания CVM и может быть полезным для тестирования аллеля CVM.