

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

**В. Дзіцюк, О. Гузеватий, К. Копилов, Л. Стародуб, А. Шельов,
Н. Мохначова, Ю. Лесняк, М. Добрянська**

**ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ
В СЕЛЕКЦІЇ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН:
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

Чубинське, 2025

Практичні рекомендації розглянуто і схвалено вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН (протокол № 8 від 26.06.2025 року.)

Рецензенти:

Микола Шаран – доктор с.-г. наук, професор (розділ 1);
Сергій Кузєбний – кандидат с.-г. наук, старший науковий співробітник (розділ 1);
Тетяна Супрович – доктор с.-г. наук, професор (розділ 2);
Роман Кулібаба – доктор с.-г. наук, професор (розділ 2);
Павлина Джус – кандидат с.-г. наук, старший науковий співробітник (розділ 3).

Практичні рекомендації розробили:

Валентина Дзіцюк, д-р с.-г. наук, проф., зав. лабораторії – розділ 1;
Олег Гузеватий, канд. біол. наук, ст. наук. сп., нач. управління НААН – розділ 1;
Кирило Копилов, д-р с.-г. наук, проф., гол. наук. сп. – розділ 2;
Любов Стародуб, д-р с.-г. наук, ст. наук. сп., гол. наук. сп. – розділ 2;
Андрій Шельов, д-р с.-г. наук, пров. наук. сп. – розділ 2;
Наталія Мохначова, канд. с.-г. наук, ст. дослідник, пров. наук. сп. – розділи 2, 3;
Юрій Лесняк, канд. с.-г. наук, наук. сп. – розділ 2;
Марія Добрянська, канд. с.-г. наук, ст. наук. сп. – розділи 2, 3.

ISBN 978-617-8633-98-1

Г 34 **Генетичні** методи в селекції сільськогосподарських тварин: практичні рекомендації / В. Дзіцюк, О. Гузеватий, К. Копилов, А. Шельов, Л. Стародуб, Н. Мохначова, Ю. Лесняк, М. Добрянська. Чубинське : ІРГТ ім. М.В. Зубця, 2025. 79 с.

У методичних рекомендаціях висвітлено теоретичні основи цитогенетичного дослідження сперматогенезу бугаїв-плідників, наведено методику кількісного каріологічного аналізу незрілих статевих клітин. Представлено методичні підходи до молекулярно-генетичних досліджень сільськогосподарських тварин за моно- та мультилокусними ділянками ДНК та за генетичними маркерами, пов'язаними з гіпоалергенними властивостями молока.

Рекомендації призначені для науковців, фахівців з генетики та розведення тварин, а також викладачів, аспірантів та студентів вищих навчальних закладів аграрного профілю.

УДК 636.082.2:575:576:577.2

ISBN 978-617-8633-98-1

© В. Дзіцюк, О. Гузеватий, К. Копилов, А. Шельов,
Л. Стародуб, Н. Мохначова, Ю. Лесняк, М. Добрянська,
2025 р.

© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця
НААН, 2025 р.

© Видавництво Ліра-К, 2025

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
Розділ 1	
ЦИТОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕРМАТО-ГЕНЕЗУ БУГАЇВ-ПЛІДНИКІВ.....	7
1.1. ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ЦИТОГЕНЕТИКУ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ.....	7
1.2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ ССАВЦІВ.....	9
1.2.1. Традиційна схема аналізу еякуляту племінних тварин.....	10
1.2.2. Кількісний каріологічний аналіз незрілих статевих клітин.....	10
1.3. МЕТОДИКА ПРИГОТУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ ХРОМОСОМ ІЗ КЛІТИН СПЕРМАТОГЕННОГО РЯДУ ПЛІДНИКІВ.....	11
1.3.1. Приготування препаратів хромосом із клітин сім'яників плідника.....	11
1.3.2. Приготування препаратів хромосом із клітин сперматогенного ряду з еякулятів плідників.....	12
1.4. АНАЛІЗ ХРОМОСОМ СПЕРМАТОЦИТІВ.....	14
1.5. АНАЛІЗ СИНАПТОНЕМНИХ КОМПЛЕКСІВ.....	22
1.6. АНАЛІЗ ХРОМОСОМНИХ НАБОРІВ СПЕРМАТОЗОЇДІВ.....	23
1.6.1. Метод гетерологічного запліднення.....	23
1.6.2. Метод FISH.....	24
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	25
Розділ 2	
ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ І МІКРОЕВОЛЮЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА МОНОЛОКУСНИМИ ТА МУЛЬТИЛОКУСНИМИ ДІЛЯНКАМИ ДНК У РІЗНИХ ВИДІВ СВІЙСЬКИХ ТВАРИН.....	30
2.1. ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	30

2.2. ПРОВЕДЕННЯ МІКРОСАТЕЛІТНОГО АНАЛІЗУ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВІД ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ.....	32
2.2.1. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у великої рогатої худоби (<i>Bos Taurus</i>).....	33
2.2.2. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у коней (<i>Equus caballus</i>).....	38
2.2.3. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у собак (<i>Canis familliaris</i>).....	40
2.2.4. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у свійської курки (<i>Gallus domesticus</i>).....	42
2.3. ДОСЛІДЖЕННЯ МУЛЬТИЛОКУСНИХ (МІЖМІКРОСАТЕЛІТНИХ) ДІЛЯНОК ДНК У ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ.....	44
2.3.1. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у великої рогатої худоби (<i>Bos Taurus</i>).....	44
2.3.2. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у кіз (<i>Capra aegagrus hircus</i>).....	45
2.3.3. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у коней (<i>Equus caballus</i>).....	46
2.3.4. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у водяного буйвола (<i>Bubalus bubalis</i>).....	47
2.4. ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ТА МІКРОЕВОЛЮЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА МОНОЛОКУСНИМИ (STR) ТА МУЛЬТИЛОКУСНИМИ (ISSR) ДІЛЯНКАМИ ДНК У РІЗНИХ ВИДІВ.....	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	54
Розділ 3	
ВИЯВЛЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ ТВАРИН, АСОЦІЙОВАНИХ З ГІПОАЛЕРГЕННИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ МОЛОКА.....	61
3.1. МАРКЕРИ, АСОЦІЙОВАНІ З АЛЕРГЕННИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ МОЛОКА.....	61
3.1.1. Ген бета-казеїну (CSN2) ВРХ.....	61
3.1.2. Ген капа-казеїну (κ-Cn) кіз.....	63
3.1.3. Ген бета-лактоглобуліну (βLG) кіз.....	64
3.2. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ГЕНОТИПУВАННЯ.....	65

3.2.1. Основні вимоги до роботи ПЛР-лабораторії	65
3.2.2. Обладнання ПЛР-лабораторії та необхідні матеріали.....	66
3.2.3. Біологічний матеріал для молекулярно-генетичного аналізу.....	67
3.2.4. Виділення препаратів ДНК (зона 1).....	68
3.2.5. Ампліфікація геномних локусів (зона 2).....	69
3.2.6. Електрофоретичний аналіз ПЛР-продуктів (зона 3).....	71
3.2.7. Рестрикційний аналіз ПЛР-продуктів (зона 3).....	72
3.2.8. Інтерпретація результатів досліджень.....	73
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	77

ВСТУП

Сучасне тваринництво стоїть на порозі нової ери завдяки генетичним підходам, які кардинально змінили принципи систематизації, ідентифікації та селекції організмів. Точне визначення генетичної спорідненості, надійна ідентифікація тварин та виявлення хромосомних аберацій є ключовими не тільки для фундаментальних досліджень, а й для ефективного управління репродуктивною функцією сільськогосподарських тварин.

Одним із вихідних інструментів у цьому напрямку є цитогенетичний аналіз клітин сперматогенного ряду. Він незамінним для виявлення хромосомних аберацій на різних стадіях мейозу – головної причини репродуктивних порушень, зокрема неплідності у самців. Навіть коли соматичний каріотип тварини виглядає нормальним, порушення в мейотичному каріотипі може привести до помітних фенотипових проявів мутацій.

Крім того, особливу роль виконують молекулярні дослідження, зокрема аналіз мікросателітних ДНК-маркерів (STR/SSR). Ці маркери ідеально підходять для генетичного картування, оцінки інбридингу (Fis), вивчення генетичної структури популяції та моніторингу мікроеволюційних процесів за рахунок їх високої гетерозиготності, чисельним алелям та мінантному типу успадкування. Крім того, розроблені у рекомендаціях Міжнародного товариства генетики тварин (ISAG/FAO) панелі таких маркерів є основою для достовірної оцінки походження та паспортизації племінних тварин. Генетичне тестування тварин із використанням цих маркерів проводиться одноразово за життя, оскільки алельні варіанти є стабільними та не залежать від зовнішніх факторів. Важливою також є оцінка генетичного поліморфізму і мікроеволюційних процесів за монолокусними та мультилокусними ділянками ДНК у різних видів сільськогосподарських тварин.

Комплексне застосування генотипування та аналізу хромосом статевих клітин плідників відкриває широкі можливості для ефективної селекції та значного підвищення відтворювальних функцій сільськогосподарських тварин. Ці методи дозволяють здійснювати паспортизацію та сертифікацію порід, контролювати інтрогресію генетичного матеріалу, оцінювати ступінь гомозиготності тварин, проводити детальний аналіз внутрі- та міжпородної генеалогічної диференціації.

Дані методичні рекомендації «Генетичні методи в селекції сільськогосподарських тварин: практичні рекомендації» розроблені як посібник для фахівців генетичних лабораторій та суб'єктів племінної справи. Вони дають практичні настанови щодо застосування сучасних молекулярних та цитогенетичних підходів для генетичного удосконалення та підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин в Україні.

Розділ 1

ЦИТОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ БУГАЇВ-ПЛІДНИКІВ

Головним завданням цитогенетики є вивчення аномалії каріотипу, що часто є причиною чоловічого безпліддя. Дослідження мейозу у сільськогосподарських тварин має велике значення, оскільки хромосомні зміни в клітинних клітинах можуть призвести до народження неповноцінного потомства. Аналіз хромосом у клітинах сперматогенного ряду плідників дозволяє встановити джерела репродуктивної нестабільності та механізми розвитку хвороби.

1.1. ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ЦИТОГЕНЕТИКУ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ

Гаметогенез – це процес утворення і диференціювання статевих клітин, який має ключове значення у репродукції ссавців. Гаметогенез в організмі самців (сперматогенез) являє собою складний гормонально залежний і генетично детермінований процес [6, 7].

Процес дозрівання статевих клітин (гаметогенез) особливо привабливий для цитогенетичних досліджень завдяки наявності серії міотичних поділів, мейотичної рекомбінації і редукційного поділу.

Усі статеві клітини ссавців беруть початок від первинних статевих клітин (ПСК) – гоноцитів. Походження ПСК донині остаточно не встановлено. Не викликає, однак, сумніву той факт, що ці клітини виникають значно раніше, ніж з'являються зачатки гонад, тобто вони мають екстрагонадне походження. Встановлено, що гоноцити вперше виявляють ознаки статевого диморфізму в зачатках гонад. У процесі формування чоловічих гонад (сім'яників) спрематогонії оточуються клітинами ціломічного епітелію, утворюючи так звані статеві тяжі, де вони перебувають у латентному стані до початку статевого дозрівання.

Велике практичне значення має визначення тривалості сперматогенезу і часу просування спермійів через придатки сім'яників. Це дає можливість установити строки, коли ті чи інші паратипні фактори впливають на якість еякуляту, визначити причини погіршення якості сперми, зробити правильні висновки щодо доцільності використання плідника. Тривалість сперматогенезу залежно від виду самця коливається від 35-ти днів у кнура до 75-ти днів у людини. У бугаїв – 61–63

дні. Дослідженнями доведено, що тривалість сперматогенезу є постійною видовою величиною.

За цей час стоволі клітини сперматогенного ряду (сперматогонії), які перебувають у глибині сім'яних каналців, проходять тривалий шлях диференціювання до зрілих, практично позбавлених цитоплазми, сперматозоїдів, що містять гаплоїдний набір хромосом.

У процесі сперматогенезу розрізняють дві фази – *тестикулярну* і *епідідимальну*. Під час першої відбуваються основні етапи диференціювання сперматогоніїв у сперматиди, під час другої – завершується дозрівання сперматозоїдів. У результаті накопичення мукополісахаридів, холестерину, інших захисних білків змінюються властивості зовнішніх мембран, сперматозоїди набувають здатності рухатися.

Тестикулярна фаза сперматогенезу включає в себе два послідовних етапи: власне *сперматогенез* і *сперміогенез*. Тестикулярна фаза контролюється гормонами гіпофізу (фолікулостимулювальним і лютеотропним) і власними гормонами сім'яників – тестикулярними андрогенами.

На I етапі сперматоцити I порядку проходять два послідовних мейотичних поділи. Вирішальним етапом гаметогенезу (сперматогенезу) є процес мейозу, під час якого відбуваються такі кардинальні для біології розвитку процеси, як кон'югація гомологічних хромосом з утворенням синаптонемного комплексу, рекомбінація генетичного матеріалу гомологів через взаємний обмін ідентичними хромосомними фрагментами (кросинговер), цитологічним проявом якого є хіазми. Всі ці процеси відбуваються у профазі I мейозу, в якій розрізняють такі цитологічні стадії, як *лептотена*, *зиготена*, *пахітена*, *діплотена* і *діакінез*.

Далі йде метафаза I з утворенням сперматоцита або ооцита II порядку і метафаза I з утворенням гаплоїдних сперматид і метафаза II з утворенням гаплоїдних сперматид у мейозі. З одного сперматоциту формуються чотири сперматозоїди. Таким чином, із одного сперматоциту I порядку виникають 4 клітини (сперматиди) з гаплоїдною кількістю хромосом.

Усі процеси диференціювання відбуваються у стінках звивистих сім'яних каналців. При цьому клітини сперматогенного ряду перебувають безпосередньо в цитоплазмі клітин Сертолі, які забезпечують живлення сперматоцитів і сперматид.

Під час сперміогенезу гаплоїдні клітини – сперматиди – проходять низку послідовних стадій диференціювання (фаза Гольджі, фаза ковпачка, акросомна фаза, фаза дозрівання). Вони втрачають цитоплазму, формують спеціальні органоїди (хвіст, шийку, акросому).

Особливо істотної зміни відбуваються безпосередньо в ядрі клітин. ДНК у складі хромосом втрачає типову для соматичних клітин нуклеосомну організацію. Гістонові білки, характерні для функціонально активної ДНК, замінюються на кислі білки, багаті на аргінін і протаміни. Спіралізація ДНК досягає максимальної величини.

1. 2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ ССАВЦІВ

Для гаметогенезу характерні кількісні і структурні порушення каріотипу, які якісно відрізняються від таких, що виникають у соматичному каріотипі.

Цитологічний аналіз сперматогенезу дає змогу простежити стадію мейозу, на якій стадії відбувається блокування формування гамет у плідника і встановити чинники, що можуть спричинити порушення хромосом.

Порушення сперматогенезу і сперміогенезу призводять до часткового або повного безпліддя у плідників. Останніми роками стало очевидно, що багато форм порушення фертильності плідників сільськогосподарських видів тварин зумовлені генетичними чинниками.

Точне визначення причин порушення фертильності нині набуває особливого значення, оскільки це дає змогу передбачити наслідки й уникнути матеріальних втрат в організації тваринницького виробництва.

Традиційно мейотичні хромосоми ссавців досліджують із біопсійного матеріалу чи матеріалу, отриманому після кастрації або забою тварин. Однак відбір матеріалу для досліджень пункцією сім'яника призводить до стресової ситуації у тварин, утворення гематом і, як наслідок, до погіршення їх спермопродуктивності. Це доцільно практикувати тільки в особливих випадках для дослідження рідкісних видів тварин, для масового цитогенетичного моніторингу цей метод непридатний. До того ж фрагмент сім'яника як біопсійний матеріал, який досліджується, може неадекватно відображати процеси, що відбуваються як в одному сім'янику, так і в обох.

1.2.1. Традиційна схема аналізу еякуляту племінних тварин

Традиційна схема аналізу еякуляту племінних тварин передбачає візуальне оцінювання сперми за зовнішніми ознаками (визначення об'єму, кольору, запаху, консистенції), та мікроскопічне оцінювання її якості (визначення концентрації, оцінювання якості за рухливою активністю, визначення співвідношення живих/мертвих та відсотка патологічних форм сперматозоїдів). Іноді, за потреби, аналізується морфологія сперматозоїдів.

До аналізу еякуляту самця входить також визначення виживання спермійів поза організмом. Визначається тривалість збереження рухливості спермійів у годинах при 37°C до повного відмирання усіх спермійів. На підставі цих даних за спеціальною формулою визначають абсолютний показник виживаності сперматозоїдів. Якісна сперма бугая при розрідженні її у 16–32 рази повинна мати абсолютний показник виживання спермійів не нижче 1400.

Однак такий аналіз не дає відповіді на питання, які пов'язані з причинами низької концентрації сперми чи низької її запліднювальної здатності.

1.2.2. Кількісний каріологічний аналіз незрілих статевих клітин

Як правило, дослідження хромосомного матеріалу із клітин сперматогенного ряду проводять на клітинах біопсійного матеріалу сім'яників. Однак цей спосіб не знайшов широкого застосування не лише через необхідність проведення процедури біопсії, а і через низьку інформативність методу.

Одним із найдоступніших методів аналізу стану сперматогенезу у ссавців є **кількісний каріологічний аналіз незрілих статевих клітин (ККАНСК)**. Успішними виявилися дослідження цим методом еякульованих мейоцитів бугаїв [8].

Передумовою для розроблення цього методу було спостереження, що в еякуляті, окрім сперматозоїдів, міститься 2–4% незрілих статевих клітин, а при порушенні репродуктивної функції самця їх кількість значно зростає [9, 10].

Частка таких клітин у різних видів різна, зокрема у бугая вона становить 0,01% кількості сперматозоїдів [11].

Метод ґрунтується на визначенні кількості клітин, що перебувають на різних стадіях сперматогенезу, способом їх підрахунку на цитогенетичних препаратах із еякуляту тварини.

На відміну від цитологічного аналізу біоптату сім'яника ККАНСК дає змогу детальніше проаналізувати стан сперматогенезу, оскільки передбачає ідентифікацію всіх стадій як мейотичних, так і перед- і постмейотичних. Зміна співвідношення клітин сперматогенного ряду дає можливість визначити стадії ділення чи диференціювання клітин, на яких сперматогенез виявився заблокованим.

У лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН проводять дослідження сперми й аналіз еякульованих клітин сперматогенного ряду на сухоповітряних препаратах із нативних еякулятів бугаїв-плідників. Незрілі статеві клітини класифікуються залежно від стадії розвитку так: сперматиди, первинні сперматоцити, резидуальні тільця, сперматогонії, або певні сперматогенні клітини [12].

Визначають частку клітин кожної стадії від загальної кількості незрілих статевих клітин. Підрахунком виділяють сперматоцити на стадії передпахітенного етапу розвитку (клітини на стадіях прелептотени, лептотени і зиготени), пахітени, диплотени-діакінезу, метафази I і II, сперматоцити II порядку і сперматиди.

1.3. МЕТОДИКА ПРИГОТУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ ХРОМОСОМ ІЗ КЛІТИН СПЕРМАТОГЕННОГО РЯДУ ПЛІДНИКІВ

1.3.1. Приготування препаратів хромосом із клітин сім'яників плідника

На початкових етапах виконання роботи приготування препаратів хромосом із сім'яників здійснювали за методом Evans [13] з деякими модифікаціями.

Послідовність оброблення тканин, що досліджуються, така.

1. Невеликі шматочки сім'яника з цілими фрагментами сім'яних каналців обробляли гіпотонічним розчином (1%-й розчин цитрату натрію, упродовж 5 хв). Вирізали шматочок із середини сім'яника і клали його в чашку Петрі у 1%-й розчин цитрату натрію, закривали скляною кришкою та залишали за кімнатної температури на 5–7 хв.

Враховуючи, що для вивчення клітин на стадіях лептотени, зиготени і пахітени краще використовувати клітини, які не оброблялися гіпотонією, матеріал для досліджень ділили на дві частини: одну поміщали у гіпотонічний розчин, другу відразу фіксували сумішшю спирту й оцтової кислоти.

2. З фіксованих у тотальному стані сім'яних каналців готували суспензію ізольованих статевих клітин, ретельно подрібнюючи тканину сім'яника. Суспензію додатково фіксували і висушували на предметному склі. Методика дала змогу працювати з дуже невеликим біопсійним шматочком сім'яника і вивчати будову хромосом на всіх етапах сперматогенезу. Методика дає змогу отримати якісні препарати як метафазних хромосом клітин на стадіях передмейотичного поділу, так і хромосом на всіх стадіях мейозу.

Для фіксації використовували суміш, приготовлену безпосередньо перед використанням. Суміш для фіксації складається з метилового чи етилового спирту, охолодженого до 0°C, і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1. Шматочки сім'яника переносили у пробірку з фіксатором, обережно збовтували, зливали надосадову рідину і добавляли нову порцію фіксатора (так, щоб об'єм фіксатора перевищував об'єм тканини, що фіксується, не менше ніж у 10 разів). Процедуру повторювали 5–6 разів.

Для розм'якшення тканин сім'яника і приготування суспензії ізольованих клітин використовували суміш льодяної оцтової кислоти і 50%-ї молочної кислоти у співвідношенні 4 : 1. Тканини сім'яника переносили у невеликі посудини і заливали їх сумішшю кислот. Слідкували, щоб об'єм рідини ледве перевищував об'єм тканин, інакше клітин буде мало.

Розпластання і висушування клітин робили на предметному склі. Для цього суміш статевих клітин переносили дозатором об'ємом до 0,5 мл на чисте предметне скло. Після нанесення на скло крапля розтікалася і в її центрі ставало помітним матове коло. На нього наносили краплю свіжоприготовленої суміші метилового спирту і льодяної оцтової кислоти. Після розтікання фіксатора по склу, але до початку його висихання, на препарат наносили 2–3 краплі абсолютного метилового спирту для збереження тонкої структури хромосом на стадіях зиготени–пахітени. На готовому препараті клітини розміщуються у формі правильного невеликого кола на тому місці, де на скло нанесли краплю суспензії. Препарати фарбували 2%-м лактацетоорсеїном або фарбником Гімза.

1.3.2. Приготування препаратів хромосом із клітин сперматогенного ряду з еякулятів плідників

Препарати мейотичних хромосом з еякулятів плідників для аналізу готували за методом Templado [14] з урахуванням особливостей еякулятів плідників різних видів.

Для цього 0,5 мл еякуляту вносили в центрифужну пробірку з гіпотонічним розчином (0,038 М розчин KCl), інкубували при 38°C протягом 30 хв, центрифугували (10 хв при 300 g), осад ресуспендували охолодженим метанол-оцтовим фіксатором (3:1). Після трикратної зміни фіксатора з проміжним центрифугуванням (10–15 хв при 300 g) до осаду добавляли 5 мл фіксатора й отриману суспензію наносили на предметні скельця. Препарати фарбували за Гімза й аналізували за допомогою світлового мікроскопу PZO при збільшенні у 1000 разів.

Для отримання препаратів синаптонемних комплексів нами було випробувано кілька методичних підходів: розпластання клітин [15], нанесення суспензії на препарат способом центрифугування [16], а також виявлення СК на препаратах, отриманих звичайним сухоповітряним способом [17].

Оптимальними визнали два способи приготування препаратів за методом розпластування клітин на краплі розчину сахарози [18].

За першим способом 0,5 мл еякуляту вносили в центрифужні пробірки з гіпотонічним розчином (0,038 М розчин KCl), інкубували за температури 38° упродовж 30 хв, центрифугували (10 хв при 300 g). На парафіновані предметні скельця наносили по дві краплі 0,2 М розчину сахарози. На ці дві краплі розкапували клітинну суспензію, яку через 1–2 хв легким доторком предметного скла знімали. Фіксували в суміші водного розчину сахарози з параформальдегідом (рН 8,5) протягом 10 хв. Препарати фарбували 50%-м водним розчином нітрату срібла в термостаті при 60°C протягом кількох (2-х і більше) годин у вологій камері з наступним дофарбовуванням фарбою Гімза. Стан фарбування контролювали під мікроскопом.

За другим способом [19], 5 мкл суспензії сім'яника у фізіологічному розчині обережно наносили на поверхню випуклого меніска краплі (20 мкл) 0,2 М розчину сахарози на воскових скельцях. Воскові скельця готували, натираючи поверхню чистих знежирених скелець воском. Поєднання гіпотонічного шоку і дії сил поверхневого натягу розриває клітину і розпластує її вміст на поверхні скла. Через 2 хв до поверхні краплі обережно доторкувалися чистим склом, яке попередньо нати-

рали клаптиком вовняної матерії для електризації. Клітини, що прилипли до поверхні наелектризованого скла, фіксували у 4%-му розчині параформальдегіду за рН 8–8,4, промивали у 0,4%-му розчині фотофло («Кодак») за рН 8 і висушували на повітрі. Препарати фарбували азотнокислим сріблом.

Стадії профазы мейозу визначали за методом Мозеса [20], проводячи диференційований аналіз гетерогенної популяції сперматоцитів із сім'яників (три стадії: рання, середня і пізня пахітена). Клітини на стадії зиготени і диплотени вилучали з аналізу.

Для обліку структурних аномалій (СК) використовували клітини, що перебували на різних субстадіях пахітена, в яких вдавалося порахувати всі 29 аутосомних СК і виявити Х-У вісі [21].

Частку клітин сперматогенного ряду визначали у відсотках від суми підрахованих клітин сперматогенного ряду і сперматозоїдів на мазках із еякуляту. Крім того, на препаратах клітин із еякуляту чи біоптату сім'яника враховували соматичні клітини: епітеліальні і лейкоцити, а для біоптату – клітини Сертолі тощо [22].

Пошкодження СК описували відповідно до класифікації, запропонованої Allen et al. [23], поділяючи всі аномалії на три групи:

- 1) розриви СК і розриви окремих бокових елементів СК;
- 2) асинапсис;
- 3) багатоосеві конфігурації і неправильні парування.

Просторовим зближенням між ХУ-статевим бівалентом і СК вважали випадки їх взаємного розміщення на відстані меншій, ніж довжина ХУ-бівалента.

Враховуючи дані Forejt et al. [24] про не випадкові контакти Х-У-вісей з аутосомними СК, що містять те чи інше структурне порушення, кожен з пахітен характеризували також з точки зору наявності в ній асоціацій аутосомних СК.

1.4. АНАЛІЗ ХРОМОСОМ СПЕРМАТОЦИТІВ

Аналіз хромосом сперматоцитів можливий на стадії пахітена. Для стадії пахітена характерним є чітко виражена хромомірна структура хромосом. За допомогою методів диференційного забарвлення в сперматоцитах можливо ідентифікувати кожен бівалент, виявити структурний поліморфізм і незначні структурні перебудови хромосом. На стадії пахітена можна виявити практично всі типи хромосомних аберацій [25].

Гетерозиготний стан хромосомних аберацій супроводжується утворенням характерних для кожного типу аномалій конфігурацій, тоді як гомозиготні перебудови виявляються лише в тому випадку, якщо вони різко змінюють морфологію хромосоми. Статевий бівалент (ХУ) утворює на стадії пахітени так званий статевий пухирець. Однак його детальний аналіз на світловому рівні утруднений внаслідок конденсованого стану. Реально дослідження статевого біваленту можливе лише на препаратах синаптемного комплексу – структурного компонента хромосомних бівалентів, який формується на стадії ранньої пахітени. У диплотені (стадія подвійних ниток) у міру роз'єднання гомологів у бівалентах візуалізуються хіазми. Характер розподілу хіазм у хромосомах і їх частота (середня кількість на бівалент або на ядро) можуть бути різними і залежать від багатьох чинників, зокрема і від наявності хромосомних перебудов. Для цитологічного аналізу зручною стадією є стадія діакінезу і метафази I, біваленти на цій стадії класифікують за формою, яка визначається розміром і морфологією хромосом, за кількістю і розміщенням хіазм [26].

Підрахунок кількості уні-, бі- і мультивалентів, а також частоти локалізації хіазм є методами геномного аналізу і використовуються у рутинному аналізі мейозу [27].

Отже, аналіз хромосом у профазі сперматогенезу принципово можливий, хоча і має значні технічні і методичні труднощі.

Встановлено, що морфологія незрілих статевих клітин з еякулятів досліджених бугаїв не порушена і відповідає структурним характеристикам хромосом, препарати яких отримані із сім'яника. Як у мейотичних клітинах сім'яника, так і в еякульованих мейоцитах хроматин має дифузний характер.

Результати проведених досліджень показали видову й індивідуальну специфіку наявності клітин сперматогенного ряду в еякулятах бугаїв.

У нормальних і здорових плідників, із нормальним каріотипом, за нашими даними, кількість клітин сперматогенного ряду в еякулятах невелика і не перевищує 150 тис. в 1 мл еякуляту, що становить близько 0,01% кількості сперматозоїдів.

Нині використовують кілька підходів до аналізу хромосомних аберацій у мейозі. Аналізують біваленти в пахітені мейозу за рисунком хромомірної будови, за структурою синаптонемних комплексів реєструють кількість і структуру хромосом у метафазі I і II.

Вплив структурних хромосомних аберацій (ХА) на сперматогенез

варіює згідно з даними літератури у доволі широких межах: від повної відсутності зрілих статевих клітин в еякуляті до нормального проходження процесу розвитку статевих клітин плідників. Варто відзначити, що у носіїв робертсонівських транслокацій сперматогенез і фертильність можуть бути не порушеними [28].

Наявність ХА не може не відображатися на можливості проходження статевими клітинами мейотичних поділів і передусім початку першого мейотичного поділу – профазі I мейозу. Цей тривалий багатостадійний етап мейозу характеризується такими важливими процесами гаметогенезу і онтогенезу, як кон'югація гомологічних батьківських хромосом на стадії зиготени, кросинговер і рекомбінація генетичного матеріалу на стадії пахітени у статевих клітинах, що забезпечує біологічну різноманітність виду.

Завдяки використанню можливості дослідження незрілих клітин сперматогенного ряду (НКСП) в еякуляті ми змогли оцінити стан сперматогенезу плідників, зокрема проходження НКСП профазі I мейозу у бугаїв і жеребців.

При виконанні робіт з аналізу хромосомного матеріалу в спермі виявилася низка методичних труднощів, оскільки надто невелика кількість клітин сперматогенного ряду в еякуляті бугаїв і велика кількість хромосом у клітині бугаїв і жеребців порівняно з аналогічним показником у людини значно ускладнює цитогенетичний аналіз.

Аналіз еякульованих клітин на різних стадіях, що передують мейозу, і на стадіях власне мейозу дає змогу прослідкувати проходження сперматогенезу бугаїв. Нами виявлено різну цитоморфологію попередників статевих клітин в еякуляті, що свідчить про перебування їх на різних стадіях мейотичного дозрівання.

Враховуючи цитофізіологію і ключові положення певних стадій сперматогенезу, нами проведено більш детальну ідентифікацію клітин, розрізняючи сперматогонії, сперматоцити первинні у прелептотені, лептотені, зиготені, пахітені, диплотені, діакінезі – метафазі I (MI), і сперматозоїди.

Ми ідентифікували стадії лептотени, зиготени, пахітени (рис. 1).

Увесь складний багатоетапний процес гаметогенезу зводиться до наступних ключових подій: після завершення проліферації сперматогонії в гонадах вступають у період передмейотичного синтезу ДНК, який відбувається у сперматоцитах I на *прелептотенних* стадіях.

Хромосоми у цей період ідентифікувати неможливо, оскільки вони представлені в різній ступені конденсації чи деконденсації. У

міру завершення прелептотенної деконденсації, сперматоцити I переходять на стадію *лептотени*, де у нитковидних хромосомах формуються вісі – попередники бокових елементів синаптонемного комплексу. Ця стадія також непридатна для каріотипування хромосом. Хромосоми на стадії *лептотени* мають виражену структуру – за їх довжиною з нерівномірними проміжками розміщені щільні потовщення – хромоміри. З першого погляду вони схожі на зернисту структуру хроматину, однак хромоміри мейотичних хромосом значно більші від хроматинових зернят.

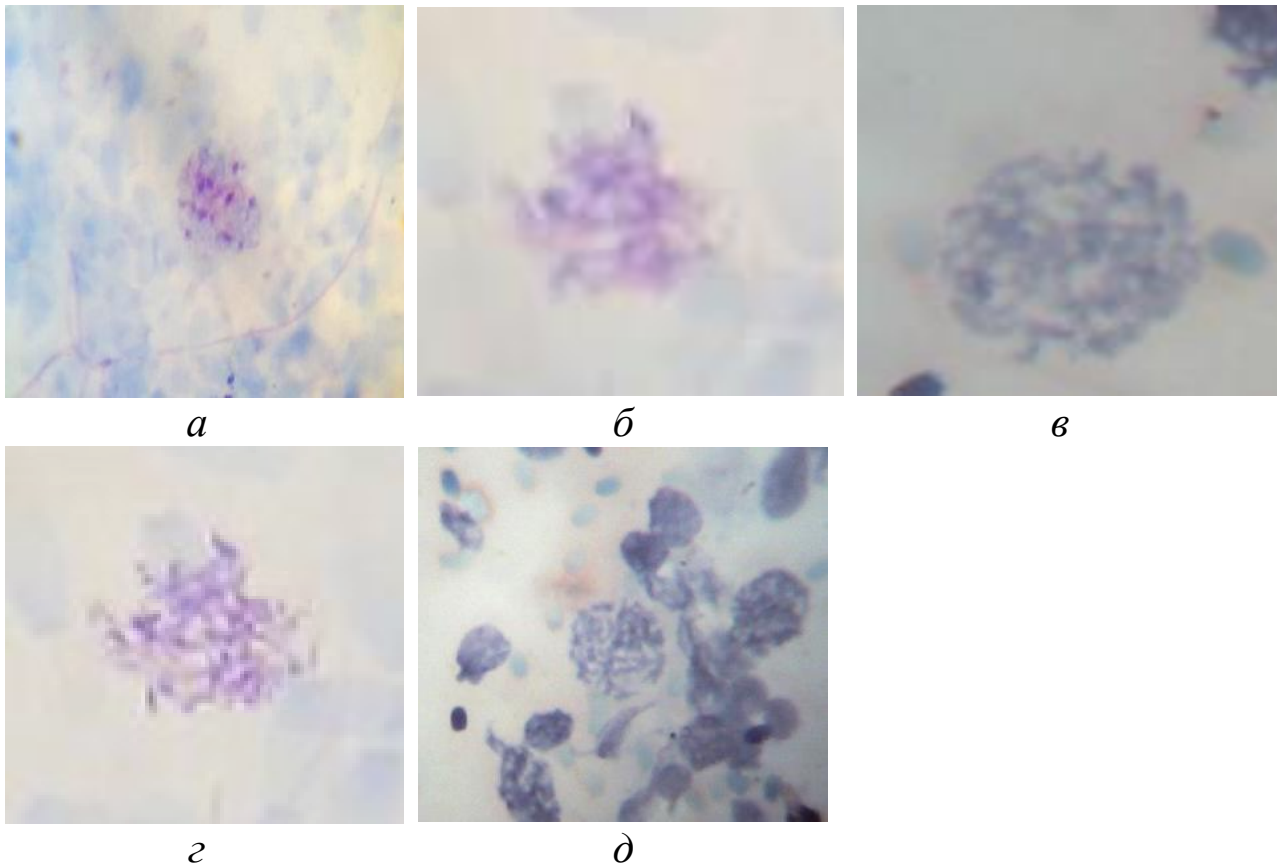


Рис. 1. Клітини сперматогенного ряду (препарати із еякулятів бугаїв): а – *лептотена*; б – *зиготена*; в – *пахітена*; з – *диплотена*; д – *пахітена* (препарат з біопсійного матеріалу сім'яника). Збільшення: об. $\times 100$; ок. $\times 10$.

Процес кон'югації гомологічних хромосом у біваленти на стадії *зиготени* здійснюється за допомогою формування бокових елементів синаптонемного комплексу і формування між ними центрального елемента. Синаптонемні комплекси розміщуються між гомологічними хромосомами, що кон'югують, утримують їх одну біля одної і сприяють правильному здійсненню процесу кросинговера [29].

На стадії *пахітени* хромосоми спіралізовані і краще розрізняються. Саме ця стадія є найбільш придатною для дослідження різних аномалій синапсису і структурних аберацій. За нашими даними, пахітенні сперматоцити в еякулятах бугаїв трапляються з частотою до 35% загальної кількості виявлених незрілих статевих клітин. Інформативною у плані дослідження мейотичних хромосом і придатною для вияву аномалій хромосом є стадія пахітени – за боковими елементами синаптонемного комплексу. Однак, через особливості каріотипу великої рогатої худоби (багаточисельність і морфологічна подібність аутосом) проведення класичного пахітенного аналізу у бугаїв має певні труднощі. На стадії пахітени синаптонемний комплекс повністю сформований в усіх бівалентах, відбувається кросинговер. Хромосомні біваленти на стадії пахітени конденсовані. Їх можна ідентифікувати за хромомірним рисунком і за СК бівалентів, тобто аналіз пахітенних бівалентів дає змогу виявити кількісні й структурні порушення.

Наступна стадія – *диплотена* – у сперматогенезі коротка, а в оогенезі вона триває роками, характерна тим, що на ній хромосоми знову конденсуються. Ця стадія змінюється стадією *діакінезу*.

Кількість клітин на стадії діакінезу невелика й ідентифікувати хромосоми на цій стадії дуже важко. При спеціальному фарбуванні можна виявити лише дуже значні хромосомні перебудови, які ведуть до зниження кількості хіазм.

Далі відбувається процес першого і другого ділень дозрівання. За ділень дозрівання порушується розходження хромосом і як наслідок – зміна їх кількості.

У метафазі I і II виявляються хромосоми, однак ідентифікація їх утруднена.

Якщо прийняти до уваги твердження про еякуляцію більшої кількості незрілих клітин сперматогенного ряду як результату блоку мейозу на окремій стадії, то таким способом можна вирахувати проблемну зону мейотичного поділу. Інакше кажучи – наявність більшої кількості мейоцитів певної стадії розвитку і є інформативним показником стадії, на якій відбувся блок мейотичного поділу. Логічно припустити, що саме в результаті блоку однієї із стадій мейозу у плідника виявиться патологія спермопродуктивності, зокрема низька концентрація сперми. Як показують наші дані, концентрація спермій є інформативним параметром, асоційованим з проявом каріотипу з абераці-

ями. У зв'язку з цим у бугаїв, які мають знижену концентрацію спермійв (брак за концентрацією), доцільно обстежити соматичний каріотип.

Цитологічний аналіз еякульованих мейоцитів дає змогу простежити стадію мейозу, де відбувається блокування сперматогенезу у бугая з проблемою низької концентрації сперми і це дає підстави вважати, що концентрація спермійв є інформативним параметром, асоційованим з проявом каріотипу з абераціями.

Таким чином, блок мейозу може бути на всіх стадіях профазі I мейозу. Зокрема, блок на стадії зиготени проявляється за повної або часткової втрати здатності до формування вісьових елементів хромосом і СК. На думку Popescu С.Ф. [30], такі порушення можуть бути проявом мутацій генів, які відповідають за формування білкових вісьових елементів і СК, а, можливо, і порушенням процесу конденсації хромосом і ДНК-білкових взаємодій.

Так, у бугая Красавчика симентальської породи (ПОП «Дружба» Чернігівської обл.) (табл. 1) кількість незрілих клітин сперматогенного ряду виявилася на порядок нижча за вищої концентрації сперми, ніж у інших досліджених бугаїв. Водночас у бугая Фанта 39032/385 із концентрацією сперми 800 млн/мл кількість клітин сперматогенного ряду було значно більшим – до 3,8%. У цьому випадку невисока концентрація сперми, вочевидь, є наслідком блоку мейозу на одній із стадій, як це пояснює Templado et al. [31].

Таблиця 1

Кількість клітин мейотичного ряду в еякулятах бугаїв
(ПОП «Дружба» Чернігівської обл.)

Кличка бугая	Концентрація сперми, млрд/мл	Рухливість спермійв, бали	Частка клітин від кількості спермійв, %	Кількість клітин на різних стадіях сперматогенезу, % загальної кількості мейоцитів			
				лепто-тена	зиготена-пахітена	інші стадії	не визначені
Красавчик 5061	1,2±0,7	8±2,1	0,00001±0,1	2,0±1,6	10,0±2,1	45,0± 2,8	43,0±3,2
Александрій 2045	1,0±0,5	8±2,0	0,0008±0,1	3,0±1,7	11,0±1,9	34,0±2,5	52,0±2,4
Фант 39032/385	0,8±0,8	7±1,5	3,8±0,5	2,5±2,0	16,0±1,6	16,5±2,5	65,0±2,9
Фараон 73	1,0±0,6	8±1,6	0,0001±0,1	2,8±1,6	9,0±1,9	30,2±2,6	58,0±2,3

Серед клітин сперматогенного ряду у бугая Фанта 39032/385 частіше, ніж у інших бугаїв, трапляються клітини на ранніх стадіях профазі мейозу, що дає підстави зробити припущення про часткове блокування мейозу у цієї тварини на стадії лептотени.

Вочевидь, інформативними у плані дослідження мейотичних хромосом можуть бути стадія зиготени – за боковими елементами синаптонемного комплексу і більшою мірою біваленти і СК на стадії пахітени.

Окрім того, співвідношення клітин, які на різних стадіях мейозу надійшли в еякулят, може бути показником тривалості цих стадій.

Найчастіше в досліджених еякулятах бугаїв траплялися клітини на стадіях лептотени (до 18%) і пахітени (до 33%). Ці дані узгоджуються з результатами досліджень клітин сперматогенного ряду в еякуляті людини [32] і є найбільш тривалими.

Найкоротшими є стадії мейотичного поділу, на яких відбувається формування сперматоцитів, тому нам не вдалося виявити їх ні в одному з еякулятів, які досліджували. Не виявили і клітин на стадіях анафази I і телофази I. Як показує Л.Ф. Курило [33], ці стадії також дуже нетривалі. Такі дані узгоджуються з результатами інших дослідників [34].

У окремих плідників було виявлено більшу кількість клітин, які неможливо було ідентифікувати, що, на нашу думку, вказує на активність дегенеративних процесів у сперматогенному епітелії.

Порушення кон'югації хромосом у зиготені (зокрема формування синаптонемного комплексу – структури, необхідної для повноцінної кон'югації гомологічних хромосом), кросинговеру в пахітені, розходження гомологічних хромосом у диплотені призводить до часткового блоку сперматогенезу на ранній стадії профазі I мейозу і селекції неповноцінних гамет. Крім того, варто зауважити, що при виникненні структурних перебудов хромосом і їх впливу на сперматогенез, можливо, має значення і ефект положення, точкові мутації, мініделеції і мінідуплікації в одній чи обох точках розриву, в які можуть бути втягнуті гени, що беруть участь у регуляції тих чи інших етапів сперматогенезу.

Одним із механізмів, що порушує проходження сперматогенезу є порушення формування синаптонемного комплексу в зиготені і ранній пахітені профазі I мейозу [35].

Нормальна кон'югація гомологічних хромосом у мейотичних клітинах передбачає ефективний кросинговер (обмін ділянками) між гомологічними хромосомами і нормальне розходження останніх в анафазі мейозу. Якщо у тварини в соматичному каріотипі є структурна аберація, зокрема, наприклад, транслокація за робертсонівським типом, то в мейозі формуються асинаптичні і гетеросинаптичні комплекси між негомологічними хромосомами та із залученням бівалента статевих хромосом. Взаємодія між гетеросинаптичними квадริвалентами і ХУ-бівалентом призводить до порушення інактивації Х-хромосоми, що сприяє синтезу продуктів певних генів. Транскрипція генів на стадії пахітени порушує мейотичний цикл і може бути причиною часткового блоку сперматогенезу тварин, які мають у соматичному каріотипі різні типи транслокаційних перебудов аутосом. Це може бути одним із пояснень причин і механізму блоку мейозу на певній стадії, внаслідок чого в еякулят надходять незрілі клітини, що зупинили свій розвиток саме на цій стадії.

З даних літератури очевидно, що профаза I мейозу є найбільш чутливою до чинників, які впливають на формування і диференціювання клітин сперматогенного ряду. Водночас із проходженням процесу формування спермій відбувається послідовна презиготична селекція клітин завдяки дії незалежних і притаманних кожній стадії сперматогенезу механізмів блоку розвитку статевих клітин [36].

Vaccetti et al. [37] на основі результатів своїх досліджень при аналізі робертсонівської транслокації 14/22, зробили припущення, що наявність транслокації призводить не лише до порушення сперматогенезу на стадії диференціювання сперматоцитів, а і впливає на формування морфологічних структур зрілого спермія. Однак не слід однозначно стверджувати, що порушення нормального формування повноцінних сперматозоїдів є наслідком саме транслокацій хромосом у соматичному каріотипі. За даними літератури, рівновірогідною причиною може бути наявність інших первинних генних дефектів, які, можливо, задіяні у створенні умов для порушення проходження сперматогенезу в нормі [38].

Як показало вивчення аномалій мейотичних хромосом у людини, найзручнішою для дослідження різних аномалій синапсису і структурних аберацій, тобто для проведення «пахітенного аналізу хромосом» є стадія пахітени [39]. Пахітенні хромосоми більш спіралізовані і розрізняються [40].

У досліджених нами еякулятах бугаїв мейоцити на стадії пахітени трапляються з частотою 16–60%. Схожі дані було отримано Martin R.V [41] при дослідженні клітин сперматогенного ряду в людини.

Проте варто відмітити, що через особливості каріотипу великої рогатої худоби (багаточисельність і морфологічна подібність аутосом) проведення класичного пахітеного аналізу у бугаїв має певні труднощі навіть з використанням диференційного забарвлення АТ-специфічним флюорохромом Хехст 33258. Хромосоми на цій стадії, окрім статевих, які формують статевий міхурець, погано піддаються ідентифікації.

До 3% виявлених сперматоцитів перебувають на стадії лептотени, вони мають виражену структуру – можна розрізнити щільні потовщення – хромоміри.

Кількість виявлених сперматоцитів на стадії діакінезу невелике і ідентифікувати хромосоми на цій стадії дуже важко. Хромосоми на цій стадії дуже конденсовані, їх довжина, за даними Lewis-Jones I. et al. [42] не перевищує 2–3 мкм. При спеціальному фарбуванні можна виявити лише дуже значні хромосомні перебудови, що призводять до зниження кількості хіазм, і явище повного чи часткового десинапсису, які проявляються у зниженні кількості хіазм. Окрім того, відносна кількість клітин на цих стадіях в еякулятах бугаїв дуже невисока – до 0,5%. У багатьох тварин їх взагалі не вдалося виявити, а у бугая зі зниженою концентрацією сперми (Фант 39032/385) частка таких клітин становила 2,2%.

1.5. АНАЛІЗ СИНАПТОНЕМНИХ КОМПЛЕКСІВ

Безпосереднє вивчення взаємозв'язку процесів кон'югації, розподілу хіазм і нерозходження хромосом являє собою метод аналізу синаптонемних комплексів (СК). Останній є обов'язковим структурним елементом бівалентів на стадії пахітени [43].

Функціями СК є забезпечення кон'югації гомологічних хромосом у профазі I та іункція матриці для коректних міжхромосомних обмінів [44]. Донині детально не досліджено яким чином СК виконує ці функції. Проте СК визнається своєрідним скелетом мейотичної хромосоми, а його перетворення – відображенням поведінки гомологів у профазі I мейозу. Детально вивчені особливості формування осьових елементів СК на стадії лептотени, початок їх зближення і синапсису на стадії зиготени, синапсис і його корекція на стадії пахітени, а також десинапсис хромосом на стадії диплотени [45, 46].

Основний метод аналізу СК полягає у розпластанні мейотичних клітин на поверхні гіпотонічного розчину з наступним контрастуванням структур СК і його аналізом за допомогою світлового або електронного мікроскопа.

Завдяки збігу морфометричних характеристик більшості СК і відповідних їм метафазних хромосом є можливим їх ранжування СК у вигляді ідеограм [47].

Трудомісткість і потреба в електронній мікроскопії для детального аналізу СК не дають змоги впровадити цей метод у практику не лише для цитологічного дослідження сільськогосподарських тварин, а й для медико-генетичного дослідження людей. Водночас можливість аналізу СК для встановлення причин порушень сперматогенезу переконливо доведено в роботах багатьох дослідників [48–51].

Установлено, що аси- і десинаптичні аномалії СК асоційовані зі збільшенням частоти гетероплоїдних сперматозоїдів [52, 53] і навіть з повним блоком сперматогенезу [54, 55].

Очевидно, що виявлення мейотичних аномалій при аналізі СК важливо для пошуку специфічних чинників, що впливають на ключові події мейозу. Однак значні труднощі в організації таких досліджень істотно знижують практичну інформативність аналізу СК.

1.6. АНАЛІЗ ХРОМОСОМНИХ НАБОРІВ СПЕРМАТОЗОЇДІВ

Найточнішою оцінкою частоти і спектра хромосомних аномалій, що виникають у мейозі, є дослідження хромосомного набору зрілих гамет. Як відомо, хроматин у головці сперматозоїда упакований дуже щільно, і візуалізація окремих хромосом можлива тільки після запліднення. Донині не відомі способи цитохімічної обробки сперматозоїдів, яка дала б змогу отримувати в умовах *in vitro* препарати з розпластаними хромосомами, придатними для цитогенетичного аналізу.

Для подолання цієї перепони використовують кілька підходів.

1.6.1. Метод гетерологічного запліднення

Одним із об'єктивних методів, що дають змогу проводити прямий аналіз хромосомного набору сперматозоїдів ссавців, зокрема бугая, ґрунтується на заплідненні *in vitro* звільнених від оболонки яйцеклітин золотистого хом'ячка сперматозоїдами бугая і наступній візуалізації хромосом чоловічого пронуклеуса [56, 57].

Після обробки запліднених яйцеклітин колхіцином через 12–14 год препарати фіксують і диференціально фарбують.

За допомогою цього методу можливо встановити низку важливих відомостей про частоту і спектр аномалій хромосом у мейозі в нормі, а також про вплив різних чинників на сперматогенез.

Трудомісткість, висока собівартість, необхідність значних матеріальних затрат істотно лімітують можливість широкого використання методу гетерологічного запліднення.

Новий імпульс дослідженням у цьому напрямі може дати метод мікроін'єкції сперматозоїдів плідника в яйцеклітину – метод ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection). Розроблений з метою лікування безпліддя людини цей метод можна застосувати і для дослідження хромосом чоловічого пронуклеуса після запліднення, здійсненого завдяки ін'єкції сперматозоїда плідника безпосередньо в яйцеклітину лабораторної миші [58, 59].

Метод унеможливорює селекцію сперматозоїдів за їх запліднювальною здатністю, що підвищує вірогідність детекції хромосомних аномалій.

1.6.2. Метод FISH

Відносно новим прямим методом аналізу кількісних хромосомних аномалій у зрілих сперматозоїдах ссавців є метод гібридизації *in situ*. Переваги методу полягають у швидкості аналізу і масштабності досліджень.

Однак його можливості обмежені реєстрацією кількісних аберацій окремих хромосом чи їх локусів, які маркуються ДНК-зондами. Спроби вивчити структурні аберації не мали успіху. Зазвичай використовується мультиплексна (дво-, триколірна) FISH з прицентромерними ДНК-зондами, яка дає змогу відрізнити істинну дисомію за якоюсь хромосомою від диплоїдії [60].

Істотне значення для FISH-аналізу сперматозоїдів мають як способи підготовки препаратів (деконденсація хроматину в головці спермія), так і умови проведення гібридизації. Для підвищення ефективності гібридизації розроблені різні варіанти деконденсації хроматину [61–63].

Отже, сучасні цитогенетичні методи досліджень, доповнені за необхідності методами ДНК-аналізу, дають можливість проводити ви-

вчення геномних і хромосомних мутацій на різних етапах сперматогенезу ссавців і достатньо точно встановлювати механізми їх виникнення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Dyban A.P., Baranov V.S. (1987). Cytogenetics of mammalian embryonic development. Oxford: Clarendon Press. 362 p.
2. Кулешов Н.П. Частота возникновения и судьба хромосомных аномалий популяции человека: дис. ... д-ра биол. наук. Москва, 1979. 301 с.
3. Popescu C.F. (1971). Les chromosomes meiotiques du eueuf (*Bos taurus*). *Ann. Genet. Sci. Anim.* 3: 125–143.
4. Templado C., Merquez C., Munne S. (1996). An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenetic and Cell Genetics*. 74: 196–200.
5. Switonski M., Gustavsson I., Ploen L. (1987). The nature of the 1; 29 translocation in cattle as revealed by synaptonemal complex analysis using electron microscopy. *Cytogenet. Cell Genet.* 44: 103–111.
6. Райцина С.С. Гормональный контроль сперматогенеза у млекопитающих. *Сперматогенез и его регуляция*; под ред. Л.О. Даниловой. Москва: Наука, 1983. С. 3–61.
7. Raytsina S.S. (1983). *Hormonal control of spermatogenesis in mammals. Spermatogenesis and its regulation*. Ed. L.O. Danilova. Moscow: Nauka, P. 3–61.
8. Курило Л.Ф., Штаут М.И. Генетические и эпигенетические механизмы регуляции, хронология и динамика сперматогенеза у млекопитающих. *Андрология и генитальная хирургия*. 2015. № 1. С. 31–40.
9. Kurilo L.F., Shtaut M.I. (2015). Genetic and epigenetic mechanisms of regulation, chronology and dynamics of spermatogenesis of mammals. *Andrologiya i genitalnaya khirurgiya Andrology and Genital Surgery*. 16(1):31–40.
10. Кузнецова Т.В., Родионов А.В., Ежова Л.И. Цитогенетический анализ клеток сперматогенного ряда у быков. 1 Всесоюз. конф. по цитогенетике с.-х. животных. Москва, 1985. С. 53–54.
11. Sperling K., Kaden R., Sperling K. (1971). Meiotic studies of the ejaculated seminal fluid of humans with normal sperm count and oligospermia. *Nature*. 232: 481.

12. *Templado C., Marina S., Egozque J.* (1976). Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man. *Andrologia*. 8: 285–289.
13. *Кузнецова Т.В., Родионов А.В., Яковлев А.Ф.* Мейотические хромосомы эякулированных сперматозитов быков. *Цитология*. 1990. Т. 32, № 2. С. 181–187.
14. *Курило Л.Ф., Любашеская И.А., Дубинская В.П., Гаева Т.Н.* Карриологический анализ состава незрелых половых клеток эякулята. *Урология и нефрология*. 1993. № 2. С. 45–47.
15. *Evans H.J., Bucton K., Sumner A.T.* (1973). Cytological mapping of human chromosomes. Results obtained with quinacrine fluorescence and acetic-saline-Giemsa techniques. *Chromosoma*. 35: 310–325.
16. *Templado C., Vidal F., Navarro J., Egozcue J.* (1986). Improved technique for the study of the meiosis in ejaculates: results of the first 50 consecutive cases. *Human Genet.* 72: 275–277.
17. *Дыбан А.П.* Метод приготовления мейотических и митотических хромосом из семенников млекопитающих. *Цитология*. 1970. Т. XII. № 5. С. 687–689.
18. *Palermo G., Colombero L., Hariprashad J., Schlegel P., Rosenwaks Z.* (2002). Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing ICSI. *Hum Reprod.* 17: 570–575.
19. *Tres L.L., Erickson R.P.* (1982). Electron microscopy of t-allele synaptonemal complex discloses no inversions. *Chromosoma*. 84: 457.
20. *Holm P.B., Rasmussen S.W., Wettstein D.* (1992). Ultrastructural characterization of meiotic prophase. A tool in the assessment of radiation damage in man. *Mutat. Res.* 95: 45–59.
21. *Moses M.J., Statton G.H., Gambling T.M., Starmer C.F.* (1977). Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). III. Quantitative evaluation. *Chromosoma*. 60: 345.
22. *Holm P.B., Rasmussen S.W., Wettstein D.* (1992). Ultrastructural characterization of meiotic prophase. A tool in the assessment of radiation damage in man. *Mutat. Res.* 95: 45–59.
23. *Pathak S., Kinffner N.* (1979). Sterility in hybrid cattle. *Cytogen. Genet.* 24: 52.
24. *Allen J.W., Gibson J.B., Pooman P.A.* (1988). Synaptonemal complex damage induced by clastogenic and antimitotic chemicals: implications for non-disjunction and aneuploidy. *Mutat. Res.* 201. 2: 313–324.
25. *Forejet J.* (1984). X-inactivation and its role in male sterility. *Chromosomes Today*. 8: 17–30.

26. Хвостова В.В., Ячевская Г.Л. Перестройки хромосом в мейозе. *Цитология и генетика мейоза*. Москва: Наука, 1975. С. 232–262.
27. Кикнадзе И.И., Высоцкая Л.В. Микроскопическая морфология мейоза и его модификаций. *Цитология и генетика мейоза*; под ред. В.В. Хвостовой, Ю.Ф. Богданова. Москва: Наука, 1975. С. 15–41.
28. Miro R. [et al.]. (1980). Balanced translocation (10; 13) in a father, ascertained through the study of meiosis in semen, and partial trisomy 10q in his son. *Hum. Genet.* 53. 2: 179–182.
29. Templado C., Merquez C., Munne S. (1996). An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 74: 196–200.
30. Vidal P., Templado C., Navarro K., Egozcue J. (1982). Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males. *Human. Genet.* 60: 301–304.
31. Popescu C.F. (1978). A study of meiotic chromosomes in bulls carrying the 1/29 translocation. *Ann. biol. anim. biochim. biophys.* 18. 213: 383–389.
32. Templado C., Vidal F., Navarro J., Egozcue J. (1986). Improved technique for the study of the meiosis in ejaculates: results of the first 50 consecutive cases. *Human Genet.* 72: 275–277.
33. Курило Л.Ф., Штаут М.И. Генетические и эпигенетические механизмы регуляции, хронология и динамика сперматогенеза у млекопитающих. *Андрология и генитальная хирургия*. 2015. № 1. С. 31–40. doi: 10.17650/2070-9781-2015-1-31-40
34. Курило Л.Ф., Андреева М.В., Коломиец О.Л. и др. Генетические синдромы с нарушениями развития органов половой системы. *Андрология и генитальная хирургия*. 2013. № 4. С. 17–27.
35. Diemer T., Desjardins C. (1999). Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 5. 2: 120–140.
36. Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Е.В. Мхитарова и др. Структура наследственной патологии половой системы при обследовании пациентов с нарушением репродукции. *Медико-генетическое консультирование в профилактике наследственных болезней*: Рос. науч.-практ. конф.: тез. докл. Москва, 1997. С. 154–155.
37. Коломиец О.Л. СК – как индикатор хромосомной изменчивости: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: спец. 03. 00.15. Генетика. Москва, 1998. 61 с.

38. *Baccetti B., Capitanì S., Collodel G.* (2002). Infertile spermatozoa in a human carrier of robertsonian translocation 14; 22. *Fertil. Steril.* 78. 5: 1127–1130.
39. *Jose Luis Quintana de la Rosa, Avila Cavazos R. et al.* (2001). Chromosomal translocation 3;22 in an infertile man. *Fertil. Steril.* 75. 6: 1222–1223.
40. *Palermo G., Colombero L., Hariprashad J. et al.* (2002). Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing ICSI. *Hum Reprod.* 17: 570–575.
41. *Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л.* Кариотипирование на основе синаптонемных комплексов и применение этого метода в цитогенетике. *Генетика.* 1985. Т. 21. № 15. С. 793–802.
42. *Martin R.* (1990). Chromosomal analysis of human spermatozoa *J. of In Vitro Fert. a Embr. Transf.* 7. 4: 196.
43. *Lewis-Jones I., Aziz N., Seshadri S. et al.* (2003). Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertil. Steril.* 79: 212–215.
44. *Loidl J.* (1994). Cytological aspects of meiotic recombination. *Experientia.* 50. 3: 285–294.
45. *Heyting C.* (1996). Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8. 3: 389–396.
46. *Коломиец О.Л.* Синаптонемный комплекс как индикатор хромосомной изменчивости: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Москва, 1998. 60 с.
47. *Carpenter A.T.C.* (1994). The recombination nodule story – seeing what you are looking at. *Bioessays.* 16: 69–74.
48. *Solari A.J.* (1980). Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma.* 81. 3: 315–337.
49. *Templado C. [et al.].* (1981). A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. *Hum. Genet.* 59. 4: 345–348.
50. *Navarro J. [et al.].* (1986.) A new synaptic anomaly: irregular synaptonemal complexes. *Hum. Genet.* 72. 3: 272–274.
51. *Lange R., Krause W., Engel W.* (1997). Analyses of meiotic chromosomes in testicular biopsies of infertile patients. *Hum. Reprod.* 12. 10: 2154–2158.
52. *Vidal F. [et al.].* (1982). Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males. *Hum. Genet.* 60. 1: 301–304.

53. Bernardini L. [et al.]. (1997). Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by in situ hybridization. *Mol. Hum. Reprod.* 3. 5: 431–438.

54. Pang M.G. [et al.]. (1999). Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescent in situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 14. 5: 1266–1273.

55. Hulten M., Eliasson R., Tillinger K.G. (1970). Low chiasmata count and other meiotic irregularities in two infertile 46, XY men with spermatogenic arrest. *Hereditas.* 65. 2: 285–290.

56. Egozcue J. [et al.]. (1983). Meiotic studies in series of 1100 infertile males. *Hum. Genet.* 65. 2: 185–188.

57. Martin R.H. (1983). Detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes. *Cytogen. Cell Genet.* 35. 4: 252–256.

58. Rudak E., Jacobs P.A., Yanagimachi R. (1978). Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature.* 274. 5674: 911–913.

59. Федорова И.Д. и др. Цитогенетический анализ сперматозоидов человека с использованием внутрицитоплазматической инъекции в ооциты мыши. *Генетика.* 2005. Т. 41. № 3. С. 310–317.

60. Rybouchkin A. [et al.]. (1995). Intracytoplasmic sperm injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of the human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 10. 5: 130–1135.

61. Spriggs E.L., Rademaker A.W., Martin R.H. (1995). Aneuploidy in human sperm: result of two- and three-colour fluorescence in situ hybridisation using centromeric probes for chromosomes 1, 12, 15, 18, X and Y. *Cytogenet. Cell Genet.* 71. 1: 47–53.

62. Bischoff F.Z., Nguyen D.D., Burt K.J. [et al.]. (1994). Estimate of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenet. Cell Genet.* 66. 4: 237–243.

63. Holms J.M., Martin K.H. (1993). Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.* 91. 1: 20–24.

64. Mercier S., Bresson J.L. (1997). Analysis of chromosome equipment in spermatozoa of a 46, XY/47, XY/ + 8 male by means of multicolour fluorescence in situ hybridization: confirmation of a mosaicism and evaluation of risk for offspring. *Hum. Genet.* 99. 1: 42–46

Розділ 2

ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ І МІКРОЕВОЛЮЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА МОНОЛОКУСНИМИ ТА МУЛЬТИЛОКУСНИМИ ДІЛЯНКАМИ ДНК У РІЗНИХ ВИДІВ СВІЙСЬКИХ ТВАРИН

Молекулярно-генетичні методи, зокрема аналіз гіперваріабельних судин гена, таких як мікросателіти, стали незамінними інструментами. Вони можуть вирішувати як теоретичні (визначення філогенетичних зв'язків), так і практичні завдання (ідентифікація мікроорганізмів, судові експертизи, селекція та паспортизація тварин і рослин) завдяки своїй високій інформативності та відтворюваності результатів.

2.1. ПРОВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

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°C . Наступне транспортування здійснюється в замороженому стані.

Сперма відбирається в одноразові стерильні пробірки або пасти. 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 5×5 мм при температурі 4°C 3–4 доби, у замороженому стані -20°C і нижче – необмежений.

Під час відбору кожен 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.

Виділення ДНК проводять за використання стандартних наборів для виділення ДНК, відповідно до протоколу виробника.

Обладнання для проведення ПЛР: ампліфікатор (термоциклер); 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, суміш чотирьох дезоксинуклеотид-трифосфатів; праймер, високоочищену (деіонізовану) воду. Реактиви поставляються у готовому вигляді фірмами-виробниками.

Електрофоретичне розділення ISSR-маркерів проводять в 2%, 4% агарозному гелях у тріс-боратному 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% ксилолціанол, 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 їх наступною 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».

2.2. ПРОВЕДЕННЯ МІКРОСАТЕЛІТНОГО АНАЛІЗУ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВІД ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ

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 генетичної структури та достовірності походження тварин і 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) з використанням, наприклад, наступного обладнання: програмований термостат (ампліфікатор) Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cyclor (Applied Biosystems, США), твердотільний термостат типу «Dray-block», $t = 95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; УФ-бокс для ПЛР UVC/T (Biosan, Латвія); центрифуга Eppendorff 5715R (Eppendorff, Німеччина); стерильна ламінарна шафа 2-го кл.захисту, БАВп-01- «Ламінар-С»-1,2; мікрозмішувач «Vortex»; магнітний змішувач з підігрівом ІКА RH basic2 (ІКА-WE3RKE, Germany); SpeedVac Concentrator DNA 120 (Therma); набір дозаторів піпеточних змінного об'єму від 0,5 до 200 мкл відповідно до ДСТУ ISO 9001 (Eppendorff, Німеччина); пробірки пластикові одноразові для ПЛР ємністю 0,2–0,5 мл відповідно до ДСТУ ISO 9001 (Eppendorff, Німеччина); одноразові наконечники для ПЛР ємністю 0,2–1,0 мл відповідно до ДСТУ ISO 9001 (Eppendorff, Німеччина); реакційні планшети на 96 лунок, типу «Microamp» (Applied Biosystems, США); транслюмінатор ТМ 36 LCF 900 122 V (UVP, США); спектрофотометр СФ – 46; камери для горизонтального гелі-електрофорезу; блок живлення (джерело постійного струму $300 \pm 10\text{В}$), «Б-5-50»; холодильна камера на (-20°C) , «NORD»; ваги «ОНАУС»; термостати «ТС – 80М-2» на $28\text{--}60^{\circ}\text{C}$; магнітна мішалка МН; лабораторний посуд (колби 25–1000 мл, мірні стакани об'ємом 25–1000 мл).

2.2.1. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у великої рогатої худоби (*Bos Taurus*)

Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК, наприклад, (табл. 1).

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонуклеотидні послідовності праймерів (табл. 2).

Таблиця. 1

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації великої рогатої худоби

Локус	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п. н.	Структура мікросателітної послідовності
TGLA126	D20S1	111–127	(TG) _n
TGLA122	D21S6	136–182	(AC) _n (AT) _n
INRA023	D3S10	201–225	(AC) _n
ETH003	D19S2	100–128	(GT) _n AC(GT) ₆
ETH225	D9S2	139–157	(TG) ₄ CG(TG)(CA) _n
BM1824	D1S34	176–188	(GT) _n
TGLA227	D18S1	76–104	(TG) _n
BM2113	D2S26	124–146	(CA) _n
ETH10	D5S3	206–222	(AC) _n
SPS115	D15	247–261	(CA) _n TA(CA) ₆

Таблиця 2

Послідовності праймерів для дослідження

Локус	Послідовність праймерів		Барвник
TGLA126	F: R:	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT TTGGTCCTCTATTCTCTGAATATTCC	TAMRA
TGLA122	F: R:	AATCACATGGCAAATAAGTACATAC CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC	R6G
INRA023	F: R:	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTC	TAMRA
ETH003	F: R:	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	R6G
ETH225	F: R:	GATCACCTTGCCACTATTTCCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	R6G
BM1824	F: R:	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	R6G
TGLA227	F: R:	GGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	FAM
BM2113	F: R:	GCTGCCTTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	FAM
ETH10	F: R:	G TTCAGGACTGGCCCTGCTAACA CCTCCAGCCCACCTTTCTCTTCTC	FAM
SPS115	F: R:	AAAGTGACACAACAGCTTCACCAG AACCGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG	FAM

Порядок проведення.

1. Відбирають і маркірують необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 мл;
2. По 10 мкл готової реакційної суміші (табл. 3) розносять в чисті пробірки;
3. Використовуючи накінецьник для дозатора з аерозольним фільтром додють по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;
4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 4.);
5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та переносять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 3

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5x blue 1,5мМ Mg ²⁺ кат № R4-1-В	3,00
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 1.76 мМ кат № R3-1	1,5
3.	Taq-polymerase 5 U/мкл кат № R1-3	0,25
4.	Суміш праймерів	2,75
5.	Деіонізована вода	1,50
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		10,0

Таблиця 4

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °С	Час	Кількість циклів
95	10 хв	1
95	45с	35
60	45с	
72	60 с	
72	60 хв	1
25	120 хв	1
4	Зберігання	

Проведення фрагментного аналізу (для всіх видів).

Після закінчення реакції пробірки переміщують в зону для проведення аналізу результатів на генетичному аналізаторі.

Порядок роботи.

1. Ампліфіковану ДНК готують до проведення аналізу на ABI Prism генетичному аналізаторі;

2. Готують суміш з 1 мкл ПЛР-зразку, 20,0 мкл Hi-Di™ формаміду (Sigma, США), 0,5 мкл GeneScan-500 LIZ™ стандарту (Applied Biosystems, США);

3. Суміш ретельно перемішують на вортексі і струшують краплі зі стінок пробірки центрифугуванням за 5 тис. об/хв протягом 15 с;

4. Зразки 2 хв денатурують за 94°C, після цього витримують 3 хв за 0°C;

5. Зразки переносять в реакційну планшету на 96 лунок у відповідні лунки;

6. Планшету поміщують у ABI Prism генетичний аналізатор і виконують аналіз згідно інструкції виробника.

Визначення розмірів алелів здійснюють за допомогою програмного забезпечення «GeneMapper 3.7» (Applied Biosystems, США) із використанням розмірного стандарту GeneScan-500 LIZ™ стандарту (Applied Biosystems, США).

В процесі проведення капілярного електрофорезу досліджуваних зразків комп'ютерна програма «Genescan» (Applied Biosystems, США) визначає розмір флюоресцентно мічених ПЛР-продуктів (у парах нуклеотидів) і зберігає отримані дані. Потім збережені дані експортують в комп'ютерну програму GeneMapper (Applied Biosystems, США) для проведення генотипування.

Результати програмного опрацювання можуть бути надані у графічному вигляді (карта піків, з вказівкою розмірів фрагментів і відносною інтенсивністю піків) (рис. 1).

Результатом успішної ампліфікації алелю є основний пік, що асоціюється з цілою низкою додаткових піків меншої інтенсивності, що отримуються в результаті так званого «ковзання» полімерази. Кількість основних піків залежить від кількості алелів даного локусу в геномі досліджуваної тварини. Якщо кількість піків один – гомозигота, якщо два основних піки – гетерозигота.

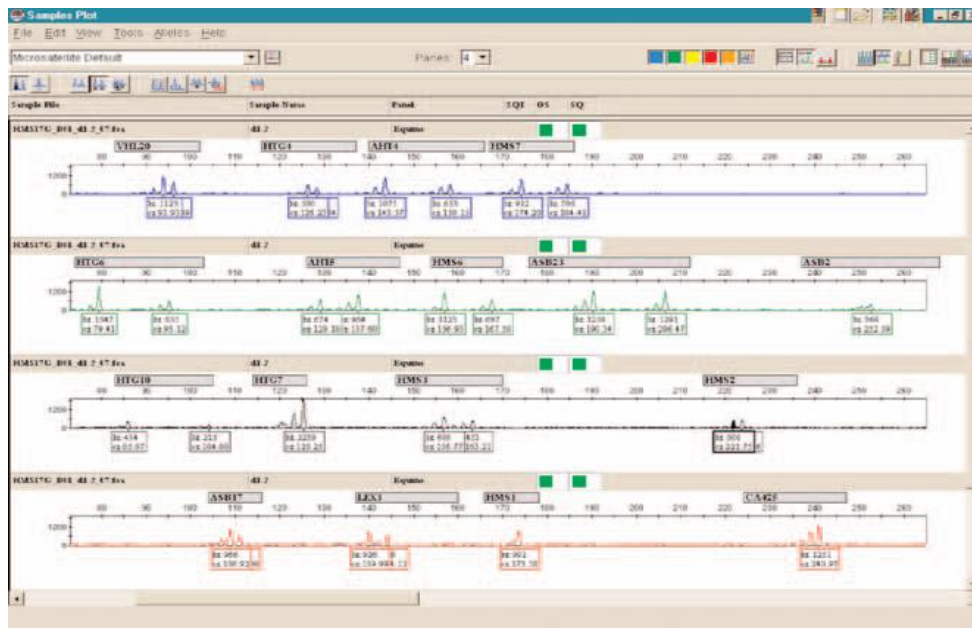


Рис. 1. Результат програмного опрацювання у графічному вигляді.

З метою розробки ефективної системи генотипування за SSR-маркерами та дослідження ДНК-структури порід різних видів ми пропонуємо проведення мультиплексного ампліфікування генотипів за комплексом мікросателітних маркерів, що дозволяє оптимізувати процес аналізу. Для створення мультиплексу враховувалося розміри мікросателітних локусів, що були обрані для типування генотипів тварин, барвник, яким позначено маркер, та співвідношення GC складу. Врахувавши ці показники нами розроблено та відпрацьовано наступні мультиплексні поєднання:

- велика рогата худоба (*Bos Taurus*) – 3 мультиплексні комбінації:

1. TGLA227, BM2113, TGLA122, ETH003;
2. TGLA126, INRA023;
3. ETH225, BM1824;

- коні (*Equus caballus*) – 4 мультиплексні комбінації:

1. HTG04, HMS06, HTG06;
2. ANH04, HTG07, ASB23;
3. VHL20, CA425, HMS03;
4. HMS07; ASB17;

- собаки (*Canis familiaris*) – 2 мультиплексні комбінації:

1. PEZ01, PEZ06, PEZ08;
2. FHC2010, FHC2054

- свійська курка (*Gallus domesticus*) – 2 мультиплексні комбінації:

1. ADL0268, MCW0248, MCW0216;
2. ADL0278, LEI0094.

2.2.2. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у коней (*Equus caballus*)

Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК, наприклад, (табл. 5).

Таблиця 5

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації коней

Назва локусу	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п. н.	Структура мікросателітної послідовності
HTG04	9	127–139	(TG) _n AT(AG) ₅ AAG(GA) ₅ ACAG(AGGG) ₃
HMS06	4	151–169	(GT) _n
АНТ04	24q14	144–164	(AC) _n AT(AC) _n
ASB23	3q22.1-q22	128–154	(TG) _n and (TG) _n TT(TG) ₄
HTG07	4	118–128	(TG) ₁₉
HTG06	15q26-q27	84–102	(TG) _n
CA425	28q18	226–246	(GT) _n
VHL20	30	87–105	(TG) ₁₇
HMS03	9	148–170	(TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n and (TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n GA(CA) ₅
HMS07	1q25	165–185	(AC) ₂ (CA) _n
ASB17	2q14p15	87–129	(AC) _n

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонуклеотидні послідовності праймерів (табл. 6).

Порядок проведення.

1. Відбирають і маркують необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 мл;
2. По 15 мкл готової реакційної суміші (табл. 7) розносять в чисті пробірки;
3. Використовуючи накінецьник для дозатора з аерозольним фільтром додають по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;
4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 8.);
5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та переносять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 6

Послідовності праймерів для дослідження

Назва локусу		Послідовність праймерів	Барвник
HTG04	F:	CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC	FAM
	R:	CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	
HMS06	F:	GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG	R6G
	R:	CTCCATCTTGTGAAGTGTAACCTCA	
HTG06	F:	CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT	R6G
	R:	GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT	
ATH04	F:	AACCGCCTGAGCAAGGAAGT	FAM
	R:	GCTCCCAGAGAGTTTACCCT	
ASB23	F:	GCAAGGATGAAGAGGGCAGC	R6G
	R:	CGTGTGGGTAGATGAGAAGTC	
ASB17	F:	ACCAGTCAGGATCTCCACCG	TAMRA
	R:	GAGGGCGGTACCTTTGTACC	
CA425	F:	AGCTGCCTCGTTAATTCA	R6G
	R:	CTCATGTCCGCTTGTCTC	
HTG07	F:	CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG	TAMRA
	R:	ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	
HMS03	F:	CCATCCTCACTTTTTCCTTTGTT	TAMRA
	R:	CCAACCTCTTTGCACATAACAAGA	
VHL20	F:	CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG	FAM
	R:	AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	
HMS07	F:	CAGGAAACTCATGTTGATACCATC	FAM
	R:	TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	

Таблиця 7

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5x blue 1,5мМ Mg ²⁺ кат № R4-1-B	2,5
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 1.76 мМ кат № R3-1	4,0
3.	Taq-polymerase 5 U/мкл кат № R1-3	0,5
4.	Суміш праймерів, по 5рМ/мкл кожного	4,0
5.	Деіонізована вода	3,0
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		15,0

Таблиця 8

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °C	Час	Кількість циклів
95	10 хв	1
95	30с	30
60	30с	
72	60 с	
72	90 хв	1
4	Зберігання	

Проведення фрагментного аналізу відповідно до 1.2.1.

2.2.3. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у собак (*Canis familiaris*)

Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК, наприклад, (табл. 9).

Таблиця 9

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації собак

Назва локусу	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п.н.	Структура мікросателітної послідовності
PEZ01	CFA8	92–136	TACA
PEZ06	CFA16	164–216	(GAAA) _n
PEZ08	CFA17	215–257	AAAG-
FHC2010	CFA24	208–260	(ATGA) _n
FHC2054	CFA12	131–183	(GATA) _n

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонуклеотидні послідовності праймерів (табл. 10).

Таблиця 10

Послідовності праймерів для дослідження

Назва локусу	Послідовність праймерів		Барвник
PEZ01	F: R:	GGCTGTCACTTTTCCCTTTC CACCACAATCTCTCTCATAAATAC	FAM
PEZ06	F: R:	ATGAGCACTGGGTGTTATAC ACACAATTGCATTGTCAAAC	FAM
PEZ08	F: R:	TATCGACTTTATCACTGTGG ATGGAGCCTCATGTCTCATC	FAM
FHC2010	F: R:	AAATGGAACAGTTGAGC ATGCCCCCTTACAGCTTCATTTTCC	FAM
FHC2054	F: R:	GCCTTATTTCATTGCAGTTAGGG ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC	FAM

Порядок проведення.

1. Відбирають і маркують необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 мл;
2. По 9 мкл готової реакційної суміші розносять в чисті пробірки (табл. 11);
3. Використовуючи накінецьник для дозатора з аерозольним фільтром додають по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;
4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 12.);
5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та переносять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 11

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5x blue 15мМ Mg ²⁺ кат № R4-1-B	2,00
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 2 мМ кат № R3-1	0,50
3.	Taq-polymerase 1,5 U/мкл кат № R1-3	0,15
4.	Суміш праймерів, по 5рМ/мкл кожного	1,0
5.	Деіонізована вода	4,35
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		10,0

Таблиця 12

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °С	Час	Кількість циклів
94	4 хв	1
94	15с	35
60	15с	
72	25 с	
72	5 хв	1
4	Зберігання	

Проведення фрагментного аналізу відповідно до 1.2.1.

2.2.4. Визначення генотипу тварин за монолокусними ділянками ДНК (STR-локусами) у свійської курки (*Gallus domesticus*)

Постановка ПЛР. Аналіз проводять за різними мікросателітними локусами ДНК, наприклад, (табл. 13).

Для проведення ампліфікації використовують послідовності праймерів до мікросателітних локусів, які містять відповідний мікросателіт. Олігонуклеотидні послідовності праймерів (табл. 14).

Таблиця 13

Мікросателітні ДНК-локуси для ідентифікації свійської курки

Назва маркера	Локалізація в геномі	Розмір алелів, п.н.	Структура мікросателітної послідовності
ADL0268	1	127–139	(GT) ₁₂
ADL0278	8	108–122	(TG) ₁₈
MCW0248	1	215–223	(AC) ₉
LEI0094	4	259–283	(AC) ₁₆
MCW0216	13	141–145	(GT) ₉

Таблиця 14

Послідовності праймерів для дослідження

Назва локусу	Послідовність праймерів		Барвник
ADL0268	F: R:	CTCCACCCCTCTCAGAACTA CAACTTCCCATCTACCTACT	FAM
ADL0278	F: R:	CCAGCAGTCTACCTTCCTAT TGTCATCCAAGAACAGTGTG	FAM
MCW0248	F: R:	GTTGTTCAAAAGAAGATGCAG TTGCATTAACCTGGGCACTTTC	FAM
LEI0094	F: R:	GATCTCACCAGTATGAGCTGC TCTCACACTGTAACACAGTGC	FAM
MCW0216	F: R:	GGGTTTTACAGGATGGGACG AGTTTCACTCCCAGGGCTCG	FAM

Порядок проведення.

1. Відбирають і маркірують необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 мл;
2. По 9 мкл готової реакційної суміші (табл. 15) розносять в чисті пробірки;
3. Використовуючи накінецьник для дозатора з аерозольним фільтром додають по 1 мкл ДНК зразків в пробірки з реакційною сумішшю;
4. Вмикають ампліфікатор згідно інструкції до приладу і задають параметри ампліфікації (табл. 16);
5. Після закінчення реакції пробірки охолоджують до +4 С та переносять для проведення аналізу результатів до генетичного аналізатора.

Таблиця 15

Склад ПЛР-суміші

№ п/п	Компонент суміші	На 1 реакцію, (мкл)
1.	ПЛР-буфер 5x blue 15mM Mg ²⁺ кат № R4-1-B	2,0
2.	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) 2 mM кат № R3-1	1,0
3.	Taq-polymerase 5 U/мкл кат № R1-3	0,15
4.	Суміш праймерів	2,5
5.	Деіонізована вода	1,85
6.	ДНК матриця	1,0
Всього		10,0

Таблиця 16

Умови та параметри ампліфікації

Температура, °C	Час	Кількість циклів
94	4 хв	1
94	15с	35
60	15с	
72	25 с	
72	5 хв	1
4	Зберігання	

Проведення фрагментного аналізу відповідно до 1.2.1.

2.3. ДОСЛІДЖЕННЯ МУЛЬТИЛОКУСНИХ (МІЖМІКРОСАТЕЛІТНИХ) ДІЛЯНОК ДНК У ПРЕДСТАВНИКІВ РІЗНИХ ВИДІВ

2.3.1. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у великої рогатої худоби (*Bos Taurus*)

Генотипування тварин за ISSR-маркерами проводять методом ISSR-ПЛР з використанням в якості праймерів мікросателітних локусів, при цьому відбувається ампліфікація ДНК-фрагментів, розташованих між інвертованими послідовностями мікросателітних локусів. В аналіз включають амплікони (фрагменти), які стабільно відтворюються не менш ніж у трьох повторях процедури ампліфікації.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі ми використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл:

H₂O – 3,0 мкл,

5x буфер (67 мМ Трис-HCl (pH 8,3), 17 мМ (NH₄)₂ SO₂, 2,5 мМ MgCl₂, 0,1% Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8% гліцерин) – 1,0 мкл;

10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл;

праймер (70 нг) – 0,8 мкл;

Тaq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл;

ДНК 50-100 нг – 4,0 мкл.

Режим проведення ПЛР:

При використанні в якості праймерів фрагментів тринуклеотидних повторів мікросателітних локусів (GAG)₆C, та (ACC)₆G:

початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

30 циклів:

денатурація – 95°C – 30 с;

відпал праймерів – 64°C – 30 с;

синтез – 72°C – 1 хв;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів динуклеотидних повторів (GA)₉C та (AG)₉C

початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

30 циклів:

денатурація – 95°C – 30 с;

випал праймерів – 57°C – 30 с;

синтез – 72°C – 1 хв;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2% агарозному гелі методом електрофорезу в 1 × TBE-буфері. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

2.3.2. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у кіз (*Capra aegagrus hircus*)

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл:

H₂O – 3,0 мкл,

5x буфер (67 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 17 мМ (NH₄)₂ SO₂, 2,5 мМ MgCl₂, 0,1% Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8% гліцерин) – 1,0 мкл;

10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл;

праймер (70 нг) – 0,8 мкл;

Тaq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл;

ДНК 50-100 нг – 4,0 мкл.

Режим проведення ПЛР:

При використанні в якості праймерів фрагментів тринуклеотидних повторів мікросателітних локусів (GAG)₆C, (CTC)₆C та (ACC)₆G:

початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

30 циклів:

денатурація – 95°C – 30 сек ;

випал праймерів – 64°C – 30 сек;

синтез – 72°C – 1 хв;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів динуклеотидних повторів (GA)₉C та (AG)₉C

початкова денатурація – 2 хв. При 95°C;

30 циклів:

денатурація – 95°C – 30 с;

випал праймерів – 57°C – 30 с;

синтез – 72°C – 1 хв;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів повторів (GA)₆CC та (AG)₈CA

початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

30 циклів:

денатурація – 95°C – 30 с;

випал праймерів – 54°C – 30 с;
синтез – 72°C – 1 хв;
термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймера повтору (AG)₈CG
початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

30 циклів:

денатурація – 95°C – 30 с;
випал праймерів – 56°C – 30 с;
синтез – 72°C – 1 хв;
термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2 % агарозному гелі методом електрофорезу в 1 × TBE-буфері. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

2.3.3. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у коней (*Equus caballus*)

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл:

H₂O – 3,0 мкл,

5х буфер (67 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 17 мМ (NH₄)₂ SO₂, 2,5 мМ MgCl₂, 0,1% Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8% гліцерин) – 1,0 мкл;

10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл;

праймер (70 нг) – 0,8 мкл;

Тaq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл;

ДНК 50–100 нг – 4,0 мкл.

Режим проведення ПЛР:

При використанні в якості праймерів фрагменту тринуклеотидного повтору мікросателітного локусу (СТС)₆C:

початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

30 циклів:

денатурація – 95°C – 30 с;
випал праймерів – 64°C – 30 с;
синтез – 72°C – 1 хв;
термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів динуклеотидних повторів (GA)₉C та (AG)₉C:

початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

30 циклів:

денатурація – 95°C – 30 с;

випал праймерів – 57°C – 30 с;

синтез – 72°C – 1 хв;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні (AG)₈CA

початкова денатурація – 2 хв При 95°C;

30 циклів:

денатурація – 95°C – 30 с;

випал праймерів – 54°C – 30 с;

синтез – 72°C – 1 хв;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні (AG)₈CG

початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

30 циклів:

денатурація – 95°C – 30 с;

випал праймерів – 56°C – 30 с;

синтез – 72°C – 1 хв;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2 % агарозному гелі методом електрофорезу

В 1 × TBE-буфері. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75–20000 bp.

2.3.4. Проведення міжмікросателітного аналізу ДНК (метод ISSR-ПЛР) у водяного буйвола (*Bubalus bubalis*)

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ISSR-ПЛР) в роботі використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл:

H₂O – 4,4 мкл,

5x буфер (67 мМ Трис-HCl (рН 8,3), 17 мМ (NH₄)₂ SO₂, 2,5 мМ MgCl₂, 0,1 % Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8 % гліцерин) – 2,0 мкл;

10-х dNTP суміш (по 2мМ кожного) – 1,0 мкл;

праймер (70 нг) – 0,4 мкл;

Тaq-полімераза (1мол/1000 U) – 0,2 мкл;

ДНК 50-100 нг – 2,0 мкл.

Режим проведення ПЛР:

При використанні в якості праймерів фрагментів тринуклеотдних повторів мікросателітних локусів (GAG)₆C, (CTC)₆C та (ACC)₆G:

початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

35 циклів:

денатурація – 94,5°C – 30 с;

випал праймерів – 64°C – 30 с;

синтез – 72°C – 2 хв;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймера динуклеотидного повтору (AG)₉C

початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

35 циклів:

денатурація – 94,5°C – 30 с;

випал праймерів – 57°C – 30 с;

синтез – 72°C – 2 хв;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів повторів (GA)₆CC та (AG)₈CA

початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

35 циклів:

денатурація – 94,5°C – 30 с;

випал праймерів – 54°C – 30 с;

синтез – 72°C – 2 хв;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

При використанні в якості праймерів повтора (AG)₈CG

початкова денатурація – 2 хв при 95°C;

35 циклів:

денатурація – 94,5°C – 30 с;

випал праймерів – 56°C – 30 с;

синтез – 72°C – 2 хв;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

ПЛР-продукти розділяли в 2 % агарозному гелі методом електрофорезу

В 1 × TBE-буфері. Розміри ДНК-продуктів визначали за допомогою маркера молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

2.4. ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ТА МІКРОЕВОЛЮЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА МОНОЛОКУСНИМИ (STR) ТАМУЛЬТИЛОКУСНИМИ (ISSR) ДІЛЯНКАМИ ДНК У РІЗНИХ ВИДІВ

Основні формули, що використовуються для обчислення основних популяційно-генетичних характеристик наведено нижче.

Для розрахунку генної частоти за відсутності домінування використовували наступну формулу:

$$P_i = \frac{2n_{ii} + n_{12} + n_{13} + n_1(k-1)}{2n},$$

де n_{ii} – кількість гомозиготних особин за одним з алелів, n_{12}, n_{13} – кількість гетерозиготних тварин, n – загальна кількість тварин досліджених за даним локусом;

Стандартну похибку для частот алеля P_i обчислюють за формулою:

$$m = \frac{\sqrt{P_i(1-P_i)}}{2n},$$

Достовірність різниці частот алелів серед різних популяцій тварин, що досліджуються, розраховували за методом Фішера:

$$F_\phi = (\phi_1 - \phi_2)^2 \frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2},$$

Де n_1 та n_2 об'єми груп, що порівнюються, а $\phi = 2 \frac{\pi}{180} \arcsin \sqrt{P}$, де P – частота алеля.

Перевірка популяції на відповідність генетичній рівновазі Харді-Вайнберга проводять за допомогою критерію χ^2 Пірсона:

$$\chi^2 = \frac{\sum (\Phi - T)^2}{T}$$

де χ^2 – стандартні значення критерію;

Φ – фактична кількість генотипів;

T – теоретична кількість генотипів.

При оцінці рівня генетичної мінливості ми використовували показники фактичної гетерозиготності:

$$H_o = \frac{1}{n} \sum_j^n h_j,$$

де h_j – кількість гетерозигот на об'єм вибірки, осереднене за всіма досліджуваними локусами (n);

очікуваної гетерозиготності:

$$H_E = \frac{1}{n} \sum_j^n (1 - \sum_i^k P_{ij}^2),$$

де n – кількість досліджених локусів, P_{ij} – частота i алеля в j локусі, k – кількість алелів в j локусі.

Формула Роджерса.

$$D_r = \frac{1}{n} \sum_j^n \left[\frac{1}{2} \sum_i^k (X_{ij} - Y_{ij})^2 \right]^{1/2},$$

де X_{ij} , Y_{ij} – частоти і алеля j локусу в популяціях, які порівнюються; k – число алелів в j локусі; n – кількість досліджених локусів.

Частка поліморфних локусів (P) – це відношення поліморфних локусів до загальної кількості:

$$P = n_{pj} / n_{total}$$

P – частка поліморфних локусів;

n_{pj} – кількість поліморфних локусів;

n_{total} – загальна кількість локусів.

Індекс поліморфізму (PIC)

$$PIC = 2f(1-f),$$

де f – частота одного з двох алелів, і $f = \sqrt{R}$, де R – частота варіантів, у яких відсутній фрагмент ДНК, відповідної довжини.

Примітка: $PIC < 0,250$ (низькополіморфні), $PIC = 0,250-0,500$ (помірнополіморфні); $PIC > 0,500$ (високополіморфні локуси).

Середнє на локус генне різноманіття (H_e) – це оцінка рівня генетичної мінливості в популяції.

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

де $p_1, p_2, \dots, p_n$ – частоти алелів

Показник внутрішньопопуляційного різноманіття (μ) – середня кількість морф/алелів у вибірці:

$\mu = (\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + \dots + \sqrt{p_m})^2$ де, p – частка поліморфних алелів.

$$H' = - \sum_{i=1}^n (p_i \times \ln p_i)$$

Індекс Шеннона:

H' – індекс Шеннона, де $p_1, p_2, \dots, p_n$ – частоти поліморфних алелів.

Механізм існування великої кількості некодуючої ДНК в еукаріотичних геномах і величезна різниця в їх розмірах – одна з нерозв'язаних наукових загадок. Частина некодуючої ДНК безпосередньо задіяна в регуляції активності кодуючих ділянок. Проте, функції її більшої частини невідомі.

Оцінку генетичного поліморфізму та мікроеволюційних процесів за монолокусними (STR) та мультилокусними (ISSR) ділянками ДНК у досліджених нами різних видів свійських тварин ми пропонуємо проводити за наступними показниками.

Для аналізу алелофондів популяцій свійських тварин нами було розраховано частоти фактично виявлених алелів (N_a), породоспецифічних ($N_{a_{unic}}$) та рідкісних алелів (N_{a1}) – алелів що зустрічались в популяції лише один раз.

Спектри алельної мінливості визначали для кожного мікросателітного локусу та оцінювали характер їх розподілу в популяціях. Ступінь відмінностей між тваринами різних порід за частотами алелів було розраховано за використання критерію χ^2 Пірсона із визначенням рівня значущості. Дані, одержані за використання критерію χ^2 Пірсона, при аналізі малочисельних виборок та поліалельних локусів можуть бути зсунуті. В зв'язку з тим, що ми маємо справу з поліалельними системами і невеликим об'ємом вибірок, на нашу думку, більш прийнятним є розрахунок рівноваги за Харді-Вайнбергом за допомогою процедури марківських ланцюгів Монте-Карло (MCMC). Розрахунки проводили за використання програмного забезпечення PAST [48].

З метою оцінки відповідності характеру розподілу виявлених алелів певній мутаційній моделі, яка відображає, як алельну різноманітність, так і характер розподілу алелів мікросателітної ДНК за певним локусом. Теоретичну кількість алелів для різних мікросателітних локусів було розраховано за моделями: модель нескінченної кількості алелів (*IAM – infinite alleles model*) та покрокова мутаційна модель (*SMM – stepwise mutation model*) за використання програмного забезпечення MICROSATELLITE ANALYSER [49]. Для всіх досліджених нами видів і порід модель *SMM* була більш адекватною для апроксимації рівня алельного різноманіття за всіма, без виключень, дослідженими мікросателітними локусами, ніж модель *IAM*, яка значно завищує фактичні величини, як по кожній породі зокрема, так і по виду в цілому.

Для аналізу генотипового поліморфізму досліджуваних популяцій свійських тварин нами було розраховано частоти фактично виявлених генотипів (N_g), частоти породоспецифічних генотипів ($N_{g_{unic}}$) та рідкісних генотипів (генотипи, які виявлялись в популяції лише один (N_{g1}), чи два (N_{g2}) рази).

Для оцінки та порівняння генетичної структури та поліморфізму окремих порід різних видів, а також різних видів свійських тварин було визначено середні значення перерахованих показників.

Статистичну вірогідність отриманих результатів обчислювали методами математичної статистики та біометрії за критеріями χ^2 ,

Ст'юдента, Фішера з використанням стандартних комп'ютерних програм Gen Alex 6.5, STATISTICA 6 [50].

Оцінку популяційно-генетичних процесів в досліджуваних популяціях, проводили за допомогою програмного забезпечення PowerStats V12 (Promega) та PowerMarker V3.0 за наступними показниками: фактична кількість алелів (N_a) та кількість ефективних алелів (A_e) на локус; фактична (H_o), очікувана (H_e) та індивідуальна (H_i) гетерозиготність; індекс поліморфізму (PIC); індекс фіксації (F); індекс Шеннона (I); вірогідність виключення випадкового збігу алелів (PE); комбіновану вірогідність виключення випадкового збігу алелів (CPE) для мікросателітних локусів ДНК було визначено за допомогою програмного забезпечення Cervus 3.0.3.

Оцінку стану генетичної рівноваги за кожним мікросателітним локусом виконано за методом MCMC за використання програмного забезпечення GeneALEx та GENEPOP [51].

Індекси фіксації (або F-статистика Райта), що дозволяють визначити ступінь генетичної диференціації, було розраховано за методом Б. Вейром і К. Кохерманом у праці [52], як для всіх мікросателітних локусів, в цілому, так і для кожного, зокрема, за використання програмного забезпечення FSTAT [53].

З метою оцінки генетичної структури популяцій було розраховано значення потоку генів та здійснено аналіз молекулярної мінливості (AMOVA) на основі емпіричного розподілу генотипів за дослідженими локусами мікросателітної ДНК із визначенням рівня значущості оцінки F_{st} за допомогою permutation-методу (використано 999 перестановок) за допомогою програмного забезпечення GenALEx.

Оцінку ефективної чисельності популяції (N_e) було розраховано за мультилокусними генотипами досліджених мікросателітів ДНК використовуючи програмне забезпечення NeEstimator [54].

За результатами аналізу мультилокусних генотипів з використанням програмного забезпечення GenALEx проведено assignment-тест та розраховано матрицю попарних генетичних відстаней [55]. За останнім алгоритмом було побудовано дендрограму подібності (метод UPGMA – незваженого попарного арифметичного середнього – *unweighted pair-group method using arithmetic averages*).

Для аналізу мікроеволюційних процесів було розраховано оцінки M-ratio. У 2001 році Дж. Гарза та Є Вільямсоном було показано [56], що досить адекватним маркером прояву генетико-автоматичних

процесів є співвідношення кількості визначених алелів (за певним мікросателітним локусом) до розмаху між довжиною крайніх за розмірами алелів за цим локусом, що і було названо авторами *M-ratio* (тест знаків: $p < 0,001$). Даний показник характеризує інтенсивність зменшення рівня генетичного різноманіття внаслідок дії генетико-автоматичних процесів, насамперед, коливань чисельності, інбридингу та ефекту «пляшкового горлечка». Відповідно, низькі його значення свідчать про більшу вразливість субпопуляції до дії вищевказаних процесів, а також можуть бути свідченнями дії штучного добору. Гіпотезу відсутності прояву ефекту «пляшкового горлечка» було перевірено за використання непараметричного тесту знаків [57, 58]. Наявність нерівноваги за зчепленням (LD) між всіма парами використаних для кожного виду свійських тварин мікросателітних локусів ДНК було проаналізовано за допомогою програмного забезпечення PopGene [59]. Оцінки ефективної чисельності популяції (N_e) було розраховано за мультилокусними генотипами досліджених мікросателітів ДНК, використовуючи програмне забезпечення NeEstimator [54].

Оскільки в різних популяціях проаналізовано відмінну кількість особин, для коректного порівняння (як між породами, так і між окремими локусами мікросателітної ДНК) проаналізованих популяцій (груп тварин) різного розміру, було використано різні непараметричні методи, які дозволяють оцінити потенційне різноманіття (за умови, що розмір оцінюваної вибірки прагне до нескінченості), це непараметричний метод А. Чао [60] та *rarefaction*-метод із застосуванням програмного забезпечення HP-Rare [61].

Зрозуміло, що сама техніка аналізу геному, так само як і методи обробки даних розвиваються і вдосконалюються по шляху все більшої автоматизації експериментальної частини та ускладнення математичних алгоритмів. Тому, планування майбутніх досліджень в галузі молекулярних досліджень безпосередньо пов'язане з накопиченням інформації та обґрунтування вибору генів, які з найбільшою достовірністю відображають еволюцію формування ділянок геному різних видів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Poultry genetics, breeding, and biotechnology / ed. : W. M. Muir, S. E. Aggrey. Wallingford : CABI publishing, 2003. 744 p.
2. Fulton J. E. Molecular genetics in a modern poultry breeding organization. *World's poultry science journal*. 2008. Vol. 64. P. 171–176.
4. Duran C., Appleby N., Edwards D., Batley J. Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualization. *Current bioinformatics*. 2009. Vol. 4. P. 16–27.
5. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994. Vol. 20. P. 176–183.
6. Ye C., Yu Z., Kong F., Wu S., Wang B. R-ISSR as a new tool for genomic fingerprinting, mapping, and gene tagging. *Plant molecular biology reporter*. 2005. Vol. 23. P. 167–177.
7. Schlotterer C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion. *Nature reviews: genetics*. 2004. Vol. 5. P. 63–69.
8. Rajendrakumar P., Biswal A. K., Balachandra S. M., Srinivasarao K., Sundaram R. M. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics*. 2007. Vol. 23. P. 1–4.
9. Li Y., Korol A. B., Fahima T., Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 2004. Vol. 21 (6). P. 991–1007. DOI: 10.1093/molbev/msh073.
10. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994. Vol. 20. P. 176–183.
11. Habza-Kowalska E., Grela M., Gryzińska M., Listos P. Molecular techniques for detecting food adulteration. *Medycyna Weterynaryjna*. 2019. Vol. 75 (7). P. 404–409.
12. Tanchev Sv. Conservation of genetic resources of autochthonous domestic livestock breeds in Bulgaria. A review. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2015. Vol. 21. P. 1262–1271.
13. Xi M., Sun L., Qiu, S., Liu J., Xu J., Shi J. In vitro mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Reports*. 2012. Vol. 31. P. 1043–1051. Doi: 10.1007/s00299-011-1222-8.
14. Nahid A., Mohammadreza M. A., Amin B. ISSR markers for assessing dna polymorphism and genetic characterization of cattle, goat

and sheep populations. *Iranian journal of biotechnology*. 2011. Vol. 9 (3). P. 222-229.

15. Pradeep Reddy M., Sarla N., Siddiq E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 2002. Vol. 128. P. 9–17. Doi: 10.1023/A:1020691618797.

16. Li S., Jia J., Wei X., Zhang X., Li L., Chen H., Fan Y. D., Sun H., Zhao X., Lei T., Xu Y., Jiang F., Wang H. Li L. A intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat. *Molecular Breeding*. 2007. Vol. 20. P. 167–178. Doi: 10.1007/s11032-007-9080-3.

17. Vieira M. L., Santini L., Diniz A. L., Munhoz C. F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*. 2016. Vol. 39 (3). P. 312–328. Doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.

18. Powell W., Machray G. C., Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*. 1996. Vol. 1. P. 215–222.

19. Orr H. T., Zoghbi H. Y. Trinucleotide repeat disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 2007. Vol. 30. P. 575–621.

20. Gymrek M., Golan D., Rosset S., Erlich Y. lobSTR: A short tandem repeat profiler for personal genomes. *Genome Research*. 2012. Vol. 22. P. 1154–1162.

21. Kashi Y., King D. G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics*. 2006. Vol. 22. P. 253–259.

22. Neff B. D., Gross M. R. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*. 2001. Vol. 55 (9). P. 1717–1733.

23. Pei J., Bao P., Chu M., Liang C., Ding X., Wang H., Wu X., Guo X., Yan P. Evaluation of 17 microsatellite markers for parentage testing and individual identification of domestic yak (*Bos grunniens*). *Peer J*. 2018. Vol. 6 (1). E5946. Doi: 10.7717/peerj.5946.

24. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 2004. Vol. 5 (6) P. 435–445.

25. Jin L., Macaubas C., Hallmayer J., Kimura A., Mignot E. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996. Vol. 93. P. 15285–15288.

26. Selkoe K. A., Toonen R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 2006. Vol. 9 (5). P. 615–629.

27. Jakabová D., Trandžík J., Chrastina J., Hudecová L', Zetochová E., Bulla J., Bugarský A., Jakab F., Kozlík P. Effectiveness of six highly polymorphic microsatellite markers in resolving paternity cases in Thoroughbred horses in Slovakia. *Czech Journal of Animal Science*. 2002. Vol. 47. P. 497–501.
28. Tozaki T., Kakoi H., Mashima S., Hirota K., Hasegawa T., Ishida N., Miura N., Choi-Miura N.H., Tomita M. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2001. Vol. 63 (11). P. 1191–1197. Doi: 10.1292/jvms.63.1191.
29. Vostrá Vydrová H., Vostrý L., Hofmanová B., Veselá Z., Schmidová J., Majzlík I. Population studies of Czech Hucul horses. *Poljo Privreda*. 2015. Vol. 21 (1). P. 41–43.
30. Khanshour A., Juras R., Blackburn R., Cothranet G. The legend of the Canadian horse: genetic diversity and breed origin. *Journal of Heredity*. 2015. Vol. 106 (1) P. 37–44. doi:10.1093/jhered/esu074.
31. Mackowski M., Mucha S., Cholewinski G., Cieslak J. Genetic diversity in Hucul and Polish primitive horse breeds. *Archives Animal Breeding*. 2015. Vol. 58 (1). P. 23–31. doi: 10.5194/aab-58-23-2015.
32. Kusza S., Priskin K., Ivankovic A., Jedrzejewska B., Podgorski T., Javor A., Mihok S. Genetic characterization and population bottleneck in the Hucul horse based on microsatellite and mitochondrial data. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2013. Vol. 109. P 54–65. doi: 10.1111/bij.12023.
33. Dimsoski P. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. *Croatian Medical Journal*. 2003. Vol. 44 (3). P. 332–335.
34. Cho G. J. Genetic relationship and characteristics using microsatellite DNA loci in horse breeds. *Journal Life Science*. 2007. Vol. 17. P. 699-705.
35. van de Goor L. H. P., van Haeringen W. A. And Lenstra J. A. Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis. *Animal Genetics*. 2011. Vol. 42. P. 627-633. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02194.x.
36. Nedup D., Monchai D., Yupin P. Genetic characterization of Bhutanese native chickens based on an analysis of Red Junglefowl (*Gallus gallus gallus* and *Gallus gallus spadecius*), domestic Southeast Asian and commercial chicken lines (*Gallus gallus domesticus*). *Genetics and*

Molecular Biology. 2012. Vol. 35 (3). P. 603-609. doi: 10.1590/S1415-47572012005000039.

37. Romanov M. N., Weigend S. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and Jungle fowl using microsatellite markers. *Poultry Science*. 2001. Vol. 80. P. 1057–1063.

38. Mahammi F., Gaouar S., Laloë D., Faugeras R., Tabet-Aoul N., Rognon X., Tixier-Boichard M., Saidi-Mehtar N. A molecular analysis of the patterns of genetic diversity in local chickens from western Algeria in comparison with commercial lines and wild jungle fowls. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2016. Vol. 33. P. 59–70.

39. Hariyono D. N. H., Maharani D., Cho S., Manjula P., Seo D., Choi N., Sidadolog J. H. P., Lee J. H. Genetic diversity and phylogenetic relationship analyzed by microsatellite markers in eight Indonesian local duck populations. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2019. Vol. 32. P. 31–37.

40. Huo J. L., Wu G. S., Chen T., Huo H. L., Yuan F., Liu L. X., Ge C. R., Miao Y. W. Genetic diversity of local Yunnan chicken breeds and their relationships with Red Junglefowl. *Genetics and molecular research*. 2014. Vol. 13 (2). P. 3371–3383. Doi: 10.4238/2014.April.29.16.

41. Crittenden L. B., Provencher L., Levin I., Abplanalp H., Briles R. W. Characterization of a Red Jungle Fowl by White Leghorn back crossreference population for molecular mapping of the chicken genome. *Poultry Science*. 1993. Vol. 72. P. 334–348.

42. Hillel J., Groenen M. A. M., Tixier-Boichard M., Korol A. B., David L., Kirzhner V. M. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics Selection Evolution*. 2003. Vol. 35. P. 533–557.

43. Carvalho D. A., Martínez A. M., Carolino I., Barros M. C., Vallejo M. E. C., Santos-Silva F., de Oliveira Almeida M. J., Carolino N., Delgado Bermejo Bermejo J. V., Sarmiento J. L. R. Diversity and Genetic Relationship of Free-Range Chickens from the Northeast Region of Brazil. *Animals. Open Access Journal From MDPI*. 2020. Vol. 10 (10). P. 1857. Doi: 10.3390/ani10101857.

44. Agatep R. C., Lambio A. L., Vega R. S. A., Capitan S. S., Mendioro M. S., Yebron M. G. N. Microsatellite-based genetic diversity and relationship analyses of three genetic groups of domesticated Mallard ducks (*Anas Platyrhynchos Domesticus* L.). *Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2016. Vol. 42 (2). P. 102–111.

45. Savolainen P., Zhang Y. P., Luo J., Lundeberg J., Leitner T. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*. 2002. Vol. 298. P. 1610–1613.
46. Yilmaz O. Controversies of Origin of Domestic Dog-III-References of Modern Dogs until 2006. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 2017. Vol. 4 (11). P. 484–490.
47. Ye J.-H., Ren D., Xie A.-F., Wu X.-P., Xu L., Fu P.-F., Zhao H.-A., Yang Q.-Y. Microsatellite-based Genetic Diversity and Evolutionary Relationships of Six Dog Breeds. *Psychology Faculty Publications*. 2009. Vol. 22 (8). P. 112–1106.
48. Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *PalaeontologiaElectronica*. 2001. Vol. 4. P. 1–9.
49. Dieringer D. Schlötterer C. MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*. 2003. Vol. 3. P. 167-169. 10.1046/j.1471-8286.2003.00351.x.
50. Peakall R., Smouse P.E. GenALEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. P. 2537–2539.
51. Raymond M., Rousset F. GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 1995. Vol. 86. P. 248–249.
52. Weir B. S., Cockerham C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 1984. Vol. 38. P. 1358–1370.
53. Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate Fstatistics. *Journal of Heredity*. 1995. Vol. 86. P. 485–486.
54. Do C., Waples R. S., Peel D., Macbeth G. M., Tillett B. J., Ovenden J. R. NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*. 2014. Vol. 14. P. 209–214.
55. Nei M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 1972. Vol. 106. P. 283–392.
56. Garza J.C., Williamson E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*. 2001. Vol. 10. P. 305–318.
57. Шибаніна О. В., Крамаренко С. С., Ганганов В. М. Практикум з біометрії: Методи непараметричної статистики. Миколаїв : МДАУ, 2008. 166 с.

58. Крамаренко С. С, Луговий С. І, Лихач А. В., Крамаренко О. С. Аналіз біометричних даних у розведенні та селекції тварин : навч. посіб. Миколаїв : МНАУ, 2019. 211 с.
59. Yeh F.C., Yang R. C., Boyle T. PopGene. Microsoft Windows based freeware for population genetic analysis: Quick User Guide. University of Alberta. 1999. 28 p.
60. Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*. 1984. Vol. 11. P. 265–270.
61. Kalinowski S. T. HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology Notes*. 2005. Vol. 5. P. 187–189.
62. Ohta T., Kimura M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical Research*. 1973. Vol. 22. P. 201–204.
63. Piry S., Luikart G., Cornuet J. M. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*. 1999. Vol. 90. P. 502–503.

Основна інформація про програмне забезпечення

1. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного пакету *Statistica 6.0* та *Exel (Microsoft Office 2007)*. Статистичну обробку даних проводили в стандартному пакеті *Microsoft Excel* із використанням інтегрованої надбудови програми *Statisti XL 2.0* (<http://www.statistixl.com/>).
2. Microsatellite analyzer (MSA) 4.05 <https://mybiosoftware.com/msa-4-05-microsatellite-analyzer.html> – програма розрахунку теоретичної кількості алелів для різних мікросателітних локусів.
3. GenAlEx 6.51b2 <https://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html>.
4. Popgene for Windows https://download.cnet.com/popgene/3000-2054_4-75328340.html – програми розрахунку оцінки стану генетичної рівноваги за кожним локусом PAv3.17 / *Palaeontological Statistics*.
5. PAST <https://rsload.net/soft/cam/19204-past.html> – програма розрахунку ступеня відмінності між тваринами різних груп за частотами алелів 12 мікросателітних локусів (критерію χ^2 К. Пірсона).

6. FSTAT <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> – індекс фіксації або F-статистики С.Райта – програма розрахунку ступеня генетичної диференціації для кожного локусу мікросателітів окремо, так і для всіх локусів в цілому.

7. NeEstimator <https://www.molecularfisherieslaboratory.com.au/neestimator-software> – програма розрахунку оцінки ефективної кількості алелів.

Розділ 3

ВИЯВЛЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ ТВАРИН, АСОЦІЙОВАНИХ З ГІПОАЛЕРГЕННИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ МОЛОКА

У даному розділі описано підходи до виявлення молекулярно-генетичних маркерів у сільськогосподарських тварин, пов'язаних з гіпоалергенними властивостями молока. Розглянуто гени та їх алелі, які впливають на синтез білків молока, зокрема бета-казеїну, і здатні послаблювати алергічні прояви. Описано методи відбору біологічного матеріалу, виділення ДНК та генотипування за допомогою ПЛР. Особливу увагу приділено інтерпретації отриманих результатів і їхньому використанню в селекційних програмах у скотарстві

3.1. МАРКЕРИ, АСОЦІЙОВАНІ З АЛЕРГЕННИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ МОЛОКА

Молоко жуйних тварин має подібний склад і містить білки, що мають однакові структурні, функціональні та біологічні властивості. Однак, людське молоко, на відміну від коров'ячого, не містить β -лактоглобулін. Також людське грудне молоко та молоко жуйних істотно відрізняються співвідношенням сироваткових білків і казеїнів. Саме казеїни випадають в осад при скисанні молока, утворюючи коагулят (сирну масу). Сироваткові білки залишаються розчиненими у молочній сироватці. Казеїни та сироваткові білки сильно відрізняються фізико-хімічними та алергенними властивостями. Так, коагулят містить фракцію казеїну, що включає 4 білки: альфаS1-, альфаS2-, бета-і каппа-казеїни. Сироватка містить переважно глобулярні білки BLG та альфа-лактальбумін, або ALA. Є в ній у невеликій кількості та інші компоненти, такі як бичачий сироватковий альбумін (BSA), лактоферин (LF), імуноглобуліни (Ig) та протеозопептон.

3.1.1. Ген бета-казеїну (CSN2) ВРХ

Бета-казеїн молочного білка складається з 209 амінокислот, що займає до 35% від загальної кількості білка в молоці [1, 2]. Казеїнові пептиди посилюють природний захист організму, регулюють кров'яний тиск та допомагають боротися зі стресом. За синтез β -казеїну у великої рогатої худоби відповідає ген бета-казеїну (CSN2). Ген бета-казеїну розташований на 6 хромосомі великої рогатої худоби [3].

CSN2 має 13 генетичних варіантів: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G, A4, які відрізняються різними структурами. Найбільш поширеними варіантами β -казеїну у молочних порід великої рогатої худоби є A1 та A2 [4].

Існує думка, що спочатку всі одомашнені корови виробляли молоко, яке містить лише A2-казеїн. Однак, ймовірно, внаслідок точкової мутації, 5000–10000 років тому в європейських стадах *Bos Taurus* з'явився варіант A1 β -казеїну [5].

Різниця між варіантами β -казеїну A1 та A2 полягає у заміні однієї амінокислоти в 67 положенні. Варіант A1 в положенні 67 містить амінокислоту гістидин, а A2 амінокислоти пролін (рис. 1). Через мутацію виникає одиничний нуклеотидний поліморфізм [6]. При розчепленні ферментами шлунково-кишкового тракту молока, що містить A1 β -казеїн, утворюється біоактивний пептид β -казоформін 7 (BCM-7), який має значну опіїдну активність [7].

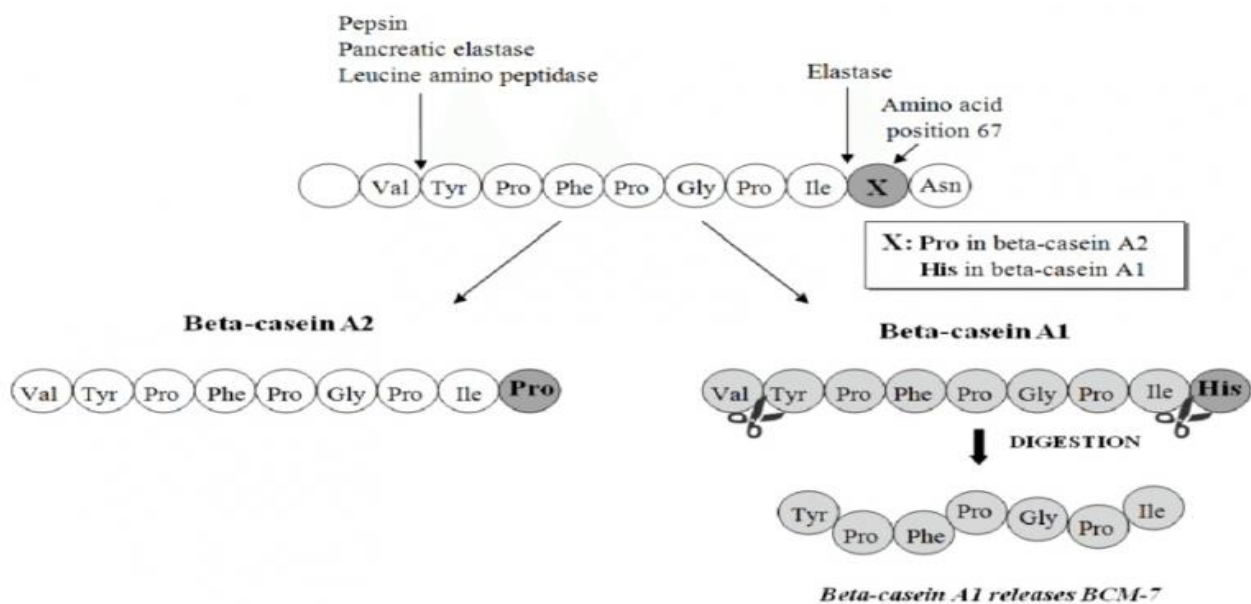


Рис. 1. Утворення β -казоморфіну-7 [8].

BCM-7 – це невелика молекула, яка може легко проникати в кровообіг і викликати різні проблеми зі здоров'ям. Саме з дією BCM-7 на організм людини пов'язують різні хронічні запальні реакції: алергії, шкірні прояви, виділення муцину [9]. Варіант A1 β -казеїн також може бути причиною цукрового діабету 1-го типу, коронарної хвороби серця та аутизму [10], тоді як варіант A2 знижує рівень холестерину та зменшує ризик запальних реакцій у кишечнику [11].

Бета-казеїн А1 – найбільш поширений у коров'ячому молоці, виробленому в Європі (за винятком Франції), а також у США, Австралії та Новій Зеландії. У деяких порід худоби встановлені значні відмінності щодо співвідношення алельних варіантів бета-казеїну А1 та А2 у молоці. Переважна більшість бета-казеїну А2 характерна для таких порід, як Гернзейська та Джерсейська, причому для Гернзейської породи співвідношення А2 до А1 становить 9,6:0,4 [12, 13].

Коров'яче молоко А2 (молоко без варіанта А1) представлене у продажу у багатьох країнах: Австралія, Великобританія, США, Нова Зеландія, Нідерланди та широко рекомендується людям, які зазвичай не сприймають молоко [14].

Білки козячого молока. Широке використання козячого молока характерне для країн із розвиненим козівництвом. Козяче молоко використовують як питне, так і у якості сировини для виготовлення йогуртів, сирів та інших кисломолочних продуктів. Враховуючи фізико-технологічні, біохімічні та ряд інших параметрів, особливий інтерес на сьогодні представляє козяче молоко для виробництва продуктів дитячого харчування. У козячому молоці в порівнянні з коров'ячим спостерігається у фракційном складі білків знижений вміст α S1-казеїну (що сприяє гіпоалергенності), підвищений вміст β -казеїну (що впливає на швидкість утворення в шлунку дрібнодисперсного легкозасвоюваного згустку) та висока ступінь дисперсності жирової фази. В останній час посилюється тенденція до розробки функціонально нових молочних продуктів, в яких за основу взяті такі параметри як висока харчова та біологічна цінність і фізіологічна активність продукту, що зумовлюються високою якістю молока [15].

3.1.2. Ген капа-казеїну (κ -CN) кіз

Казеїни – найпоширеніші білки молока, є сімейством кислих, багатих проліном фосфопротеїнів. Казеїн каппа (κ -CN) – це молочний білок, який дозволяє формувати та стабілізувати молочні міцели, визначає їх розмір та функцію [16]. Він відрізняється від інших казеїнів своєю розчинністю у широкому діапазоні концентрацій іонів кальцію і містить гідрофільну С-кінцеву область. Крім цих характеристик, зрілий білок капа-казеїн має лабільний пептидний зв'язок, розщеплення якого за допомогою хімозину (або реніну) продукує розчинний гідрофільний глікопептид (казеїно-макропептид), а також нерозчинний пе-

птид або пара-к-CN. Казеїно-макропептид відповідає за згортання молока, тоді як функція пара-к-CN недостатньо відома. Вивчення генетичних поліморфізмів казеїнів представляє інтерес, оскільки деякі варіанти можуть бути більш вигідними з точки зору харчування людини [17] або бути пов'язаними з якістю молока, складом та технологічними характеристиками.

У кіз основні типи казеїнів кодуються генами, які тісно зчеплені в єдиному кластері, локалізованому на шостій хромосомі [18]. Кластер казеїнів займає ділянку 250–350 т.п.н., в якій α S1-казеїн, α S2-казеїн і β -казеїн пов'язані один з одним еволюційно (рис. 2) Ці білки характеризуються подібною молекулярною масою (~24–25 кДа), промоторними ділянками, послідовностями лідуючого пептиду та ділянками фосфорилування. З іншої сторони, к-казеїн еволюційно не належить до перерахованих білків і відрізняється в основному особливостями організації 5'-фланкуючої області. Ген к-казеїну включає 5 екзонів, 4 з них несуть понад 90% інформації для кодування для зрілого білка, який містить 171 амінокислотний залишок [19].

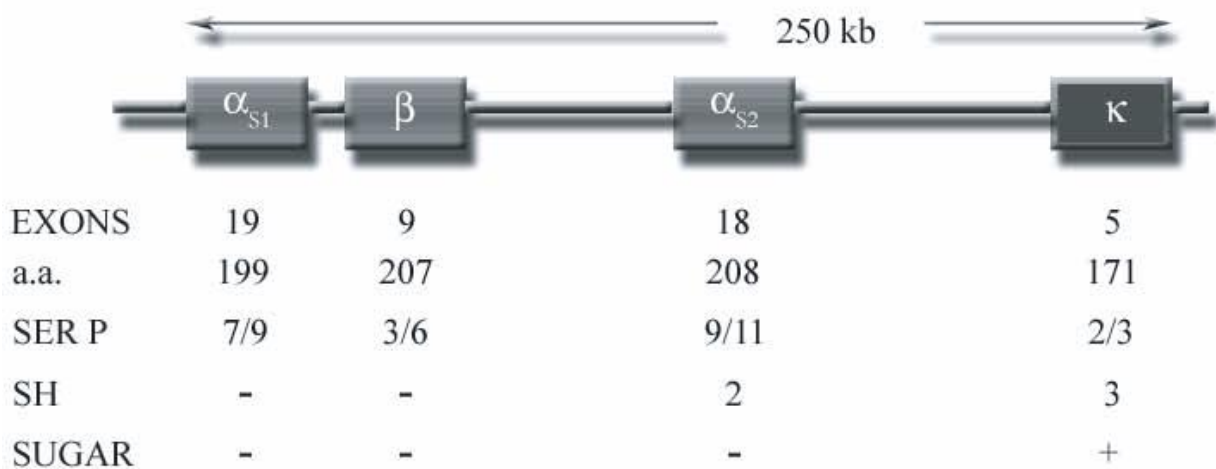


Рис. 2. Кластер казеїнів козячого молока (геномна організація) а.а. – амінокислоти; SERP – фосфосерин; SH– сульфгідрильні групи [20].

3.1.3. Ген бета-лактоглобуліну (BLG) кіз

Бета-лактоглобулін є основним сироватковим білком молока жуйних тварин. Він також зустрічається в молоці інших ссавців, але відсутній у гризунів та людей [21].

Білок бета-лактоглобулін є мажорним алергеном молока для людини, особливість його ще і полягає в тому, що він є термостабільний. Бета-лактоглобулін коров'ячого молока може мати перехресну реактивність з протеїнами молока інших видів тварин. IgE-антитіла до бета-

лактоглобулінів та альфа-лактальбумінів у 10% випадків мають перекресну реактивність.

На відміну від інших основних сироваткових білків для β -лактоглобуліну не виявлено чіткої функції, незважаючи на те, що він становить найбільшу частину фракційного складу глобулярних білків, виділених із сироватки (β -лактоглобулін 65%, α -лактальбумін 25%, сироватковий альбумін 8%, інший 2%). β -лактоглобулін є білком ліпокаліном, і може зв'язуватися із різними гідрофобними молекулами, беручи участь у їх транспорті [22]. Також було показано, що β -лактоглобулін здатний зв'язувати залізо через сидерофор [23] і, таким чином може відігравати роль у боротьбі з патогенами. Бета-лактоглобулін кіз складається із 162 амінокислотних залишків та має молекулярну масу приблизно 18 кДа. Із повідомлення Hambling, S.G. 1992 року [24], відомо що ген бета-лактоглобуліну кіз розташований на 11 хромосомі та складається з 7 екзонів та 6 інтронів.

Існування поліморфізму білку лактоглобуліну з'явився у першій доповіді Aschaffenburg R. та Drewry J. про виникнення двох форм бета-лактоглобуліну у корів у 1955 році [25]. Поліморфізм гену лактоглобуліну у кіз вперше був проаналізований методом PCR-RFLP групою дослідників Пена у 2000 році [26]. У своєму дослідженні вони повідомили про два нові алелі гену. З того часу молекулярно-генетичний поліморфізм білку лактоглобуліну активно досліджується і він є одним із генів кандидатів молочної продуктивності жуйних тварин.

3.2. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ГЕНОТИПУВАННЯ

3.2.1. Основні вимоги до роботи ПЛР-лабораторії

З метою організації ефективної роботи та запобігання контамінації реактивів і досліджуваних зразків до молекулярно-генетичних лабораторій висувається низка вимог.

1. Лабораторія має розділятися на зони або кімнати, в яких проводять окремі етапи ПЛР-аналізу:

зона 1 – для підготовки досліджуваних проб та виділення ДНК;

зона 2 – для підготовки та проведення ПЛР;

зона 3 – для виявлення і аналізу продуктів ампліфікації.

Роботу в лабораторії має бути організовано винятково в одному напрямі – від зони 1 до зони 3.

2. У кожному приміщенні ПЛР-лабораторії має бути індивідуальний набір реагентів, витратного матеріалу, дозаторів та лабораторного

устаткування. Досліджувані проби та реагенти мають зберігатися окремо.

3. Робочі поверхні, оснащення та матеріали слід обробляти ультрафіолетом. Опромінення треба здійснювати впродовж 45 хв до початку та після завершення роботи.

4. Витратні матеріали (пробірки, наконечники, рукавички) слід використовувати одноразово. Використані наконечники для автоматичних піпеток, пробірки та інші забруднені ДНК матеріали необхідно обробляти реагентами, які спричиняють деградацію ДНК (1М HCL, 10%-ний гіпохлорит натрію або 10% хлорне вапно, 5%-ний розчин хлораміну Б).

5. Роботу проводять дозаторами змінних об'ємів за використання одноразових пробірок і наконечників з аерозольним бар'єром.

3.2.2. Обладнання ПЛР-лабораторії та необхідні матеріали

- індивідуальні халати та одноразові рукавички;
- настільний бокс з бактерицидною лампою другого рівня біозахисту;
- термостат для мікропробірок від +25 до 100°C;
- центрифуга до 12–14 тис. об/хв;
- мікроцентрифуга-vortex;
- вакуумний насос з колбою-вловлювачем;
- холодильник на 2–8°C, з морозильною камерою на –20°C;
- набір автоматичних дозаторів змінного об'єму;
- штативи для дозаторів змінного об'єму;
- одноразові наконечники різного об'єму із фільтрами;
- одноразові мікропробірки від 0,2–1,5 мл;
- ДНК-ампліфікатор (термоциклер);
- ваги аналітичні;
- магнітна мішалка для приготування розчинів;
- скляний мірний посуд;
- ванна для фарбування і відмивки гелів;
- камера для горизонтального електрофорезу;
- джерело постійного струму з напругою 150–500 В;
- трансільомінатор;
- відеосистема для візуалізації результатів (або цифровий фотоапарат);
- мікрохвильова піч для приготування агарозних гелів;

- посуд для приготування буферів і гелів (циліндри, колби з термостійкого скла та ін.);
- дистильована вода;
- агароза;
- набір для виділення ДНК;
- суміш для проведення ПЛР;
- мінерально олія;
- специфічні олігонуклеотидні праймери;
- зразки досліджуваної ДНК;
- тріс-основа;
- борна кислота;
- ЕДТА;
- бромистий етидій;
- маркери молекулярних мас різних довжин.

3.2.3. Біологічний матеріал для молекулярно-генетичного аналізу

Джерелом для виділення ДНК може слугувати будь-яка речовина біологічного походження (кров, сперма, шерсть, кістки, тощо).

Найбільш широко для виділення ДНК використовують кров.

Під час відбирання проб і підготовки досліджуваного матеріалу необхідно дотримуватись техніки безпеки, керуючись чинними правилами та інструкціями. Забір крові проводиться з яремної вени одноразовим шприцем об'ємом 5–10 мл або вакуумними системами типу *Venoject*, *Vacutainer* тощо (з ЕДТА або цитратом натрія). Якщо забір здійснюється в шприц, кров переноситься в одноразові пробірки з антикоагулянтном (3% розчин ЕДТА (трилон Б) із розрахунку 10:1 або 3,8% розчином цитрата натрія у співвідношенні 1:9). Для ДНК-аналізу достатньо 0,5 мл крові. Гепарин як антикоагулянт – не використовують, бо він проходить крізь усі процедури очищення і пригнічує фермент Таq-полімерази у процесі ПЛР.

Під час забору зразків біоматеріалу складається відповідний акт, де вказують: список тварин, назву господарства в якому зроблено відбір, та дату відбору.

Зразки доставляють у лабораторію в день відбирання або наступного дня, зберігаючи його за 4°C. Для тривалого зберігання кров заморожують за -20°C.

3.2.4. Виділення препаратів ДНК (зона 1)

В залежності від її природи використовуються різні підходи та методики виділення ДНК.

Загалом схема виділення ДНК виглядає наступним чином:

- руйнування тканини з наступним отриманням гомогенної речовини;
- лізис клітинних мембран та екстракція ДНК;
- ізоляція ДНК від білків;
- очистка від зайвих органічних сполук.

Наразі існує чимала кількість комерційних наборів для виділення ДНК, що ґрунтуються на використанні речовин для денатурації білків та сорбентів, які значно прискорюють процес виділення нуклеїнових кислот. Кожен з таких наборів містить докладний опис методики виділення ДНК.

Вибір методики виділення ДНК залежить від мети дослідження та подальшого терміну зберігання препаратів. Саме для тривалого зберігання препаратів ДНК і застосовують сорбційні методи.

Для експрес-аналізу ДНК використовують реагент «Chelex-100» (термін зберігання ДНК – 30 діб).

Експрес метод виділення ДНК:

до 150 мкл крові додають 850 мкл деіонізованої H_2O , ретельно перемішують та інкубують за кімнатної температури 30 хв, періодично струшуючи. Центрифугують впродовж 1 хв при 6 тис. об/хв, обережно видаляють супернатант. Додають 170–180 мкл 5%-ного стерильного водного розчину «Chelex-100» та інкубують впродовж 15–30 хв за 56°C. Ретельно перемішують шляхом струшування та витримують 8 хв за 100°C. Центрифугують проби впродовж 5 хв при 6 тис. об/хв. Для ампліфікації використовують 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК. Зберігають зразки за -20°C. Після кожного розморожування зразки перемішують та центрифугують впродовж 5 хв при 6 тис. об/хв.

Визначення концентрації та зберігання препаратів ДНК

Перед проведення ПЛР обов'язково проводять контроль концентрації ДНК. Концентрацію та ступінь очищення препарату ДНК визначають спектрофотометрично (за довжини хвилі 260 та 280 нанометрів) або шляхом порівняння з еталонними зразками відомої концентрації (наприклад, ДНК бактеріофагу λ).

Препарати ДНК зберігають за температури -20°C. Для ампліфікації препарат ДНК розводять до робочої концентрації 10–20 нг/мкл.

3.2.5. Ампліфікація геномних локусів (зона 2)

Для ДНК-ампліфікації використовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Суть методу – багатократний направлений синтез ДНК із дезоксирибонуклеотидтрифосфатів за присутності термостабільної ДНК-полімерази. Специфічність синтезу (ампліфікації) вибраної ділянки ДНК визначається синтетичними праймерами-затравками.

1. Реактиви (компоненти ПЛР-суміші), що використовують для ампліфікації ДНК у ПЛР дістають з морозильної камери і розморожують при кімнатній температурі. Усі компоненти ПЛР-суміші ретельно перемішати на Vortex.

2. Необхідну кількість чистих пробірок, залежно від моделі ампліфікатора, об'ємом від 0,2 до 0,5 мл маркують відповідно кількості досліджуваних зразків ДНК.

3. Для зменшення помилки саплерів при одночасній постановці декількох реакцій суміш готують в одній пробірці відповідно до таблиці 1 (крім ДНК). Об'єм ПЛР-суміші розраховують виходячи із кількості досліджуваних зразків. Після внесення всіх реагентів (за винятком ДНК) суміш ретельно перемішують, краплі осаджують центрифугуванням.

Таблиця 1.

Склад реакційної суміші

Компонент	Концентрація	Розрахунок на об'єм однієї пробірки (25 мкл)	Кінцева конц.
Буфер для ПЛР	10x	2,5 мкл	1 кратний
Суміш dNTP	кожен в конц. 2 мМ	2,5 мкл	200мк 0,2 мкМ
Прямий праймер	50 мкМ	0,2 мкл	0,4 мкМ
Зворотній праймер	50 мкМ	0,2 мкл	0,4 мкМ
Taq-полімераза	5 од/мкл	0,2 мкл	0,04 од/мкл
Розчин MgCl ₂	50мМ	1 мкл	2 мМ
Розчин ДНК	50 пкг-1мкг	Визначається користувачем	4 нг/мкл
H ₂ O		Довести до 25 мкл	

4. Після того як ПЛР-суміш буде внесена в попередньо промарковані пробірки, в них додають відповідну кількість ДНК окремими для кожної проби наконечниками.

5. Для контролю контамінації реагентів, з кожною реакцією необхідно вводити негативні контролю (НК) і позитивні контролю (ПК). У пробірку НК вносять 5 мкл деіонізованої води, а в пробірку з ПК – по 5 мкл зразку контрольної ДНК.

6. При використанні для ампліфікації термоциклеру без кришки з підігрівом, в пробірки додатково вносять по 15–30 мкл мінеральної олії для молекулярних досліджень.

7. Пробірки з готовим вмістом для проведення ПЛР центрифугують на VORTEX 5–10 с.

8. Пробірки переносять до термоблоку ампліфікатора та запускають відповідну програму ПЛР (табл. 2).

Таблиця 2.

Послідовності праймерів та параметри проведення ПЛР

Ген	Послідовності праймерів	Параметри ПЛР		
		Т, °С	час	ци- к- лів
Велика рогата худоба				
CSN2	5'- CCTTCTTTCCAGGATGAACTCCAG-3`; 5`- AGTACGAGGAGGGATGTTTTGTGG- GAGGCTCT-3`.	95	5 хв	1
		95	10 с	30
		58	30 с	
		72	30 с	
		72	5 хв	1
Кози				
κ-CN	F 5' –TCCCAATGTTGTACTTTCTTAACATC-3`, R 5 – GCGTTGTCCTCTTTGATGTCTCCTTAG - 3`	95	4 хв	1
		95	30 с	35
		63	30 с	
		72	1 хв	
		72	5 хв	1
βLG	F5'-CGGGAGCCTTGGCCCTCTGG– 3` R5'-CCTTTGTGCGAGTTTGGGTGT– 3`	95	4 хв	1
		95	30 с	35
		65	30 с	
		72	1 хв	
		72	5 хв	1

9. Після закінчення реакції ампліфікації пробірки переносять до кімнати аналізу продуктів ПЛР. Дозволяється зберігати отримані ПЛР-продукти не більше 24 годин за температури 4°C, інакше – заморожувати для довготривалого зберігання за температури –20°C. Робота з ампліфікованою ДНК повинна проводитися в окремій кімнаті лаборантом чи співробітником лабораторії, які не працюють у ПЛР приміщенні.

3.2.6. Електрофоретичний аналіз ПЛР-продуктів (зона 3)

Електрофорез в агарозних дозволяє розділяти молекули ДНК за їх розмірами. Швидкість переміщення молекул ДНК в гелі обернено пропорційна логарифму їх розміру (молекулярної ваги). При цьому гелі фарбують бромистим етидієм, який є інтеркалюючим барвником і зв'язується з молекулою ДНК. Ультрафіолетове світло поглинається бромистим етидієм та ДНК, та повертається у вигляді флюоресценції в спектрі видимого світла при 590 нм.

Розмір фрагментів ДНК визначають шляхом порівняння їх рухомості з маркерами молекулярних мас. Мінімальна кількість ДНК, яку можна побачити при фотографуванні геля, фарбованого бромистим етидієм, 2 нг при ширині полоски 0,5 см, оптимальна кількість 40–60 нг.

Приготування агарозного гелю. Для проведення електрофорезу приготувати 1х робочий буфер (склад 50х буферу: 242 г Тріс-основний; 57 мл льодяної оцтової кислоти; 100 мл 0,5 М ЕДТА, рН 8,0; H₂O до 1 л).

1. Для приготування 2%-ного агарозного гелю в колбу з термостійкого скла (~ на 250 мл) внести 2 г сухої агарози і 100 мл 1х робочого буферу. Додати бромистий етидій до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл. Розчинити агарозу в мікрохвильовій печі.

УВАГА! Бромистий етидій – канцерогенна сполука. Під час роботи з ним слід дотримуватись правил безпеки. Всі реагенти і матеріали, які містять бромистий етидій, слід утилізувати.

2. Після повного застигання гелю (~ 30 хв), обережно вилучити гребінь і помістити гель у електрофоретичну камеру. Залити в неї 1хТВЕ робочий буфер так, щоб гель був покритий шаром буферу товщиною 1 мм.

3. Використовуючи окремі наконечники, внести по 5 мкл кожного зразка в лунки гелю. У кожному рядку обов'язково мають бути негативні і позитивні контролі і ДНК-маркер молекулярних мас.

4. Підключити камеру до джерела струму, дотримуючись полярності (молекули ДНК рухаються до позитивного електроду). Провести електрофорез упродовж 30–40 хв за напруги електричного поля 10 В/см.

5. Після завершення електрофорезу перенести гель на трансільюмінатор і, якщо необхідно, сфотографувати.

УВАГА! Ультрафіолет шкідливий для очей. Під час перегляду і фотографування гелів обличчя має бути захищеним спеціальною маскою.

3.2.7. Рестрикційний аналіз ПЛР-продуктів (зона 3)

Рестрикційне розщеплення передбачає гідроліз ПЛР-продуктів ендонуклеазами рестрикції в буфері, склад якого оптимізовано для кожного конкретного ферменту. Детальні умови проведення рестрикції наводяться в паспортах до ферментів.

Протокол проведення рестрикційного аналізу:

1. Розморозити пробірку з реактивами, що використовуються для рестрикції ампліфікатів, та ретельно перемішати на Vortex.

2. Для зменшення помилки саплерів при одночасній постановці декількох реакцій суміш для рестрикції готують в одній пробірці відповідно до таблиці 3 (крім ампліфікату). Об'єм рестрикційної суміші розраховують виходячи із кількості досліджуваних зразків. Після внесення всіх реагентів суміш ретельно перемішують, краплі осаджують центрифугуванням.

Таблиця 3.

Суміш для рестрикції

№	Компонент	Концентрація	Розрахунок на об'єм однієї пробірки
1	Вода		18 мкл
2	Буфер	10х	2 мкл
3	Рестриктаза	10 од./мкл	1-2 мкл
4	Ампліфікат		25 кл

3. По 21–22 мкл готової суміші додати в пробірки з продуктами ампліфікації.

4. Пробірки з компонентами перемішують на Vortexта центрифугують 15–30 с при 6 тис об/хв.

5. Помістити проби в термостат та інкубувати впродовж 1–16 год за температурних умов, прописаних в інструкції від виробника з використання ендонуклеази.

6. Після завершення провести електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції в 2%-вому агарозному гелі.

7. В лунки вносити по 10–20 мкл реакційної суміші. У кожному рядку має бути ДНК-маркер молекулярних мас, і, бажано, нерестрикований ПЛР-продукт.

8. Сфотографувати отримані паттерни і занести в комп'ютерну базу даних.

Реактиви для проведення ПЛР, рестрикційного аналізу і контролю зберігають за температури -20°C .

Генотип тварини визначають за розмірами продуктів рестрикції (алельними варіантами) (табл. 4).

Таблиця 4.

Молекулярна маса ПЛР-продуктів та продуктів рестрикції

Ген	ПЛР-продукт, п. н.	Рестриктаза	Алелі, п. н.
CSN2	121	<i>DdeI</i>	A1–121 A2 – 86, 35
κ-CN	645	<i>HaeIII</i>	A – 416, 229 G – 366, 229, 50
βLG	426	<i>SacII</i>	A – 426 B – 349, 77

Генотипи тварин за поліморфізмом гену бета-казеїну ВРХ (**CSN2**): A1A1 – 121 п.н., A2A2 – 86, 35 п.н., A1A2 – 121, 86, 35 п. н.

Генотипи тварин за поліморфізмом гену капа-казеїну кіз (**κ -CN**): AA – 416, 229 п.н., GG – 366, 229, 50 п.н., AG – 416, 366, 229, 50 п. н.

Генотипи тварин за поліморфізмом гену бета-лактаглобуліну кіз (**BLG**): AA – 426 п.н., BB – 349, 77 п.н., AB – 426, 349, 77 п. н.

3.2.8. Інтерпретація результатів досліджень

Характеристику генетичного поліморфізму за генами бета-казеїну (**CSN2**) ВРХ, капа-казеїну кіз (**κ -CN**) та бета-лактоглобуліну кіз (**BLG**) проводили в відділі генетики та біотехнології тварин ІПГТ ім.М.В.Зубця НААН. На рисунках 3, 4 та 5 зображено спектри продуктів рестрикції досліджених генів.

Матеріалом для дослідження бета-казеїну (*CSN2*) ВРХ слугувала периферійна кров ($n = 300$) від корів сірої української породи (173 гол.), білоголової української породи (31 гол.), бурої карпатської породи (30 гол.) та українських водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) (66 гол.).

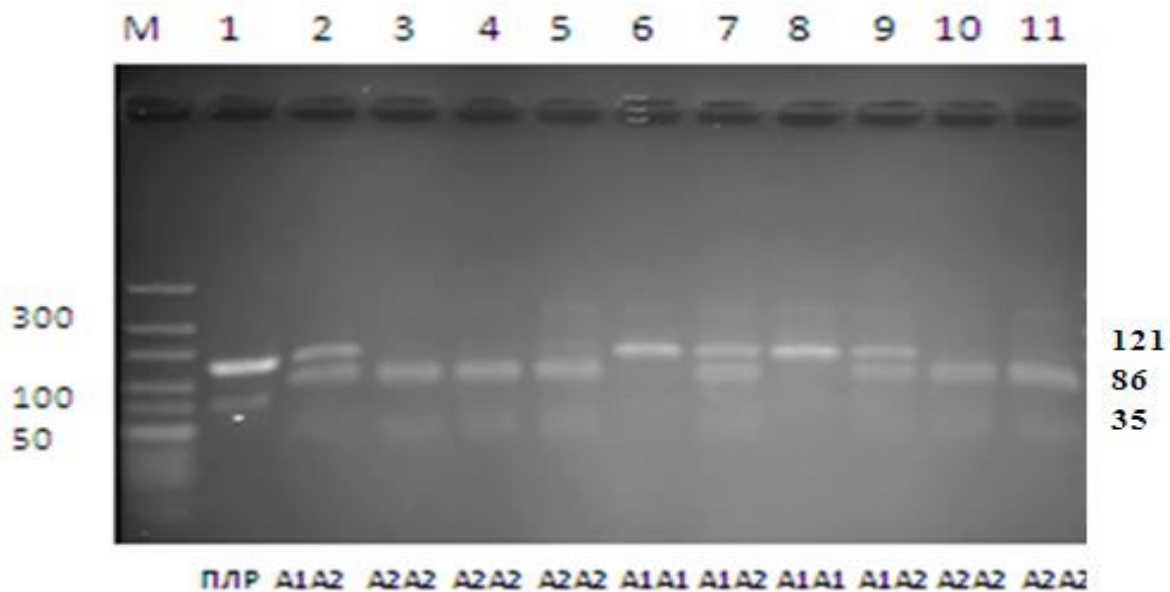


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції щодо генотипів за *CSN2*: М – маркер молекулярних мас; генотипи зразків вказані на фото

Частоти алелів та генотипів гена *CSN2* значно відрізняються у всіх досліджених порід великої рогатої худоби (табл. 5). Частоти *A2*-алелю *CSN2* варіюють від 0 до 1,0, а генотипів *CSN2*^{*A1A2*} від 0 до 0,844 та *CSN2*^{*A1A1*} від 0 до 0,480.

Максимальний (100%) вміст *A2*-алелю відмічено у буйволів, а мінімальний – у бурій карпатській породі (*A2*-аллель відсутній). Частота *CSN2*^{*A2A2*}-генотипу у всіх досліджених порід, крім водяного буйвола, була низькою (0,046) або цей генотип не зустрічався. Серед досліджених тварин сірої української породи гомозиготний генотип *CSN2*^{*A1A1*} виявлено у 19 тварин, гетерозиготи генотип *CSN2*^{*A1A2*} – у 146 тварин та «бажаний» генотип *CSN2*^{*A2A2*} – лише у 8 тварин. Загалом у сірої української породи найчастіше зустрічався гетерозиготний генотип *CSN2*^{*A1A2*} (0,844), тому відповідно переважав *A1*-аллель (0,532).

Таблиця 5.

Частота алелів та генотипів за локусом гена бета-казеїну у тварин досліджених порід ВРХ

Порода ВРХ	n	Частота генотипов	Частота алелів	H ₀	H _e	F _{is}
Сіра українська	173	A1A1 - 0,11 A1A2 - 0,844 A2A2 - 0,046	A1-0,532 A2-0,468	0,844	0,498	-0,695
Білоголова українська	31	A1A1 - 0,480 A1A2 - 0,520 A2A2 - 0	A1- 0,740 A2-0,260	0,52	0,385	-0,351
Бура карпатська	30	A1A1 - 1 A1A2 - 0 A2A2 - 0	A1-1 A2-0	-	-	-
Буйволи	66	A1A1 - 0 A1A2 - 0 A2A2 - 1	A1-0 A2 -1	-	-	-

У білоголовій українській породі визначався гомозиготний генотип $CSN2^{A1A1}$ у 15 тварин, гетерозиготний генотип $CSN2^{A1A2}$ – у 16 тварин, а гомозиготний генотип $CSN2^{A2A2}$ – не виявлено у жодної тварини. Частоти виявлених алелів вказують на значну перевагу алелів A1 (0,740). За результатами вивчення частоти алелів та генотипів гена бета-казеїну ($CSN2$) у бурій карпатській породі ВРХ виявлено відсутність поліморфізму. Усі протестовані тварини були носіями $CSN2^{A1A1}$ -генотипу. Висока частота A2-алелю (1,0) та A2A2-генотипу (1,0) за геном $CSN2$ у буйволів виділяє їх з усіх досліджених порід і робить особливо цінними для використання в молочному скотарстві.

Генотипування кіз. Матеріалом для виділення ДНК із кіз слугувала периферійна кров кіз зааненської породи (n = 60) (рис. 4).

В дослідженні було виявлено, що у групі кіз зааненської породи за геном бета-лактаглобуліну (BLG) алель G зустрічався з частотою 0,716, а алель A відповідно із частотою 0,283. Фактична гетерозиготність (0,500) перевищувала очікувану (0,403), а індекс фіксації Райта становив – 240 (табл. 6).

Проведене дослідження по виявленню поліморфізма за геном капа-казеїну (κ-Сп) з'ясувало, що вся обрана група тварин, мала один генотип за даним локусом, а саме генотип AA (рис. 5).

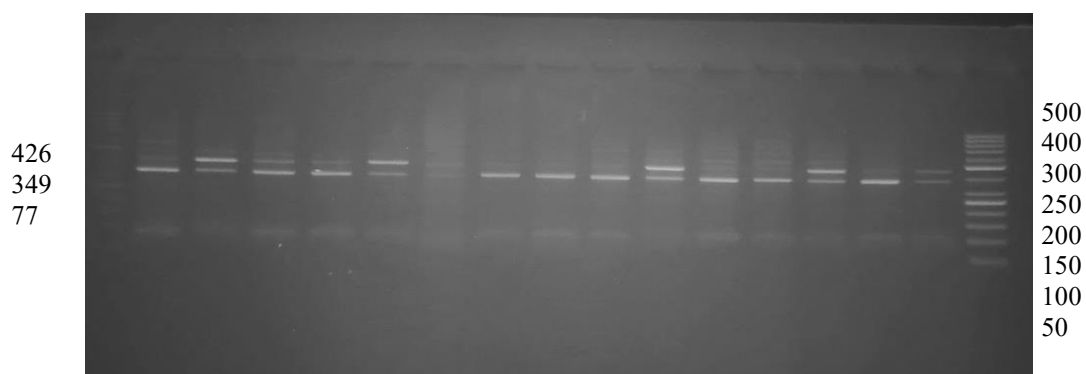


Рис. 4. Електрофореграма продуктів рестрикції ампліфікованих фрагментів локусу *BLG*.

Таблиця 6.

**Частота алелей та генотипів за локусом гена
бета-лактоглобуліну (*BLG*) кіз**

Порода кіз	n	Частота генотипов	Частота алелів	H_0	H_e	F_{is}
Зааненська	60	GG-0,467 AG-0,5 AA-0,046	G-0,716 A-0,283	0,500	0,403	-0,695

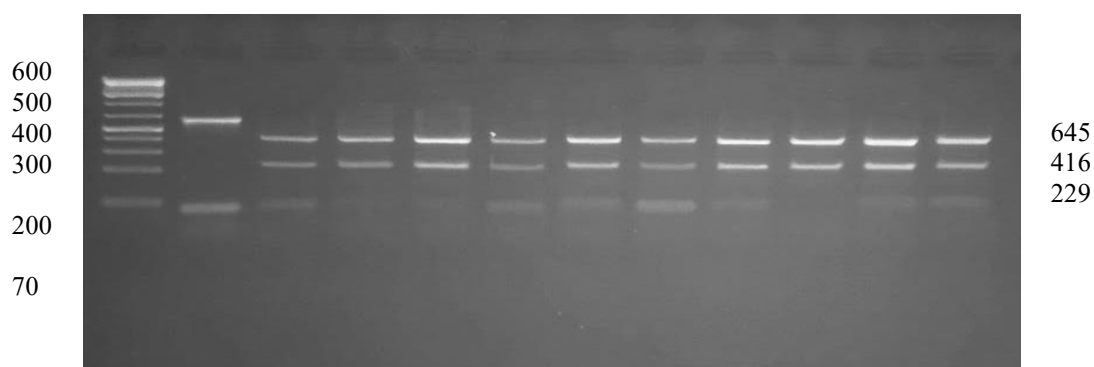


Рис. 5. Електрофореграма продуктів рестрикції ампліфікованих фрагментів локусу *κ-Cp*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Farrell Jr. H. M., Flores, Jimenez R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Swaisgood H. E. Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *J. Dairy Sci.* 2004. Vol. 87. P. 1641–1674. DOI:org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6.
2. Ladyka V.I., Pavlenko YU.M., Drevyts'ka T.I., Dosenko V. YE., Sklyarenko Y. U. The investigation of beta-casein gene polymorphism and its relationship with milk composition in cows. *Tekhnolohiya vyrobnytstva i pererobky produktsiyi tvarynnytstva*. 2021. Vol. 2. P. 92–100. DOI:org/10.33245/2310-9289-2021-166-2-92-100.
3. Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. F. Encyclopedia of dairy sciences. London: Academic press. 2003. P. 2028-2051.
4. Jaiswal K. De S., Sarsavan A. Detection of single nucleotide polymorphism by T-ARMS PCR of cross bred cattle Karan Fries for A1, A2 beta casein types. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*. 2014. Vol. 1. P. 18–22.
5. Caroli A. M., Chessa S., Erhardt G. J. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J. Dairy Sci.* 2009. Vol. 92. P. 5335–5352. DOI: 10.3168/jds.2009-2461.
6. Şahin Ö., Boztepe S., Aytekin I. A1 and A2 Bovine Milk, the Risk of Beta-casomorphin-7 and Its Possible Effects on Human Health:(I) A1 and A2 Milk and the Risk of Beta-casomorphin-7. *Selcuk J. Agr Food Sci.* 2018. Vol. 32. № 3. P. 632–639. DOI: org/10.15316/SJAFS.2018.147.
7. Sharma V., Sharma N., Jawed B., Nautiyal S. C. High resolution melt curve analysis for the detection of A1, A2 β -casein variants in Indian cows. *J. Microbiol. and Biotechnology Research*. 2013. Vol. 3. P. 144–148.
8. Massella E., Piva S., Giacometti F., Liuzzo G., Zambrini A., Serraino A. Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in northern Italy. *Italian Journal of Food Safety*. 2017. Vol. 6. P. 131–133.
9. Pal S., Woodford K., Kukuljan S., Ho. S. Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients*. 2015. Vol. 7, № 9. P. 7285–7297.
10. Raiesul Haq M., Kapila R., Shandilya U. K. & Kapila S. Impact of Milk Derived β -Casomorphins on Physiological Functions and Trends in Research: A Review. *International Journal of Food Properties*. 2014. Vol. 17, № 8. P. 1726–1741.

11. Elliott R. B., Harris D. P., Hill J. P. Type I insulin dependent diabetes mellitus and cow milk: Casein variant consumption. *Diabetologia*. 1999. Vol. 42, № 3. P. 292–296.
12. Panicke L., Freye G., Erhardt G. Effects of milk protein genotypes on milk production traits. *48th Annual Meeting of the European Association for Animal Production* am 25. 28.08.1997 in Vienna/Austria. 1997.
13. Mishra B., Mukesh M., Prakash B., Sodhi M., Kapila R., Kishore A., Kataria R., Joshi B., Bhasin V., Rasool T. Status of milk protein, b-casein variants among Indian milch animals. *Indian J. Anim Sci.* 2009. Vol. 79. P. 722–725.
14. Gutiérrez A., Meade H. M., Ditullio P., Pollock D., Harvey M. Expression of a bovine kappa-CN cDNA in the mammary gland of transgenic mice utilizing a genomic milk protein gene as an expression cassette. *Transgenic Res.* 1996. Vol. 5, № 4. P. 271–279. DOI: 10.1007/BF01972881.
15. Ladyka L. M., Shapovalov S. O., Fotina T. I. Physico-chemical composition of goat milk under conditions of monitoring studies of its quality in Eastern Ukraine. *Naukovo-tekhnichnyy byuleten instytutu biolohiyi tvaryn i derzhavnoho naukovo-doslidnoho control'noho instytutu vetpreparativ ta kormovykh dobavok*. Lviv, 2014. Vol. 5, № 1. P. 27–34.
16. Boland M., MacGibbon A., Hill J. Designer milks for the new millennium. *Livest. Prod. Sci.* 2001. Vol. 72. P. 99–109.
17. Rijnkels M. Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2002. Vol. 7. P. 327–345. DOI: 10.1023/a:1022808918013.
18. Kupper J., Chessa S., Rignanese D., Caroli A., Erhardt G. Divergence at the casein haplotypes in dairy and meat goat breeds. *J. Dairy Res.* 2010. Vol. 77. P. 56–62.
19. Patel S. B., Pande A. M., Rank D. N., Arya J. S., Jacob N. Polymorphic characteristics of Kappa casein in Zalawadi goat. *Indian Journal of Biotechnology*. 2011. Vol. 10. P. 235–237.
20. Marletta D., Criscione A., Bordonaro S., Guastella A. M., D'Urso G. Casein polymorphism in goat's milk. *Dairy Science and Technology*. 2007. Vol. 87. P. 491–504 DOI:10.1051/LAIT:2007034.
21. Ballester M., Sa'nchez A., Folch J.M. Polymorphisms in the goat b-lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Research*. 2005. Vol. 72. P. 379–384. DOI:10.1017/S0022029905000981.
22. Kontopidis G., Holt C., Sawyer L. Invited review: β -Lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J. Dairy Sci.* 2004. Vol. 87, № 4. P. 785–796. DOI: 10.3168/jds. S0022-0302(04)73222-1.

23. Franziska Roth-Walter, Luis F. Pacios, Cristina Gomez-Casado, Gerlinde Hofstetter. The Major Cow Milk Allergen Bos d 5 Manipulates T-Helper Cells Depending on Its Load with Siderophore-Bound Iron. *PLoS One*. 2014. Vol.9, № 8. e104803. DOI: [org/10.1371/journal.pone.0104803](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104803).
24. Hambling S. G., McAlpine A. S., Sawyer L. In *Advanced Dairy Chemistry 1* (Fox, P. F., ed.). *Elsevier Science*. London. 1992. P. 141–190.
25. Aschaffenburg R., Drewry J. Occurrence of different lactoglobulin in cow's milk. *Nature*. 1955. Vol. 176. P. 218–210.
26. Pena R.N., Sanchez A., Folch J.M. Characterization of genetic polymorphism in the goat beta-lactoglobulin gene. *J. Dairy Res*. 2000. Vol. 67, №2. P. 217–224. DOI: [org/10.1017/S0022029900004155](https://doi.org/10.1017/S0022029900004155).

НАУКОВО-ПРАКТИЧНЕ ВИДАННЯ

Валентина Дзіцюк – розділ 1

Олег Гузеватий – розділ 1

Кирило Копилов – розділ 2

Любов Стародуб – розділ 2

Андрій Шельов – розділ 2

Наталія Мохначова – розділ 2, 3

Юрій Лесняк – розділ 2

Марія Добрянська – розділ 2, 3

ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ В СЕЛЕКЦІЇ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН: ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Керівник видавничого проєкту

Віталій Зарицький

Підписано до друку 26.06.25 р.

Формат 60х84/16. Папір офсетний.

Гарнітура Times New Roman

Ум. друк. арк. 4.7 Обл.-вид. аркушів – 4,25.

Наклад 100 прим.

Видавець і виготовлювач: ТОВ «Видавництво Ліра-К»

Свідоцтво № 3981, серія ДК.

03115, м. Київ, вул. С. Чобану, 24

тел.: (050) 462-95-48; (067) 820-84-77

Сайт: lira-k.com.ua, редакція: zv_lira@ukr.net