

ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ ДНК У КОНТРОЛІ ПОХОДЖЕННЯ КОНЕЙ

Н.М. Шкавро, О.В.Щербак, О.Б. Сушко

Інститут тваринництва УААН

Л.О. Храброва

Інститут конярства РААН

У статті наведено результати дослідження можливості застосування методу ПЛР-аналізу з використанням явища поліморфізму мікросателітних локусів при встановленні походження окремих індивідів сільськогосподарських тварин. На прикладі мікросателітного локусу VIAS-H39 проведено роботу з ДНК, що отримані з крові та сперми коней.

полімеразна ланцюгова реакція, ДНК, мікросателітні локуси, праймери, поліморфізм

Підвищення ефективності контролю походження племінних коней – одне з найважливіших завдань племінного конярства. У сучасних умовах у зв'язку з появою великої кількості приватних власників, високою вартістю племінних тварин, збільшенням їх експорту та імпорту, участю у міжнародних змаганнях, а також застосуванням біотехнологічних методів при їх відтворенні, необхідність надійної системи ідентифікації й контролю походження коней стає особливо актуальною. Єдиним ефективним способом контролю вірогідності походження й ідентифікації коней є генетичне тестування, засноване на використанні явища генетичного поліморфізму. Відповідно до вимог, які запропоновані ISAG (Міжнародне суспільство з вивчення генетики тварин), необхідно проводити комплексну оцінку тварин із застосуванням різних маркерів, включаючи 16 поліморфних систем білків і ферментів (альбумін-AL, трансферин-Tf, естераза-ES, Xk та ін.), 7 груп крові (EAA, EAC, EAD, EAK, EAP, EAQ, EAU) і 8-12 локусів мікросателітних послідовностей ДНК. При такій комплексній оцінці ефективність контролю походження підвищується до 99,9 % [1]. Мікросателіти (STR, Short Tandem Repeats) – це короткі повтори, що розташовані послідовно, вони є зручними генетичними маркерами, завдяки відносно простій методиці їх виявлення, високому рівню поліморфізму та стабільному аутосомному кодомінантному успадковуванню. Основними вимогами до мікросателітних локусів є: високий рівень поліморфізму, відповідний розмір алеля, низький ступінь мутацій, «роботоспроможність» праймерів у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) та генетична незалежність від інших локусів [2-3]. ISAG звертає увагу на те, що контроль походження на рівні ДНК є більш інформативним ніж контроль на рівні білків і груп крові, і рекомендує лабораторіям впроваджувати використання ДНК-типування.

Контроль походження не є єдиним застосуванням методу. Поліморфізм локусів мікросателітів успішно застосовують при проведенні генетич-

ного моніторингу порід і популяцій тварин і при вивченні міжпородної диференціації.

При контролі вірогідності походження використовують панель, запропоновану ISAG, що включає у коней 9 основних і 6 додаткових мікросателітних локусів (AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, VHL20, HMS1, LEX3, LEX33), у ВРХ - 9 основних і 5 додаткових (TGLA122, TGLA126, TGLA227, BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, INRA023, SPS115), у овець – 19 локусів (CSSM31, OARAR119, OARCP34, OARFCB11, MILVET07-08, ILSTS005-11-29, MAF214), у кіз – 16 локусів, із них 4 - аналогічні локусам овець, у свиней – 15 локусів (S0068, S0107, SW24, SW353, SW840, SW036, S0070, SW72, TNFB, S0005, S0090, S0101, S0155, S0355, S0386, SW240, SW857, SW951). При цьому проводять 2-3 мультиплексні полімеразні ланцюгові реакції [4-6].

Матеріал і методи досліджень. Об'єктом дослідження можуть виступати кров, сироватка крові, сперма, волоссяні цибулини. На кожен мікросателітний локус синтезують пару фланкуючих олігонуклеотидних праймерів, підбирають температурний режим для проведення полімеразної ланцюгової реакції. Продукти ампліфікації візуалізують за допомогою розподілу їх у поліакриламідному гелі, фарбують срібленням і фотографують (іноді можна використовувати й агарозний гель). За отриманими даними проводять аналіз генетичної структури популяції (розрахунок частот стрівальності типів і алелів поліморфних локусів, розрахунок генної рівноваги, рівня поліморфності, ступеня гетерозиготності, розрахунок генетичної відстані і побудова дендрограмм).

З метою апробації методу досліджували проби ДНК, що були виділені з 11 проб крові та 2 проб сперми жеребців двома методами:

- 1) з використанням сорбенту *Chelex-100* [8];
- 2) за допомогою деградації білків гуанідинізоціанатом з наступним зв'язуванням нуклеїнових кислот із сорбентом (використовували комерційний набір реагентів “DIATM DNA Prep 200” фірми “БіоКом”, Росія).

Для проведення ампліфікації використовували набір реагентів Махі ТагTM та праймери, що наведені нижче, програмований термостат (ампліфікатор) “Амплі-4” (“БіоКом”, Росія). Для детекції продуктів ПЛР-реакції застосовували метод горизонтального електрофорезу у 2 % агарозному гелі. Для нанесення проб у лунки гелю використовували наступний буфер: 0,25 % бром-феноловий синій, 0,25 % ксиленціанол, 30 % гліцерин у воді [9]. Перегляд гелів здійснювали за допомогою транслюмінатора ТУВ-2, який випромінює світло в ультрафіолетовому діапазоні 365 нм.

Результати досліджень. ДНК, що була виділена двома вищезазначеними методами зберігалася при температурі –20 °С. Для постановки ампліфікації використовували два праймери на мікросателітний локус VIAS-H39, локалізований на 29 хромосомі в геномі коней (база даних NCBI, GenBank, AN: L34845) [10]:

F: 5'- AAT GTG ATT ATA GCA GAT AGG GTT -3'
R: 5'- CTA TCC AAT CTT CAC AAT CAT GTA -3'

Температурний режим проведення ПЛР: 7 циклів за схемою - денатурація ДНК при 96 °С – 30 с, відпал праймерів при 55 °С – 1 хв, синтез ланцюгів ДНК при 72 °С – 45 с, потім 30 циклів за схемою – денатурація ДНК при 90 °С – 30 с, відпал праймерів при 55 °С – 1 хв, синтез ланцюгів ДНК при 72 °С – 45 с (у останньому циклі впродовж 2 хв).

Детекцію продуктів ампліфікації проводили шляхом електрофоретичного розподілу молекул ДНК у 2 % агарозному гелі, з напруженістю поля 200 V/см. Як барвник ДНК використовували розчин бромистого етидію у концентрації 1 мг/см³. У якості стандарту молекулярної маси використовували DNA markers M50 ("Fermentas", Литва). Гелі фотографували з використанням світлофільтру ОС-12 та цифрового фотоапарата "Samsung".

З одержаної електрофореграми продуктів ампліфікації по мікросателітному локусу VIAS-H39 проб ДНК, що виділені з крові (2-8, 10-13) та зі сперми жеребців (14,15), визначено (рис. 1), що номери 4, 6, 8, 12 та 14 є гетерозиготними формами по цьому локусу, а номери 2, 5, 11, 15 – гомозиготними формами.

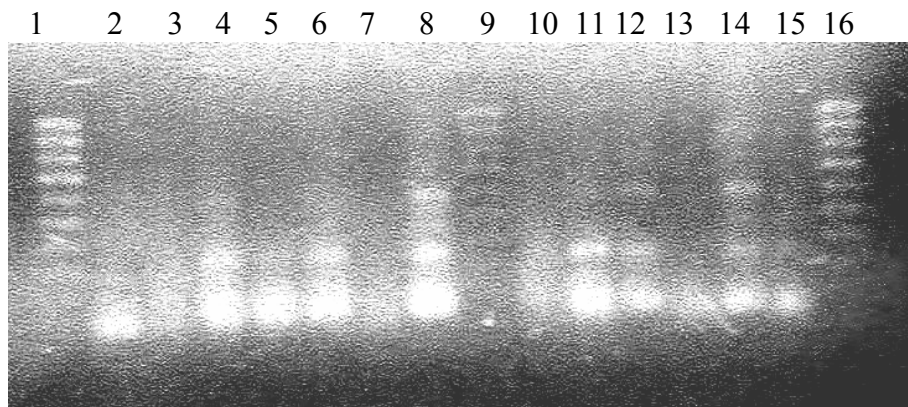


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації по мікросателітному локусу VIAS-H39 проб ДНК, виділеної з крові (2-8, 10-13) та зі сперми жеребців (14,15); 1,16 – маркер довжин ДНК M50, 9 - маркер довжин ДНК M50, розведений у 2 рази

Таким чином, при використанні розширеної панелі мікросателітних локусів з урахуванням явища поліморфізму, можна з великою вірогідністю вирішувати питання контролю походження тварин. При цьому проводити аналіз генотипу родоначальників за умови достатньої кількості нащадків (за високою частотою алелів визначеного локусу, що зареєстровані у батьків).

Для уніфікації результатів ДНК-аналізу ISAG з 1997 року рекомендовано використання автоматичних секвенаторів, що дають змогу проводити фрагментарний аналіз ДНК на рівні, практично недоступному при використанні рутинних методів. Автоматизація процесу дозволяє

практично цілком виключити суб'єктивні помилки дослідника, які в основному виникають при зчитуванні результатів після електрофорезу.

Крім використання мікросателітних локусів для вивчення генетичної мінливості порід тварин, а також пошуку породоспецифічних маркерів, успішно застосовують RAPD-PCR-аналіз, тобто ПЛР із випадковими праймерами. При вивченні порід коней, наприклад, використовуються праймери UBC-85 та UBC-126 [11].

Відомо, що локуси мікросателітів HTG4 та HTG8 зчеплені з геном, що зумовлює синдром уродженого імунodefіциту коней (SCID), що може передаватися нащадкам від батьків-гетерозигот [7]. Тому надзвичайно важливе раннє виявлення цього захворювання за допомогою ПЛР. Крім того, проблему раннього і точного виявлення збудників інфекційних захворювань у біологічних пробах тварин, що гостро стоїть на сьогоднішній день, можна успішно вирішувати за допомогою ПЛР - аналізу.

Висновки:

1. Використання праймерів до локусу VIAS-H39 дає змогу визначити кількість гомо- та гетерозиготних індивідів, ступінь стрівальності алелів та їх комбінацій.
2. Для ефективного контролю походження треба використовувати декілька мікросателітних локусів, а краще разом з поліморфними системами білків, ферментів і груп крові.

Бібліографічний список

1. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites /Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K., Andersson L.//Animal Genetics.- 1994.- 25.- P. 19-23.
- 2.Bowling A.T. DNA tests for parentage verification in horses //Animal Genetics.- 1996.- P. 33-37.
- 3.Сателлитные ДНК /В.Хемлебен, Т.Г.Беридзе и др. //Успехи биологической химии.- т.43.- 2003.- С. 267-306.
4. Applicability of nine microsatellite DNA sequences vs eleven polymorphic blood protein and enzyme systems for the parentage control in Polish Arabian and Thoroughbred horse /Gralak B., Kuril J., Lukaszewicz M., Zurkowski M. // Animal Science Papers and Reports.- 1998.- Vol. 16.- No 4.- P. 209-218.
- 5.G. Lindgren, H. Persson, H. Ellegren. Five equine dinucleotide microsatellite loci HTG17, HTG20, HTG21, HTG28 and HTG31 //Animal Genetics.- 1999.- 30.- P. 70.
- 6.Ales Knoll Comparison of two microsatellite panels for parentage verification in pigs in Czech Republic //XXVIII International Conference on Anim. Gen.- Germany.- 08-2002.- P. 111.
7. Linkage of the gene for equine combined immunodeficiency disease to microsatellite markers HTG8 and HTG4; Synteny and FISH mapping to ECA9

/Bailey E., Reid R.C., Skow L.C., Mathiason K., Lear T.L., McGuire T.C.// Animal Genetics.- 1997.- 28.- P. 268-273.

8. GenePrint™ STR Systems (Silver Stain Detection) Technical Manual // Promega Corp. – 1998.- P. 1-4.

9. Маниатис Т., Фрич Э. Молекулярное клонирование. Методы.-М.: Мир, 1984.- С. 156-185.

10. Ewen K.R., Matthews M.E. VIAS-H39, an equine tetranucleotide microsatellite repeat polymorphism // Anim. Genet.- 1994.- 25.- 6.- P. 433.

11. Эффективность использования RAPD-PCR анализа для идентификации пород домашних животных /Костюченко М.В., Нассири М.Р., Зайцев А.М., Храброва Л.А. // Междунар. конф. «ДНК-технологии в клеточной инженерии и маркировании признаков с.-х. животных» .- Дубровицы: ВИЖ.- 2001.- С. 108-109.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДНК В КОНТРОЛЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЛОШАДЕЙ

Н.М. Шкавро, О.В. Щербак, О.Б. Сушко, Институт животноводства УААН
Л.О. Храброва, Институт коневодства РААН

В статье приведены результаты исследования по возможности применения метода ПЦР-анализа с использованием явления полиморфизма микросателлитных локусов при установлении происхождения отдельных индивидуумов сельскохозяйственных животных. На примере микросателлитного локуса VIAS-H39 проведена работа с ДНК, полученными из крови и спермы лошадей.

THE DNA MICROSATELLATE MARKER'S UTILIZATION BY THE AGRICULTURAL THE HORSES ORIGIN CINTROL

Shkavro N., Scherbak J., Sushko O., The institute of animal science of UAAS
Hrabrova L., The institute of horse-breeding RAAS

This article highlights the investigations results on a possible applications of a PCR – analyzes method with usage the appearance of microsatellite loci polymorphism at installation of a several individuals agricultural animals parentage. On an example of a microsatellite loci VIAS-H39 the operation with DNA, obtained from a blood and sperm of the horses is conducted.