

резистентность и профилактику стрессов у свиней: 36. наук. праць. // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини.-Х., 2000.- Ч. 2 “Ветеринарні науки”.- Вип. № 6 (30). - С. 74-78.

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИРОДНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЖИВОТНЫХ РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ

О.Б.Шевченко

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Приведены результаты исследований естественной резистентности свиней разных генотипов, выращенных в различных параметрах микроклимата.

Установлено, что с возрастом степень влияния генотипа на основные показатели естественной резистентности свиней уменьшается, а наибольшее влияние микроклимат имеет на показатели естественной резистентности помесных животных генотипа 1/2КБ+1/2Л.

THE VARIOUS ANIMALS GENOTYPES NATURAL RESISTANCE INDICES VARIETY.

О.В.Шевченко

Kharkiv state zooveterinarian academy

This article presents the various swines genotypes natural resistance investigations results. These swines were grown by the diverse microclimate para-metres. It was proved that the genotype impact on the main indices of the swines natural resistance sags according to their age and microclimate affects mainly the rates of natural resistance of 1/2vb +1/2l crossbred animals genotype.

УДК 636.2.082.4:575

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ПЛР-АНАЛІЗУ У ВІДТВОРЕННІ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

Н.М.Шкавро, О.В.Щербак

Інститут тваринництва УААН

У статті наведені переваги використання молекулярно-генетичних методів діагностики інфекційних захворювань с.-г. тварин перед традиційними лабораторними методами, розглянуті різні методи виділення ДНК із соматичних та статевих клітин ссавців. Розглянуті області використання ПЛР у біотехнології відтворення генетично цінних тварин.

ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, поліморфізм, мікросателітні локуси

На сучасному етапі розвитку біотехнології великої значимості набувають проблеми створення ефективної технології одержання тварин із заданими ознаками, які володіють цінними у економічному відношенні властивостями, а також збереження існуючих генетично цінних тварин. При цьому на всіх етапах процесу відтворення необхідно виключити імовірність вірусної та бактеріальної забрудненості біологічного матеріалу, яким є ембріони, зародкові клітини, сперма, культура клітин, не передати та не зберігати патологічні властивості організму. Тому, проблема розробки методів ранньої і точної діагностики збудників інфекційних і

спадкоємних захворювань сільськогосподарських тварин є актуальною і важливою.

Для цієї мети традиційно застосовуються біохімічні та серологічні методи [1], але очевидна необхідність удосконалення цих методів діагностики. Для біохімічного аналізу треба виділити збудник у вигляді чистої культури, але багато мікроорганізмів є некультивуємими, тобто важко підібрати умови культивування, оскільки на теперішній час широко застосовують антибіотики широкого спектру дії, та часто неможливо висіяти мікроорганізм, що культивується, із біологічного середовища, яке містить інгібітори його розмноження. До того ж культивування досить трудомістка, довготривала та дорога процедура. Серологічні тести, такі як реакція зв'язування компліменту (РЗК), реакція дифузної преципітації (РДП), реакція гемаглютинації (РГА), а також імуноферментний аналіз (ІФА) у деяких випадках виявляються неефективними через їх низьку чутливість, високу антигенну мінливість вірусів та можливість перехресних реакцій з деякими клітинними білками. Взагалі, за допомогою одного тесту важко робити висновки, необхідна сукупність декількох методів, а це займає інколи до 7 діб, а інколи і до 30 діб (вірус діареї ВРХ) [2]. Останнього часу все більшого розповсюдження набувають новітні методи ДНК-технологій, що надають можливість тестування присутності генетичного матеріалу інфекційного агента в геномі хазяїна [3]. На нашу думку, найбільш інформативним, високочутливим і специфічним серед них є полімеразна ланцюгова реакція. Вона дає змогу збільшити специфічну послідовність ДНК шляхом її багаторазового копіювання до кількостей, які можна детектувати. Теоретично вона дає можливість виявити 1 молекулу нуклеїнової кислоти, а практично - 10 копій ДНК збудника в досліджуваному об'ємі 0,01 – 0,1 мл. Згідно з проведеною нещодавно в декількох закордонних дослідницьких центрах сумарної оцінки чутливості різних методів діагностики швидкі тести мають чутливість 40-60%, ІФА – 50-70%, культуральні дослідження – 60-80%, а ПЛР – 90-100% [4]. Висока специфічність ПЛР обумовлена тим, що в дослідному матеріалі виявляється унікальний, характерний тільки для даного збудника фрагмент ДНК і ця специфічність задається нуклеотидною послідовністю праймерів.

При діагностиці багатьох інфекцій методом ПЛР не потрібно збереження цілісності структур збудника і його біологічної активності. Аналіз за допомогою ПЛР може бути використаний не тільки для ідентифікації інфекційних захворювань, але й при дослідженнях, пов'язаних з оцінкою стадії захворювання, ефектів противірусної терапії, прогнозу захворювання [2].

Для виділення ДНК із біологічного матеріалу, який необхідно перевірити на наявність інфекції, у нашій лабораторії застосовують різні методи. В основному вони поділяються на органічні та неорганічні методи. Для створення колекції ДНК або для довгострокового зберігання ДНК краще використовувати метод фенольно-хлороформної екстракції, який є універсальним та може забезпечити високий ступінь чистоти ДНК. При

цьому відбувається лізис клітинних структур, дисоціація хромосомних нуклеопротейдних комплексів за допомогою детергентів, протеазна обробка лізату, екстрагування білків органічними розчинниками, виділення водної фази, яка містить ДНК, концентрування та очистка ДНК за допомогою спиртової преципітації та ультрамікрофільтрації. Такі препарати можуть зберігатися при 4⁰С на протязі багатьох років, але цей метод трудомісткий та потребує великих витрат часу [5].

Таким чином, для постановки та успішного проведення ПЛР цілком придатні препарати ДНК, які отримані за допомогою неорганічного методу з застосуванням хелатного полімеру Chelex-100 [6, 7]. Взагалі цей метод не передбачає виділення ДНК в очищеному вигляді – препарат, що отримується, по суті є клітинним лізатом, який містить всі наявні компоненти, тільки в інактивованій формі. Цей метод краще використовувати у науково-дослідних роботах, оскільки при цьому можна змінювати умови перебігу процесу в залежності від мети експерименту, він простий у виконанні та не потребує багато часу. Якщо проводити великий обсяг однотипних робіт, то краще користуватися готовими наборами реагентів, на нашому ринку вони представлені декількома фірмами-виробниками, ми віддаємо перевагу фірмі GenePak, але при цьому практично виключається можливість модифікування окремих етапів процесу виділення. Використовуючи ці методи виділення ДНК, ми одержуємо ДНК у кількості та якості достатніх для подальшого її використання у полімеразній ланцюговій реакції.

Ми застосовуємо метод ПЛР-аналізу для виявлення патогенних мікроорганізмів вірусної та бактеріальної природи в свіжоотриманій та заморожено-відталій спермі бугаїв-плідників, крові та її сироватці, змивах та зіскрібках з репродуктивних шляхів тварин. На даному етапі наших досліджень ми проводимо діагностику хламідіозу (*Chlamidia trachomatis*) та інфекційного рінотрахеїту (герпес-вірус 1-го типу) за допомогою наборів реагентів GenePak.

На сьогоднішній день ефективним способом контролю достовірності походження та ідентифікації тварин є генетичне тестування, яке базується на використанні явища генетичного поліморфізму, а саме поліморфізму мікросателітних послідовностей ДНК [5]. Надалі ми плануємо проводити роботи по застосуванню ПЛР-аналізу для генотипування та для встановлення філогенетичних взаємозв'язків між різними породами сільськогосподарських тварин.

Бібліографічний список

1. Лабораторные исследования в ветеринарии: Вирусные, риккетсиозные и паразитарные болезни: Справочник /Под ред. Б.И. Антонова.- М.: Агропромиздат, 1987.- 240 с.
2. Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностике инфекционных заболеваний животных (Метод. Пособие) /Б.Т.Стегний, А.М.Коваленко, А.Г. Королев.- Х.: НБЦ ИЭКВМ, 2003.- 44 с.

3. Глазко В.І. Використання методів ДНК-технологій у селекційному процесі //Вісник аграрної науки.- 1999.- №1. - С. 45-50.
4. Щербо С.Н. Успехи в диагностике инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции. Медицинская картотека, 2002.- №4.
5. Иванов П.Л. Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства: Метод. указания. Суд. Мед. Эксп., 1999.- №4.- С. 35-41.
6. GenePrint™ STR Systems Technical Manual, Promega Corp.- 49с.
7. Використання аналізу ДНК у судово-медичних експертизах, за ред. Ю.М.Сиволапа.- Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2001. – 92с.

*ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЛР-АНАЛИЗА У ВОСПРОИЗВОДСТВЕ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ*

*Н.М.Шкавро, О.В.Щербак
Институт животноводства УААН*

В статье приведены преимущества использования молекулярно-генетических методов диагностики инфекционных заболеваний с.-х. животных перед традиционными лабораторными методами, рассмотрены различные методы выделения ДНК из соматических и половых клеток млекопитающих. Рассмотрены области использования ПЦР в биотехнологии воспроизводства генетически ценных животных.

*PCR-ANALYSIS METHOD UTILIZATION BY AGRICULTURAL ANIMALS
REPRODUCTION.*

Shkavro N.M., Shcherbak O.B. The institute of animal science. UAAS.

This article highlights the advantages of application of the molecular-genetic diagnosis methods of the agricultural animals contagious diseases over the traditional laboratory procedures. The various techniques of DNA extractions from the somatic & sexual cells of the mammals were investigated. Poly-morphous chain reaction (PCR) application in the sphere of biotechnology was analysed. The implementation of this method regards the reproduction technique of the animals which are of high genetic value.

УДК 636: 234.1:611 - 013:636.2.082.14

ТРИВАЛІСТЬ ЕМБРІОГЕНЕЗУ ІМПОРТНИХ ГОЛШТИНСЬКИХ КОРІВ У ПЕРІОД АКЛІМАТИЗАЦІЇ

Т.П. Шкурко

Інститут тваринництва центральних районів УААН

Викладено результати досліджень, щодо тривалості ембріогенезу голштинів німецької і голландської селекції в період акліматизації за умов одного господарства

голштинська порода, ембріогенез, отелення, бички, телички

Акліматизація тварин до нових кліматичних умов є досить тривалим процесом, на протязі якого відбувається перебудова фізіологічних функцій організму в сторону пристосування відносно дії факторів нового середовища. Показниками пристосування із зоотехнічної точки зору можуть бути: тривалість продуктивного використання тварин, рівень