



УДК 636.2 : 575 : 57.08

АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ М'ЯСНИХ ПОРІД ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ НА ОСНОВІ ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ ДНК

Рецензенти: доктор біол.наук, професор Бугров О.Д.; канд. с.-г. наук Помітун І.А.

Н.М. Шкавро, В.І. Россоха

Інститут тваринництва УААН

А. Радко

Інститут зоотехніки, Краків, Польща

У статті наведені результати досліджень з вивчення поліморфізму 11 мікросателітних локусів ДНК великої рогатої худоби трьох порід. Ідентифіковано 141 алель з використанням автоматичного аналізу довжин ампліфікованих фрагментів за допомогою ДНК-аналізатору ABI PRISM 3110. Розраховані частоти алелів та ступені гетерозиготності. Найбільша кількість алелів спостерігалась у локусі TGLA53 (9 алелів) у худоби шаролецької та TGLA227 (7 алелів) у світлої аквітанської порід. Усі мікросателітні ДНК-маркери показали високий поліморфізм.

Ключові слова: ДНК, мікросателітні локуси, поліморфізм, ступінь гетерозиготності.

Дослідження геному сільськогосподарських тварин, що проводилися до цього часу, базуючись на вивченні поліморфізму еритроцитарних антигенів, білків та ферментів крові, в останні роки зазнало змін у напрямі використання як генетичних маркерів мікросателітних послідовностей ДНК, що завдяки високому ступеню поліморфізму, менделевському типу успадковування та можливості комп'ютерного аналізу, широко застосовуються як у теоретичних дослідженнях, так і в дослідженнях, що безпосередньо пов'язані з розведенням тварин.

У геномі великої рогатої худоби ідентифіковано більше 2000 мікросателітних послідовностей ДНК – це короткі 1-6 нуклеотидні тандемні повтори, довжиною до 200 пар нуклеотидів, характеризуються високим рівнем поліморфізму, великою кількістю алелів, у середньому 6-8 на локус, високим рівнем інформативності, наслідуються згідно зі законами Менделя, і тому є ідеальними генетичними маркерами [1-4]. Кількість повторів у різних організмів строго індивідуальна, у той час як фланкуючі регіони, до яких відбувається приєднання праймерів, є незмінними.

Поліморфізм мікросателітних локусів використовують у програмах картирування геному, при вивченні генетичної структури породи, в аналізі генетичних відстаней між лініями, породами та популяціями, в оцінці генетичної варіабельності і внутрішньовидової спорідненості, а також для прогнозування можливого гетерозисного ефекту при схрещуванні [2, 4-8]. Але одним із найбільш розроблених та впроваджених напрямків використання генетичних досліджень у селекції тварин є перевірка вірогідності походження племінних тварин (їх паспортизація) при аналізі спадкової інформації безпосередньо в ДНК [9-10].

Метою наших досліджень був аналіз поліморфізму 11 мікросателітних маркерів ДНК, оцінювання гомо- та гетерозиготності, алельного спектру тварин при проведенні генетичного контролю порід великої рогатої худоби.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом дослідження були 33 голови великої рогатої худоби, серед яких корови: 22 - породи шароле (ДП ДГ «Гонтарівка» ІТ

УААН), 7 - світлої аквітанської породи, 4 - сірої української породи (ДП ДГ „Поливанівка”, ІТ ЦР УААН).

ДНК видаляли з 40 мкл периферійної крові, відібраної з хвостової вени в пробірці з антикоагулянтом ЕДТА, з використанням методу фенол-хлороформної екстракції [11] та з сорбентом Chelex-100 [12]. Мікросателітний поліморфізм був проаналізований, базуючись на 11 маркерах, що рекомендовані ISAG для диференціації порід великої рогатої худоби, тип флуоресцентного барвника та очікуваний діапазон довжин алелей наведені у табл.1.

1.Характеристика праймерів для ампліфікації 11 мікросателітних послідовностей ДНК великої рогатої худоби

	Локус		Послідовності праймерів (5'-3')	Хромо- сома	Розмір (п.н.)
1	BM1824	Forward	NED - GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC	1	178 - 196
		Reverse	CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG		
2	BM2113	Forward	FAM - GCT GCC TTC TAC CAA ATA CCC	2	125 - 143
		Reverse	CTT CCT GAG AGA AGC AAC ACC		
3	INRA023	Forward	JOE - GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTC	3	197 - 223
		Reverse	TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C		
4	SPS115	Forward	FAM - AAA GTG ACA CAA CAG CTT CTC CAG	15	240 - 262
		Reverse	AAC GAG TGT CCT AGT TTG GCT GTG		
5	TGLA53	Forward	FAM - GCT TTC AGA AAT AGT TTG CAT TCA	16	144 - 190
		Reverse	ATC TTC ACA TGA TAT TAC AGC AGA		
6	TGLA122	Forward	JOE - CCC TCC TCC AGG TAA ATC AGC	21	130 - 164
		Reverse	AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA		
7	TGLA126	Forward	JOE - CTA ATT TAG AAT GAG AGA GGC TTC T	20	109 - 127
		Reverse	TTG GTC TCT ATT CTC TGA ATA TTC C		
8	TGLA227	Forward	FAM - CGA ATT CCA AAT CTG TTA ATT TGC T	18	74 - 104
		Reverse	ACA GAC AGA AAC TCA ATG AAA GCA		
9	ETH3	Forward	NED - GAA CCT GCC TCT CCT GCA TTG G	19	117 - 129
		Reverse	ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G		
10	ETH10	Forward	FAM - GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA CA	5	210 - 226
		Reverse	CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC		
11	ETH225	Forward	NED - GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T	9	140 - 156
		Reverse	ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT		

Мікросателітні локуси були ампліфіковані за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Використовували термоциклер БіоКом (Росія). Праймери до мікросателітних локусів були синтезовані фірмою Литех (Росія, м.Москва), також



використовувалися стандартні реагенти «Набір для генотипування великої рогатої худоби» («Bovine PCR Typing Kit II»; фірми Applied Biosystems). Реакційна суміш для проведення ПЛР містила: 10x PCR Buffer, dNTPmix (суміш 4 дезоксирибонуклеотидів по 1.25 mM кожний), AmpliTaq Gold DNA полімераза (5U/μL) та по 2.5 pmol кожного з праймерів. Загальний об'єм суміші – 25 мкл.

Реакцію проводили в наступному температурному режимі:

1. початкова денатурація – 95 °C – 15 хв;
2. 31 цикл за схемою: денатурація – 94 °C – 45 с;
відпал праймерів – 61 °C – 45 с;
синтез – 72 °C – 60 с;
3. заключний синтез – 72 °C – 60 хв.

Аналіз продуктів ампліфікації проводили шляхом електрофоретичного розподілу в 4%-му поліакріламідному гелі в денатуруючих умовах (у присутності сечовини) [13] та за допомогою капілярного електрофорезу на ДНК-секвенаторі ABI PRISM 3110 (фірми Applied Biosystems) – ця техніка високоефективна при ідентифікації індивідуальних варіантів аналізованих локусів та гарантує високе відтворення результатів. Як стандарт розмірів фрагментів ДНК використовували маркери M50 та ROX-350 [14]. Розмір ідентифікованих фрагментів ДНК (алелів) визначений за допомогою комп'ютерної програми GeneScan 2.1. Розрахунок частот алелів у специфічних локусах та ступенів гетерозиготності проведений за наступними формулами:

- частота алелів

$$q = f_x / N,$$

де f_x - кількість алелів x ;

N - кількість всіх алелів [15].

- ступінь гетерозиготності

$$H_0 = 1 - \sum_{i=1}^n q_i^2,$$

де n – кількість алелів у локусі;

q_i – частота i -го алеля [16].

Результати досліджень. На основі проведених досліджень було ідентифіковано 141 алель в 11 локусах великої рогатої худоби, включаючи 57 алелів у шароле, 48 у світлої аквітанської породи та 36 у сірої української. Тварина вважалась гомозиготною за даним локусом, якщо обидва алелі є однаковими, а гетерозиготною – якщо алелі відрізняються один від одного за довжиною. Значення проаналізованих параметрів надаються в табл. 2 та в табл. 3.

Найбільша кількість алелів спостерігалась у локусі TGLA53 (9 алелів) у корів породи шароле та в локусі TGLA227 (7 алелів) у світлої аквітанської порід. Інші алелі показали досить рівномірний розподіл у специфічних локусах (від 3 до 5 алелів), крім локусу ETH10 у шароле та ETH3 у сірої української порід, в яких були ідентифіковані по два алеля.

Генетичні маркери повинні характеризуватися високим поліморфізмом та трапляються як у гомозиготній, так і в гетерозиготній формі у популяції тварин. Параметри, що обчислені в даному дослідженні, показали, що в популяціях великої рогатої худоби мікросателітні локуси, які вивчалися, мають високий ступінь поліморфізму. Так, значення ступеня гетерозиготності для кожного маркера перевищив



2. Частоти алелів мікросателітних локусів, що ідентифіковані по трьох породах великої рогатої худоби

Локус	Шароле		світла аквітанська		Сіра українська	
	алель (п.н.)	частота алелів	алель (п.н.)	частота алелів	алель (п.н.)	частота алелів
1	2	3	4	5	6	7
BM1824			176	0,071		
	178	0,182	178	0,286		
	182	0,364	182	0,429	182	0,625
	188	0,432	188	0,143	188	0,375
			190	0,071		
BM2113	131	0,227				
	133	0,068	133	0,071	133	0,750
	135	0,182	135	0,286	135	0,125
	137	0,500	137	0,214	137	0,125
	139	0,023	139	0,429		
INRA023					194	0,125
	196	0,045				
	198	0,159			206	0,500
	200	0,159				
	204	0,068				
	206	0,386	206	0,357		
			208	0,286		
	210	0,023	210	0,071		
	212	0,091			212	0,250
	214	0,045	214	0,286	216	0,125
TGLA53	154	0,136				
	158	0,045				
	160	0,114	160	0,214		
	162	0,091	162	0,143		
	164	0,023	164	0,429		
	166	0,159	166	0,143	166	0,500
	168	0,045	168	0,071	168	0,250
	170	0,295				
					172	0,250
	176	0,091				
SPS115					246	0,125
	248	0,523	248	0,571	248	0,375
					250	0,125
	252	0,045	252	0,214		
	254	0,182	254	0,071	254	0,125
	256	0,182	258	0,071		
	260	0,068	260	0,071	260	0,250
TGLA122			141	0,214		
	143	0,659	143	0,357	143	0,125
	149	0,114	149	0,071		
	151	0,114	151	0,357	151	0,625
	153	0,114				
					169	0,250



Продовж.табл.2

1	2	3	4	5	6	7
TGLA126					111	0,125
	113	0,045	113	0,214		
	115	0,591	115	0,357	115	0,125
	117	0,159	117	0,071	117	0,375
					119	0,125
	123	0,205	123	0,357		
					125	0,250
TGLA227			75	0,143		
	77	0,068			77	0,125
					79	0,500
	81	0,159				
	83	0,250	83	0,143		
	87	0,091	87	0,214	87	0,125
	89	0,182	89	0,143		
	91	0,205	91	0,214		
	93	0,023	93	0,071	93	0,250
ETH3			97	0,071		
	117	0,636	117	0,643	117	0,750
	119	0,091	119	0,286	119	0,250
	121	0,045				
	123	0,182				
	125	0,045				
ETH10			127	0,071		
	217	0,886	217	0,500	217	0,375
	219	0,114	219	0,286	219	0,625
			221	0,071		
ETH225			223	0,143		
	140	0,023	140	0,071	140	0,500
	144	0,045	144	0,143	144	0,125
	146	0,023	148	0,786	146	0,125
	148	0,295			148	0,250
	150	0,614				

3.Кількість алелів та ступені гетерозиготності за 11 мікросателітними локусами, що ідентифіковані у досліджуваних порід великої рогатої худоби

ЛОКУС	Порода					
	ШАРОЛЕ		СВІТЛА АКВІТАНСЬКА		СІРА УКРАЇНСЬКА	
	кількість алелів	ступінь гетерозиготності	кількість алелів	ступінь гетерозиготності	кількість алелів	ступінь гетерозиготності
BM1824	3	0,648	5	0,704	3	0,469
BM2113	5	0,660	4	0,684	4	0,406
INRA023	8	0,783	4	0,704	3	0,656
SPS115	5	0,654	5	0,612	5	0,750
TGLA53	9	0,835	5	0,474	3	0,484
TGLA122	4	0,527	4	0,704	3	0,531
TGLA126	4	0,582	4	0,694	5	0,750
TGLA227	7	0,812	7	0,837	4	0,766
ETH3	5	0,550	3	0,500	2	0,375
ETH10	2	0,201	4	0,643	3	0,469
ETH225	5	0,533	3	0,457	4	0,656

40 %, а в деяких випадках навіть більше 80 %, окрім локусу ETH10 у шароле та локусів ETH3 та ETH10 у сірої української порід.

Висновки:

1. Результати тестування за 11 мікросателітними локусами ДНК свідчать про високу гетерозиготність підконтрольних тварин м'ясних порід великої рогатої худоби та дають змогу оцінити рівень гомо- та гетерозиготності, визначити генетичний профіль за даними критеріями.

2. Мікросателітні маркери, що наведені в роботі, характеризуються високим поліморфізмом, що дозволяє їх ефективно використовувати при вивченні генетичної мінливості та в контролі походження великої рогатої худоби.

Бібліографічний список

1. Hirano T. Characterization of 42 highly polymorphic bovine microsatellite markers/ Hirano T., Nakane S., Mizoshita K. [et al.]. //Anim. Genet.- 1996.- 27(5).- P.365-368.
2. Ma R.Z. Isolation and characterization of 45 polymorphic microsatellites from the bovine genome/ Ma R.Z., Russ I., Park C. [et al.].// Anim. Genet.- 1996.- 27.- P.43-47.
3. Edwards A. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats/ Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T.//Am. J. Hum. Genet.- 1991.- 49.- P.746-756.
4. Janik A. Analysis of usefulness of 11 DNA microsatellites for parentage control in Limousine cattle /Janik A., Zabek T., Radko A. // Ann. Anim. Sci.- 2003.- 3.- P.11-20.
5. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers / Machugh D.P., Loftus R.T., Cunningham P. [et al.].// Anim. Genet.- 1998.- 29.- P. 333-340.
6. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds / Peelman L.J., Mortiaux F., A Van Zeveren [et al.].// Anim. Genet.- 1998.- 29.- P. 161-167.
7. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites / Moazami-Goudarzi K., Lalo D., Furet J.P. [et al.].// Anim. Genet.- 1997.- 28.- P. 338-345.
8. Martin-Burriel I. Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites / Martin-Burriel I., Garcia-Muro E., Zaragoza P.// Anim. Genet.- 1999.- 30.- P. 177-182.
9. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing / Heyen D.W., Beever J.E., Da Y., Evert R.E. [et al.].// Anim. Genet.- 1997.- 28.- P. 21-27.
10. Witek-Zawada B. Polimorfizm 11 loci mikrosatelitarnych u bydla rasy polskiej czerwonej / Witek-Zawada B., Radko A.// Rocz. Nauk. Zoot.- 2006.- 33.- Z.1.- P.5-12.
11. Ausubel F.M. Current protocols in molecular biology / [Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al.].// Greene Publishing Association.- Wiley-Interscience: New York.- 1992.- V.1.
12. GenePrintTM STR Systems (Silver Stain Detection) Technical Manual // Promega Corp. – 1998.- P. 1-4.
13. Маниатис Т. Молекулярное клонирование : Методы / Маниатис Т., Фрич Э. // Москва: Мир, 1984.- С.156-185.
14. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci/ Ziegle J.S., Ying Su., Corcoran K.P. [et al.]. / Genomics.- 1992.- №14.- P.1026-1031.



15. Polymorphism at microsatellite loci in Piedmontese cattle by automated DNA sizing technology / [Lubiennicka J., Grzybowski G., Grzybowski T., et al.]// Anim. Sci. Pap. And Rep.- 1999.- V.17.- P. 25-34.

16. Nei M. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance / Nei M., Roychoudhury A.K.// Genet.- 1974.- №76.- P. 379-390.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МЯСНЫХ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДНК

Шкавро Н.Н., Россоха В.И., Институт животноводства УААН

Радко А., Институт зоотехники, Польша

В статье приведены результаты исследований по изучению полиморфизма 11 микросателлитных локусов ДНК крупного рогатого скота трех пород. Идентифицировано 141 аллель путем автоматического анализа длин амплифицированных фрагментов с помощью ДНК-анализатора ABI PRISM 3110. Рассчитаны частоты аллелей и степени гетерозиготности. Наибольшее количество аллелей наблюдалось в локусе TGLA53 (9 аллелей) у коров породы шароле и TGLA227 (7 аллелей) в светлой аквитанской пород. Все микросателлитные ДНК маркеры показали высокий полиморфизм.

Ключевые слова: ДНК, микросателлитные локусы, полиморфизм, степень гетерозиготности.

GENETIC STRUCTURE ANALYSIS OF THE BEEF CATTLE BREEDS ON THE BASIS OF MICRO-SATELLITE DNA MARKERS USE

Shkavro N., Rossokha V.; Institute of animal science, UAAS

Radko A.; Zoo-technical institute, Krakiv, Poland

This article highlights the experimental research results on polymorphism 11 of micro-satellite DNA locus relevant to the three cattle breeds. 141 allele was identified by automatic length analysis of the amplified fragments. The above-mentioned allele was detected by ABI PRISM 3110 DNA-analyzer. Allele frequencies and hetero-zygote grades were computed. The top allele number was observed in TGLA 53 locus relevant to Sharole cattle breed. All the micro-satellite DNA markers displayed the top polymorphism.

Key words: DNA, micro-satellite locus, polymorphism, hetero zygot grade.