

УДК 636.2.082: 577.2

Росоха В.І., [©] к.с.-г.н., ст.н.с. (rossokha_v@mail.ru),**Шкавро Н.М.**, н.с. (shkavro@ukr.net),

Інститут тваринництва УААН, Харків

ПОШУК ПОРОДОСПЕЦИФІЧНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ДНК-МАРКЕРІВ ДЛЯ ТИПУВАННЯ БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

У статті наведені результати тестування представників трьох стад великої рогатої худоби – аборигенної сірої української та малочисельних на Україні шаролезької та світлої аквітанської порід за поліморфними мікросателітними локусами ДНК з метою пошуку унікальних породоспецифічних маркерних алелів. Для стада шаролезької породи виявлено п'ять статистично вірогідних алельних варіанти (за локусом INRA023 - алелі розміром 200 п.н. та 218 п.н., за локусом TGLA53 – 154 п.н. та 176 п.н. та за локусом ETH3 - 123 п.н.), а для вибірки тварин стада сірої української породи - шість унікальних (приватних) алелів (за локусом TGLA53 – 172 п.н., за локусом TGLA126 – 111 п.н. та 125 п.н., за локусом TGLA227 – 79 п.н., за локусом ETH225 – 152 п.н. та за локусом INRA023 – 196 п.н.), які характерні тільки для цих порід і не зустрічаються більше в інших досліджуваних породах великої рогатої худоби.

Ключові слова: ДНК, мікросателітні локуси, поліморфізм, маркерні алелі, велика рогата худоба.

Вступ. Важливим питанням, на якому сконцентровані зусилля багатьох вчених, є розробка нових високотехнологічних засобів збереження цінного генетичного матеріалу локальних порід великої рогатої худоби, а саме їх ДНК. Якщо ДНК підлягає довгостроковому зберіганню, необхідною вимогою є надання найбільш повної інформації про характер матеріалу, що зберігається, тож необхідним є наявність генетичного паспорта, а саме ДНК-паспорта, що базується на визначенні алельних варіантів високополіморфних мікросателітних послідовностей ДНК [1, 2]. Маркування зразків біоматеріалу для кріоконсервації за допомогою мікросателітів стає необхідним для їх ефективної ідентифікації після довготривалого зберігання.

Матеріали та методи. З метою ДНК-паспортизації окремих представників генетично цінних порід сільськогосподарських тварин, генетичний матеріал яких потребує глибокого вивчення та збереження, виявлення маркерних алелів, характерних певним породам, проводили дослідження геному 61 голови великої рогатої худоби, в тому числі 23 голови великої рогатої худоби породи шароле (ДП племзавод «Гонтарівка» ІТ УААН), 27 голів худоби сірої української породи та 11 голів світлої аквітанської породи (ДПДГ «Поліванівка» ІТЦР УААН), які складають племінне ядро

досліджуваних стад. ДНК видаляли зі 100 мкл периферійної крові, відібраної з хвостової вени в пробірки з антикоагулянтом ЕДТА, за використання протеїнази К (за методом Кавасакі з модифікаціями) [3, 4]. Мікросателітний поліморфізм був проаналізований, базуючись на 10 маркерах, що рекомендовані ISAG для диференціації порід великої рогатої худоби, а саме - BM1824, BM2113, INRA023, SPS115, TGLA53, TGLA126, TGLA227, ETH3, ETH10, ETH225. Мікросателітні локуси були ампліфіковані за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Використовували термоциклер БіоКом (Росія), 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 полімеразу (5U/ μ L) та по 2.5 pmol кожного з праймерів. Загальний об'єм суміші – 14 мкл. Досліджувану ДНК додавали об'ємом 1,0 мкл.

Реакцію проводили в наступному температурному режимі: початкова денатурація – 95 °C – 5 хв; 31 цикл за схемою: денатурація – 94 °C – 45 с; відпал праймерів – 61 °C – 45 с; синтез – 72 °C – 60 с; заключний синтез – 72 °C – 60 хв.

Аналіз продуктів ампліфікації проводили методом капілярного електрофорезу на ДНК-секвенаторі ABI PRISM 3110 (фірми Applied Biosystems). Як стандарт розмірів фрагментів ДНК використовували маркер ROX-350.

Результати дослідження.

В результаті тестування великої рогатої худоби трьох стад досліджуваних порід за 10-ма мікросателітними локусами ДНК, ідентифіковано 152 алелі, серед яких 55 алелів – у шаролезької, 48 – у сірої української та 49 – у світлої аквітанської порід.

Найбільша кількість алелів спостерігалась у локусі TGLA53 (10 алелів) у великої рогатої худоби породи шароле та в локусах TGLA53 (8 алелів) у світлої аквітанської та TGLA227 (8 алелів) у сірої української порід. Інші алелі показали досить рівномірний розподіл у специфічних локусах (в локусі INRA023 по 6 алелів у шаролезької та сірої української порід, також по 6 алелів відмічено в локусах ETH225 та TGLA126 у сірої української, TGLA227 та SPS115 у шаролезької та 7 алелів в локусі TGLA227 у світлої аквітанської порід, для локусів BM2113, ETH10, TGLA122, ETH3 та BM1824 - від 3 до 5 алелів). Найменше число алелів відмічено в локусі ETH10 у шароле, за яким було ідентифіковано два алелі. Були розраховані частоти алелів у специфічних локусах та критерії достовірності зустрічання алелю в популяції (за критерієм Стьюдента - t - достовірність коефіцієнту кореляції вибіркового значення частоти алелю з генеральною сукупністю), значення проаналізованих параметрів наведені в таблиці 1.

Спираючись на отримані дані за визначенням критерію Стьюдента (див. табл. 1), можна стверджувати, що досліджувана вибірка є репрезентативною, тобто відображає характерні особливості досліджуваних стад.

Таблиця 1

Частоти алелів мікросателітних локусів, що ідентифіковані за трьома досліджуваними породами великої рогатої худоби

Локус	шароле		сіра українська	світла аквітанська
	алель (п.н.)	частота алелів	частота алелів	частота алелів
1	2	3	5	7
BM 1824	178	0,152 ± 0,053**	0,037 ± 0,026	0,273 ± 0,095*
	180		0,167 ± 0,051**	0,045 ± 0,044
	182	0,457 ± 0,073***	0,444 ± 0,068***	0,364 ± 0,103**
	188	0,391 ± 0,072***	0,352 ± 0,065***	0,273 ± 0,095*
	190			0,045 ± 0,044
BM 2113	131	0,217 ± 0,061**		0,091 ± 0,061
	133	0,065 ± 0,036	0,630 ± 0,066***	0,136 ± 0,073
	135	0,174 ± 0,056**	0,130 ± 0,046**	0,227 ± 0,089*
	137	0,500 ± 0,074***	0,167 ± 0,051**	0,273 ± 0,095*
	139	0,022 ± 0,022	0,056 ± 0,031	0,273 ± 0,095*
INRA 023	196		0,259 ± 0,060***	
	198	0,043 ± 0,030		
	200	0,174 ± 0,056**		
	206	0,391 ± 0,072**	0,204 ± 0,055***	0,409 ± 0,105**
	208		0,111 ± 0,043*	0,091 ± 0,061
	212	0,043 ± 0,030	0,315 ± 0,063***	0,091 ± 0,061
	214	0,217 ± 0,061**	0,056 ± 0,031	0,364 ± 0,103**
	216		0,056 ± 0,031	
	218	0,087 ± 0,042*		
TGLA 53	154	0,109 ± 0,046*		
	158	0,043 ± 0,030		0,045 ± 0,044
	160	0,065 ± 0,036	0,100 ± 0,041*	0,136 ± 0,073
	162	0,065 ± 0,036	0,040 ± 0,027	0,091 ± 0,061
	164	0,022 ± 0,022		0,273 ± 0,95*
	166	0,174 ± 0,056**	0,320 ± 0,063***	0,136 ± 0,073
	168	0,043 ± 0,030	0,380 ± 0,066***	0,136 ± 0,073
	170	0,326 ± 0,069***		0,045 ± 0,044
	172		0,160 ± 0,050**	
	176	0,109 ± 0,046*		
	184	0,043 ± 0,030		0,045 ± 0,044
SPS 115	248	0,565 ± 0,073***	0,635 ± 0,066***	0,636 ± 0,103***
	252	0,022 ± 0,022	0,115 ± 0,043*	0,045 ± 0,044
	254	0,174 ± 0,056**	0,019 ± 0,019	0,136 ± 0,073
	256	0,152 ± 0,053**	0,019 ± 0,019	
	260	0,065 ± 0,036	0,212 ± 0,056***	0,182 ± 0,082*

1	2	3	5	7
TGLA 227	77	0,065 ± 0,036	0,185 ± 0,053**	0,045 ± 0,044
	79		0,111 ± 0,043*	
	81	0,174 ± 0,056**	0,019 ± 0,018	
	83	0,283 ± 0,066***	0,056 ± 0,031	0,136 ± 0,073
	87	0,109 ± 0,046*	0,148 ± 0,048**	0,136 ± 0,073
	89	0,174 ± 0,056**	0,185 ± 0,053**	0,273 ± 0,095*
	91	0,174 ± 0,056**		0,227 ± 0,089*
	93		0,222 ± 0,057***	0,136 ± 0,073
	97		0,037 ± 0,026	0,045 ± 0,044
TGLA 126	111		0,083 ± 0,038*	
	113		0,042 ± 0,027	
	115	0,630 ± 0,071***	0,292 ± 0,062***	0,409 ± 0,105**
	117	0,196 ± 0,058**	0,292 ± 0,062***	0,182 ± 0,082*
	119		0,063 ± 0,033	0,091 ± 0,061
	123	0,174 ± 0,056**		0,318 ± 0,099**
	125		0,208 ± 0,055***	
ETH 3	115		0,037 ± 0,026	
	117	0,652 ± 0,070***	0,611 ± 0,066***	0,636 ± 0,103***
	119	0,087 ± 0,042*	0,259 ± 0,060***	0,273 ± 0,095
	121	0,022 ± 0,022		0,091 ± 0,061
	123	0,174 ± 0,056**		
	125	0,043 ± 0,030	0,093 ± 0,039	
ETH 10	217	0,891 ± 0,046***	0,426 ± 0,067***	0,727 ± 0,095***
	219	0,109 ± 0,046*	0,426 ± 0,067***	0,182 ± 0,082*
	221		0,148 ± 0,048**	0,045 ± 0,044
	223			0,045 ± 0,044
ETH 225	140	0,022 ± 0,022	0,333 ± 0,064***	0,091 ± 0,061
	144	0,065 ± 0,036	0,093 ± 0,039*	0,273 ± 0,095*
	146	0,022 ± 0,022	0,037 ± 0,026	0,045 ± 0,044
	148	0,239 ± 0,063***	0,167 ± 0,051**	0,545 ± 0,106***
	150	0,652 ± 0,070***	0,278 ± 0,061***	0,045 ± 0,044
	152		0,093 ± 0,026*	

Примітка: ± - статистична похибка частот алелів;

достовірність зустрічання алелю в популяції при *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Аналіз отриманих даних свідчить, що за локусом TGLA53 визначено найбільшу кількість алелів (10) у великої рогатої худоби породи шароле, де з найвищою частотою виступає алель довжиною 170 пн (0,326), а з найменшою – алель 164 пн (0,022). Спостерігається найбільша різниця в частотах алелів між трьома досліджуваними породами за алелями 170 пн та 164 пн. Так, вони зовсім відсутні у сірої української породи, а в світлої аквітанської,

на протывагу до шароле, з найвищою частотою виступає алель довжиною 164 пн (0,273), а з найменшою – алель 170 пн (0,045). За локусом TGLA227 ідентифіковано велику кількість алелів розміром від 77 до 97 пн (8 алелів у сірої української та 7 алелів у світлій аквітанській порід). Серед визначених алелів з найвищою частотою у шаролезької породи зустрічається алель 83 пн (0,283), алель 93 пн у сірої української (0,222) та алель розміром 89 пн (0,273) у світлій аквітанській порід. Інші алелі показали досить рівномірний розподіл - від 0,056 (83 пн) до 0,174 (89 пн). Локус ETH10 представлений найменшою кількістю алелів – від 2 у шароле до 4 у світлій аквітанській порід. З найбільшою частотою виступає алель 217 пн, у шаролезької породи він зустрічається майже в 90% випадках, у світлій аквітанській – більш ніж 70% та майже 50% – у сірої української порід. Алелі розміром 221 пн та 223 пн зустрічаються з низькою частотою у досліджених представників світлій аквітанській (по 0,045) та з частотою 0,148 (221 пн) сірої української порід. За локусом BM1824 ідентифіковано найбільшу кількість алелів – 5 у світлій аквітанській породи, найменшу – 3 у шароле. Серед визначених алелів з найвищою частотою, за всіма трьома дослідженими породами великої рогатої худоби, виступав алель довжиною 182 пн (у шароле = 0,457, у сірої української = 0,444 та у світлій аквітанській = 0,364), алель довжиною 188 пн також показав схожу частоту за всіма трьома породами, однак алель довжиною 178 пн у шароле та сірої української порід показав найнижчу частоту, хоча у світлій аквітанській породи він зустрічався значно частіше, а найнижчу частоту в цій породи показали алелі довжиною 180 та 190 пн (по 0,045). За локусом INRA023 у великої рогатої худоби шаролезької породи ідентифіковано алелі довжиною від 198 пн до 218 пн, а в сірої української породи ще й алель довжиною 196 пн. У шароле з найвищою частотою представлений алель 206 пн (0,391) так само, як і в світлій аквітанській породи (0,409), з низькою частотою в цих породах представлені алелі 212 пн, хоча у сірої української худоби цей алель виступає з найвищою частотою (0,315). Для локусу SPS115 ідентифіковано алелі довжиною від 248 пн (саме цей алель виступає з найвищою частотою у всіх трьох дослідних породах великої рогатої худоби) до 260 пн. Серед всіх 5 алелів алель розміром 248 пн зустрічається більш ніж в 60% випадках. За локусом TGLA126 у великої рогатої худоби сірої української породи виявлена найбільша кількість алелів розміром 115 пн та 117 пн (по 0,292). Алель 115 пн також показав найвищу частоту і в інших двох породах – шаролезькій та світлій аквітанській (з частотою 0, 630 та 0, 409 відповідно). Найменше по сірій українській породи представлений алель 113 пн (0,042), який зовсім відсутній в інших двох породах. У світлій аквітанській породи алель 123 пн зустрічається досить часто (0,318), а в шароле він показав найнижчу частоту (0,174) і зовсім відсутній у сірої української породи. За локусом ETH225 з найменшою частотою за всіма трьома дослідними породами виступає алель довжиною 146 пн (від 0,022 до 0,045). З високою частотою представлений алель 150 пн у шаролезької та сірої української порід (0,652 та 0,278 відповідно), хоча у представників світлій аквітанської породи він зустрічається досить рідко (0,045). З найбільшою частотою по цій

породі представлений алель довжиною 144 пн (0,273). Інші алелі показали рівномірний розподіл в досліджених породах.

В результаті проведеного аналізу розподілу частот алелів досліджуваних мікросателітних локусів, знайдено маркерні алелі, характерні для певних порід. Так, для стада шаролезької породи за локусом INRA023 виявлено алелі розміром 200 п.н. та 218 п.н., за локусом TGLA53 – алелі 154 п.н. та 176 п.н. та за локусом ETH3 алель довжиною 123 п.н. Всього виявлено п'ять унікальних алельних варіантів мікросателітних локусів, що характерні тільки для шаролезької породи і не зустрічаються більше в двох інших досліджуваних породах.

Для досліджуваного стада сірої української породи також виявлено шість унікальних (приватних) алелів – за локусом TGLA53 – 172 п.н., за локусом TGLA126 – 111 п.н. та 125 п.н., за локусом TGLA227 – 79 п.н., за локусом ETH225 – 152 п.н. та за локусом INRA023 – 196 п.н.

Визначені унікальні алелі можуть виступати в якості високоінформативних породоспецифічних генетичних маркерів при ідентифікації біологічних зразків невідомого походження, або, наприклад, при ідентифікації зразків після довготривалого зберігання. Таким чином, проведені пілотні дослідження, звичайно, вони потребують подальшого доповнення та модифікацій, за вивчення більшої кількості тварин для ефективного формування панелі мікросателітних маркерів, що відображають характерні особливості конкретної породи та популяції в цілому.

Таким чином, спираючись на дані про частоти зустрічання алелів в специфічних мікросателітних локусах ДНК, можна з високою вірогідністю підтверджувати походження (батьківство), приналежність окремих індивідів до визначеної породи, а також вивчати та доповнювати інформацію про породну насиченість специфічними ДНК-маркерами.

Висновки. В результаті проведених досліджень виявлені найбільш поліморфні локуси: TGLA53 для шаролезької породи (10 алелів) та TGLA227 для сірої української породи (8 алелів). Визначені унікальні статистично вірогідні маркерні алельні варіанти мікросателітних локусів, характерні для популяційної вибірки двох стад: INRA023 - 200п.н., 218 п.н.; TGLA53 –154 п.н., 176 п.н.; ETH3 - 123 п.н. (стадо шаролезької худоби племзаводу «Гонтарівка») та TGLA53 – 172 п.н.; TGLA126 – 111 п.н., 125 п.н.; TGLA227 – 79 п.н.; ETH225 – 152 п.н.; INRA023 – 196 п.н. (стадо сірої української худоби племзаводу «Поліванівка»).

Література

1. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г.Е. Сулимова // Успехи соврем. биологии. - 2004. - Т.124. - № 3. - С. 260-271.

2. Williams J.L. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology / J.L. Williams // Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. – 2005. – 24(1). – P. 379-391.

3. Kawasaki E. S. Sample preparation from blood, cells and other fluids / Eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. - San Diego. - 1990. - P. 146-152.

4. Coppieters W. Rechtstreekse genotypering von stress (on) gevoelligheit bij verkens met behulp met van DNA ondrzoek / Van Zeveren A., Van De Weghe A., Peelm L., Bouguet Y // Vlaams Diergeneeskunding Tijdschrift. -1992. – 61. – P. 68-72.

Summary

Rossokha V., Shkavro N.

Institute of animal science UAAN, Kharkov, Ukraine

THE SEARCH OF BREEDSPECIFIC GENETIC DNA MARKERS FOR TYPING OF CATTLE BIOLOGICAL MATERIAL

This article highlights the polymorphism of 11 microsatellite DNA markers testing results of herds of native Gray Ukrainian and small number of animal Charolais and Akvitans cattle breeds for the unique breedspecific markers alleles search. For the herds of Charolais breed was identified the five statistically reliable allelic variants (for loci INRA023 – alleles by length 200 bp and 218 bp, for loci TGLA53 – 154 bp and 176 bp, for loci ETH3 - 123 bp), and for the herds of grey Ukrainian breed - six unique (prived) alleles (for loci TGLA53 – 172 bp, for loci TGLA126 – 111 bp and 125 bp, for loci TGLA227 – 79 bp, for loci Etn225 – 152 bp, and also for loci INRA023 – 196 bp).

Keywords: DNA, microsatellite loci, polymorphism, marker allele, cattle.

Стаття надійшла до редакції 4.03.2010