

УДК 575:636.082

ДУБІН О.В., канд. с.-г. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

## ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА *BoLa-DRB3* В УКРАЇНСЬКІЙ ЧОРНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ХУДОБИ

Вперше в Україні проведено аналіз алельної різноманітності 2 екзону гена гістосумісності бичачих (*BoLa-DRB3.2*) у стаді великої рогатої худоби української чорно-рябої молочної породи СТОВ «Агросвіт». За використання методу ПЛР-ПДРФ аналізу виявлено 9 алелів цього гена: *BoLa-DRB3.2\*03*, *\*07*, *\*15*, *\*16*, *\*19*, *\*22*, *\*23*, *\*24* та *\*25*. Встановлено, що у генотипах досліджених тварин переважали 4 алелі, частка яких становила 73,5 % від загальної кількості детектованих алелів: *DRB3\*16* (23,5 %), *\*24* (20,6 %), *\*03* (14,7 %) та *\*15* (14,7 %). Високий рівень гомозиготності дослідженої вибірки тварин за геном *BoLa-DRB3*, про що свідчить позитивне значення індексу інбридингу ( $F=0,511$ ), може вказувати на зниження адаптаційного потенціалу стада, а відтак, про необхідність практичного впровадження генетичної експертизи худоби за цим геном.

**Ключові слова:** *BoLa-DRB3.2*, ПЛР-ПДРФ, алельна різноманітність, українська чорно-ряба молочна порода великої рогатої худоби.

**Постановка проблеми.** Досягнення в галузі молекулярної генетики тварин дають змогу характеризувати генетичні процеси, які відбуваються у природних чи штучних популяціях, та проводити цілеспрямований відбір тварин за бажаними корисними ознаками. Нині технологію генетичних маркерів (MAS – Marker Assisted Selection) активно застосовують українські вчені для аналізу, головним чином, генів кількісних ознак, асоційованих з показниками молочної та м'ясної продуктивності великої рогатої худоби. Значно менше уваги приділяється генетичним маркерам, які визначають резистентність тварин до інфекційних захворювань. До таких маркерів належать гени головного комплексу гістосумісності (ГКГ), які, за сучасними уявленнями, є ключовим елементом імунної відповіді в усіх хребетних тварин.

Гени ГКГ бичачих було картовано на 23-ій хромосомі (BTA 23) і названо антигенами лімфоцитів великої рогатої худоби (*BoLa*, Bovine Lymphocyte antigen). Незважаючи на окремі відмінності, система ГКГ у ссавців має схожу генетичну організацію і складається з генів трьох класів (I, II і III), серед яких найбільш поліморфними є гени I та II класів [1].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Починаючи з 90-х років минулого століття, у всьому світі активно провадять дослідження нуклеотидного поліморфізму генів ГКГ та пошук маркерів стійкості або чутливості до інфекційних захворювань різної етіології у великої рогатої худоби. Одним із методів аналізу поліморфізму генів II класу комплексу *BoLa* є ПЛР-ПДРФ (полімеразна ланцюгова реакція – аналіз поліморфізму рестрикційних фрагментів), який було запропоновано у 1992 р. [2]. Сутність методу полягає в ампліфікації 2-го екзону гена *BoLa-DRB3* та типуванні алелів гена за картоною рестрикції 3 ендонуклеаз: *RsaI*, *HaeIII* та *BstYI*. Нині вже розроблено міжнародну номенклатуру ISAG для більш як 54 алелів цього гена.

Результатом інтенсивного відбору поголів'я великої рогатої худоби за показниками молочної продуктивності та поліпшення якісних характеристик молока є зменшення алельної різноманітності за геном *BoLa-DRB3*. Як свідчать проведені зарубіжними вченими дослідження, у комерційних порід худоби найчастіше зустрічаються лише 5–7 алелів. Так, у голштинської породи найчастіше зустрічаються алелі *DRB3\*3*, *\*7*, *\*8*, *\*16*, *\*22*, *\*23* і *\*24*, у чорно-рябої – *DRB3\*22*, *\*24*, *\*11*, і *\*16* [3–4]. Відмічають також як породоспецифічний характер розподілу окремих алельних варіантів гена *BoLa-DRB3*, так і різний рівень гомозиготності досліджених стад.

**Метою** нашого дослідження було оцінювання алельної різноманітності гена *BoLa-DRB3.2* у стада корів української чорно-рябої молочної породи СТОВ «Агросвіт».

**Матеріал і методика досліджень.** Матеріалом для досліджень слугувала периферійна кров корів української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби (СТОВ «Агросвіт» Миронівського р-ну Київської обл.,  $n=30$ ).

Препарати ДНК виділяли методом сорбування на силіцій оксиді [5] з власними модифікаціями. ПЛР проводили на ампліфікаторі “Терцик” (ДНК-технологія, Росія) з

праймерами HLO30 (CCTCTCTCTGCAGCACATTTCC) і HLO32 (CCGCTGCACAGTGAААСТСТС) за наступного температурного режиму: 4 хв за 94 °С; 36 циклів: 30 с за 94 °С, 30 с за 67 °С, 30 с за 72 °С; 5 хв за 72 °С. Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: 67 мМ Tris-HCl (рН 8,8), 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 1 од. Tag-полімерази, 50 нг ДНК, 2,0 мМ MgCl<sub>2</sub> та по 0,3 мкМ кожного праймера.

Рестрикцію продуктів ПЛР проводили ендонуклеазами *RsaI*, *HaeIII* та *BstYI* ("Сибензим", Росія) відповідно до рекомендацій виробника. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції проводили у 7 % або 12 %-му поліакриламідному гелі (ПААГ) у 1×TBE-буфері. Візуалізацію ДНК-бендів здійснювали їх фарбуванням нітратом срібла [6].

Молекулярний розмір продуктів рестрикції визначали за допомогою маркера GeneRuler 20 bp ("Fermentas", Литва), використовуючи програмний пакет Quantity One<sup>®</sup> Version 4.6.3 ("BioRad", США). Генотипи досліджених тварин визначали за [2]. Математичну обробку результатів проводили за використання спеціалізованого макроса GenAlEx6 для MS EXCEL [7].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Ампліфікацію поліморфної ділянки 2-го екзону гена BoLa-DRB3 з молекулярним розміром 284 п.н. проводили за використання праймерів HLO30 та HLO32 методом одноетапної ПЛР. Послідовність праймера HLO30 комплементарна 5'-кінцевій ділянці 2 екзону (сім нуклеотидів) і прилеглої інтронної ділянки. Праймер HLO32 повністю локалізований у 3'-кінцевій ділянці 2 екзону.

У більшості випадків рестрикційний аналіз продуктів ПЛР проводили за використання 2-х ендонуклеаз: *RsaI* та *HaeIII*. Рестриктазу *BstYI* застосовували лише у випадках однакового молекулярного розміру ДНК-патернів за рестриктазами *RsaI* і *HaeIII*. Під час типування алелів гена BoLa-DRB3 за використання 7 % ПААГ виникали труднощі з визначенням розмірів продуктів рестрикції та типуванням алелів, що мають дилеції (наприклад у випадку алелів DRB3\*08 і DRB3\*07), оскільки окремі фрагменти різнились лише одним-трьома нуклеотидами. У цих випадках для точного встановлення молекулярного розміру використовували 12 % ПААГ. Приклади отриманих електрофореграм наведено на рисунку 1.

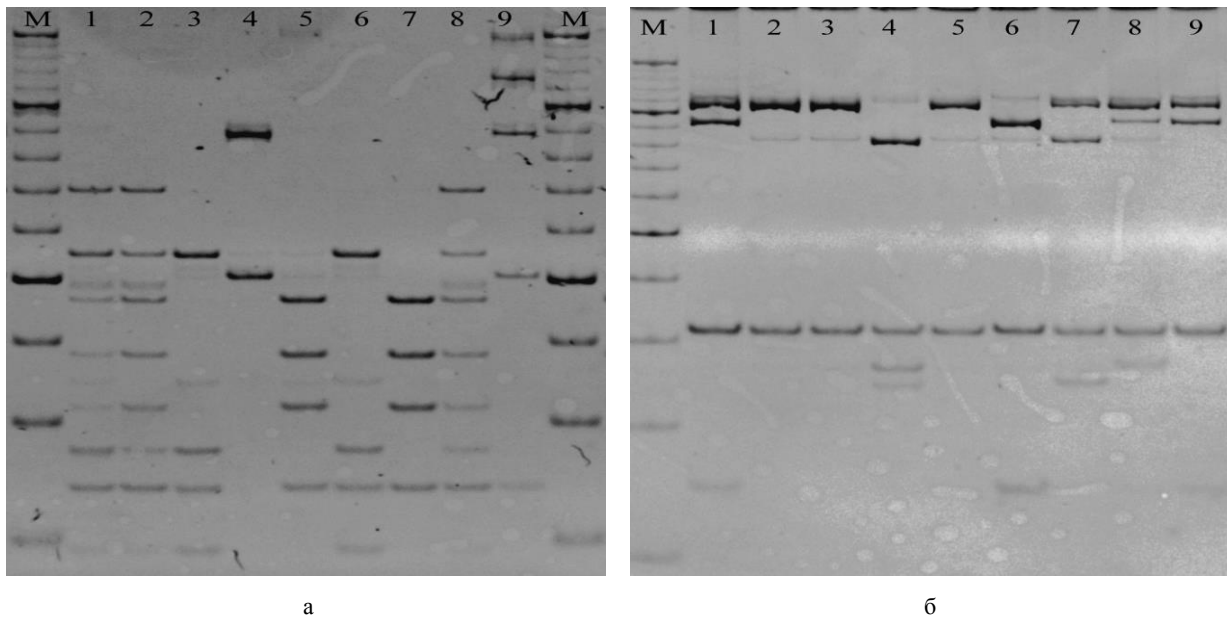


Рис. 1. Електрофореграми розділення продуктів рестрикції гена BoLa-DRB3.2, отримані за використання ендонуклеаз *RsaI* (а) та *HaeIII* (б): М – маркер GeneRuler 20 bp ("Fermentas", Литва), 1–9 – досліджені тварини.

У дослідженій вибірці тварин СТОВ «Агросвіт» виявлено 9 алелів гена BoLa-DRB3: DRB3\*03, \*07, \*15, \*16, \*19, \*22, \*23, \*24 і \*25 (табл. 1). У генотипах тварин переважали 4 алелі: DRB3\*16 (24 %), \*24 (21 %), \*03 (15 %) та \*15 (15 %), що в сумі становили 75 % від загальної кількості. Алелі DRB3\*23, \*25, \*22 та \*19 було детектовано лише в окремих тварин з частотою не більш як 6 %. Розподіл частот генотипів за геном BoLa-DRB3 достовірно відрізнявся від стану рівноваги за Харді-Вайнбергом внаслідок надлишку гомозиготних генотипів ( $P < 0,001$ ).

Таблиця 1 – Розподіл частот алелів гена *BoLa-DRB3* у дослідженому стаді *УЧРМ* породи *ВРХ*

Алелі <i>DRB3</i>	Молекулярний розмір продуктів рестрикції, п.н.			Частота
	<i>RsaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>BstYI</i>	
<i>DRB3*03</i>	111, 54, 50, 39, 30	219, 65	284	0,147
<i>DRB3*07</i>	141, 51, 50, 39	167, 65, 52	196, 85	0,088
<i>DRB3*15</i>	180, 54, 50	167, 65, 52	284	0,147
<i>DRB3*16</i>	93, 78, 63, 50	190, 65, 29	284	0,235
<i>DRB3*19</i>	141, 93, 50	219, 65	284	0,029
<i>DRB3*22</i>	111, 104, 69	167, 65, 52	284	0,059
<i>DRB3*23</i>	180, 104	167, 65, 29	284	0,059
<i>DRB3*24</i>	180, 104	219, 65	284	0,206
<i>DRB3*25</i>	284	167, 65, 48	284	0,029

На основі розрахунку алельних частот визначено основні показники генетичної мінливості дослідженого стада великої рогатої худоби, які становили: ефективне число алелей ( $n_e$ ) – 6,352, інформаційний індекс Шеннона (I) – 1,985, індекс фіксації Райта (F) – 0,511, очікувана та наявна гетерозиготності – 0,843 і 0,412 відповідно. Отримані результати дають змогу оцінити рівень генетичної мінливості за геном *BoLa-DRB3* у дослідженому стаді, прогнозувати можливі зміни показників різноманітності за умови проведення генетичного моніторингу та використання його результатів у селекційному процесі.

У дослідженій нами вибірці корів української чорно-рябої молочної породи, незважаючи на невелику кількість тварин, спостерігали тенденцію до переважання окремих алелів (*DRB3\*16*, *\*24*, *\*03* та *\*15*), з яких лише алель *DRB3\*15* не є характерним для голштинської або голштинізованої худоби. Слід також відмітити високий рівень гомозиготності дослідженого стада, про що свідчить високе позитивне значення індексу інбридингу Райта ( $F=0,511$ ). Такий низький рівень алельної різноманітності за геном гістосумісності може негативно вплинути у майбутньому як на адаптаційні можливості тварин, так і на їх продуктивні якості. З огляду на це, у селекційній роботі рекомендується застосовувати плідників, генотипи яких за локусом *BoLa-DRB3* не містять алельних варіантів, які часто зустрічаються у генотипах корів стада.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Таким чином, було досліджено алельну різноманітність стада корів чорно-рябої породи СТОВ «Агросвіт» за геном *BoLa-DRB3*. Встановлено високий рівень гомозиготності дослідженої вибірки тварин. Отримані результати свідчать про необхідність застосування цього типу генетичних маркерів у селекційній практиці з метою підвищення як загального рівня генетичної різноманітності, так і стійкості тварин до інфекційних захворювань.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Takeshima N. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex / N. Takeshima, Y. Aida // *Animal Sci. J.* – 2006. – Vol. 77. – P. 138–150.
2. Van Eijk M.J.T. Extensive polymorphism of the *BoLA-DRB3* gene distinguished by PCR-RFLP / M.J.T. van Eijk, J.A. Stewart-Haynes, H.A. Lewin // *Anim. Gen.* – 1992. – Vol. 23. – P. 483–496.
3. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen (*BoLA-DRB3*) Alleles in Iranian Holstein cattle / [Nassiry M.R., Shahroodi F.E., Mosafer J. et al.] // *Anim. Genet.* – 2005. – Vol. 41, № 6. – P. 817–822.
4. Генетические механизмы устойчивости и чувствительности к лейкозу у айрширской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота, установленные на основании распределении аллелей гена *BoLA-DRB3* / [Удина И.Г., Карамышева Е.Е., Туркова С.О. и др.] // *Генетика.* – 2003. – Т. 39, № 3. – С. 383–396.
5. Carter M.J. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles / M.J. Carter, I.D. Milton // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – Vol. 21. – P. 1044–1046.
6. An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels / [Han Y.C., Teng C.Z., Hu Z.L., Song Y.C.] // *Electrophoresis.* – 2008. – Vol. 29. – P. 1355–1358.
7. Peakall R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // *Mol. Ecol. Notes.* – 2006. – Vol. 6. – P. 288–295.

**Полиморфизм гена BoLa-DRB3 в украинского черно-пестрого молочного скота**

**А.В. Дубин**

Впервые в Украине проведен анализ аллельного разнообразия 2 экзона гена гистосовместимости бычьих (BoLa-DRB3.2) в стаде крупного рогатого скота украинской черно-пестрой молочной породы ООО «Агросвит». При использовании метода ПЦР - ПДРФ анализа выявлено 9 аллелей этого гена: BoLA - DRB3.2 \* 03, \*07, \*15, \*16, \*19, \*22, \*23, \*24 и \*25. Установлено, что в генотипах исследованных животных преобладали 4 аллеля, доля которых составила 73,5 % от общего количества детектированных аллелей: DRB3 \* 16 (23,5 %), \*24 (20,6 %), \*03 (14,7 %) и \*15 (14,7 %). Высокий уровень гомозиготности исследованной выборки животных по гену BoLa-DRB3, о чем свидетельствует положительное значение индекса инбридинга ( $F = 0,511$ ), может указывать на снижение адаптационного потенциала стада, а следовательно о необходимости практического внедрения генетической экспертизы скота за этим геном.

**Ключевые слова:** BoLa-DRB3.2, ПЦР-ПДРФ, аллельное разнообразие, украинская черно-пестрая молочная порода крупного рогатого скота.

*Надійшла 12.09.2013 р.*