УДК 575.164

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНАПРИОННОГО БЕЛКА, АССОЦИИРОВАННОГО С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К СКРЕПИ У ОВЕЦ

О. А. Епишко, А. В. Песняк, Е. С. Чебуранова

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,
г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by)

Ключевые слова: *скрепи, ПЦР-ПДРФ, PRNP, овцы.*

Аннотация. *В результате проведенных исследований разработаны методические подходы проведения ПЦР-ПДРФ-анализа гена прионного белка (PRNP), ассоциированного с генетической устойчивостью к скрепи у овец, подобраны оптимальные режимы, объемы и концентрация реакционных смесей, режимы амплификации и рестрикции, что позволит в дальнейшем проводить генотипирование животных в раннем возрасте или при рождении, тем самым вести целенаправленную селекцию на устойчивость овец к скрепи, что будет способствовать интенсификации селекционного процесса в овцеводстве Республики Беларусь.*

METHODOLOGICAL ASPECTS OF DETERMINING THE PRION PROTEIN GENE ASSOCIATED WITH GENETIC RESISTANCE TO SCRAPIE IN SHEEP

O. A. Epishko, A. V. Pesnyk, E. S. Cheburanova

EI «Grodno state agrarian university»
Grodno, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 230008, Grodno,
28 Tereshkova st.; e-mail: ggau@ggau.by)

Key words: *scrape, PCR-RFLP, PRNP, sheep.*

Summary. *As a result of the studies, methodological approaches have been developed for PCR-RFLP analysis of the prion protein gene (PRNP) associated with genetic resistance to scrapie in sheep, optimal modes, volumes and concentration of reaction mixtures, amplification and restriction modes have been selected, which will allow further genotyping of animals. at an early age or at birth, thereby conducting targeted selection for the resistance of sheep to scrapie, which will contribute to the intensification of the selection process in sheep breeding in the Republic of Belarus.*

(Поступила в редакцию 01.06.2021 г.)

Введение. Овцеводство как одна из отраслей животноводства всегда являлось неотъемлемой частью народнохозяйственного комплекса страны [1]. На 01.01.2020 г. в республике имелось всего

РЕПОЗИТОРИЙ ГГАУ

87,7 тыс. голов овец, в т. ч. в общественном секторе – 13,5 тыс., в фермерских хозяйствах – 16,1 тыс., в частном секторе – 58,1 тыс. голов овец [1]. Скрепи является смертельным нейродегенеративным заболеванием овец, которое встречается в двух формах: классической и атипичной. Краеугольным камнем программ ликвидации скрепи является отбор устойчивых к скрепи генотипов для ликвидации классической скрепи. Передача классической скрепи у овец происходит в пренатальный и перинатальный периоды, когда ягнята очень восприимчивы к заболеванию [7]. В отличие от классического скрепи атипичная скрепи, как полагают, является спонтанным заболеванием, которое возникает в отдельных случаях у пожилых животных в стаде. Животные в результате заражения, как правило, гибнут. Лечение скрепи возможно только симптоматическое, специфических методов лечения на данный момент не разработано. При появлении случаев заражения скрепи в хозяйстве любой страны проводят жесткую выбраковку с последующим убоем всех больных и подозреваемых в заболевании животных. При этом мясо таких животных запрещено использовать в пищу. Современные концепции животноводства требуют разработки диагностических платформ ранней профилактики обнаружения патогена и формирования генетически резистентных пород, что, в свою очередь, является необходимым условием производства безопасных для человека продуктов питания и формирования стад, свободных от скрытого носительства болезней. Одним из методов диагностики скрепи является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

Породный состав имеющегося в стране поголовья овец представлен в настоящее время следующими породами: прекос, тексель, романовская, суффолк, мероноландшаф, асканийская, иль-де-франс, лакаюне и др. [1].

Изучаемое заболевание относится к болезни трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (ТГЭ). О наличии у животных этой прионной инфекции обычно судят по обнаружению в лимфоретикулярной ткани или ЦНС модифицированного прионного белка PrP^{Sc}. Обнаружение PrP^{Sc} в лимфоидной ткани пищеварительного тракта 2-месячных ягнят из неблагополучных по скрепи стад свидетельствует о том, что их заражение прионом произошло inutero или сразу после рождения пероральным путем. Основным источником инфекции, по всей видимости, является плацента, содержащая PrP^{Sc} в высокой концентрации. К числу других потенциальных источников возбудителя скрепи относят фекалии, слюну, мочу, молозиво, молоко и кровь [2].

РЕПОЗИТОРИЙ ГГАУ

Одной из особенностей прионного патогена является его высокая выживаемость в среде обитания. В частности, в Исландии были установлены случаи рецидивов скрепи через 14-21 лет после уничтожения зараженных стад овец и тщательной дезинфекции помещений для животных. В настоящее время не существует эффективных способов лечения прионных заболеваний [3, 4]. Однако с помощью ПЦР-диагностики возможно выявление прионных белков, детерминирующих восприимчивость либо устойчивость овец к скрепи.

PrP^{C} (аббревиатура от англ. – PrionProteinof Cell) – неинфекционный прионный белок (клеточный), является жизненно необходимым белком. Нормальный прионный белок PrP^{C} играет чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности организма: участвует в передаче нервных импульсов, посредством которых передаются приказы из центральной нервной системы органам-исполнителям, а от них идет информация в центр управления – головной мозг, также клеточный прионный белок играет определяющую роль в поддержании т. н. «циркадианных» ритмов, регулируя суточные циклы активности и покоя в клетках, органах и в организме в целом [4].

PrP^{Sc} (PrPd) – инфекционный прионный белок, считается, что PrP^{Sc} является мутацией PrP^{C}. Большинство экспериментальных данных свидетельствует о том, что формирование патогенного белка PrP^{Sc} происходит из-за конформационного перехода нормального клеточного белка в изоформу с уменьшением α-спиралей молекулы с 42 до 21 %.

Механизм накопления инфекционного прионного белка в зараженном организме на сегодняшний день точно не известен. Однако имеющиеся сведения и представление о том, что это посттрансляционный процесс, дают основание считать, что инфицирующий прионный белок вызывает в здоровом до этого организме трансформацию нормального (клеточного) прионного белка в его инфекционную форму за счет его конформационных (пространственных) изменений [4].

Учеными было доказано, что прионы обладают способностью адаптироваться к новой среде клетки-хозяина. Несмотря на отсутствие ДНК и РНК, они ведут себя так же, как вирусы, способные к различным самовоспроизводящимся структурным мутациям, обеспечивающим им очевидное эволюционное преимущество и резистентность к лекарственным препаратам. В связи с этим достаточно сложно найти препарат для предотвращения развития прионных заболеваний в организме человека и животного [4].

РЕПОЗИТОРИЙ ГГАУ

На сегодняшний день известны две формы скрепи: классическая и атипичная (или штамм Nor98). Классическая форма скрепи наблюдается в Европе с 18 века и является архетипом всех TSEs.

В 2003 г. в Норвегии у овец диагностировали необычный тип скрепи, обозначенный Nor98, или атипичная скрепи. В его клинической картине превалировала атаксия при отсутствии зуда, а гистологические изменения обнаруживали преимущественно в мозжечке и коре головного мозга. Аналогичные атипичные случаи скрепи диагностировали и в других странах. Атипичная форма болезни поражала преимущественно животных, генотип которых отличался от генотипа овец, предрасположенных к классическому скрепи [5].

Большое значение имеют методы диагностики прионных заболеваний, позволяющие осуществлять мониторинг эпизоотической ситуации среди популяций овец. Очевидно, что только развитие быстрых методов диагностики возбудителей прионных заболеваний может отвечать поставленным задачам [4].

Надежным методом определения инфекционности является биопроба на лабораторных животных (мыши, хомяки). Однако чувствительность данного метода зависит от межвидовых барьеров донора патогенного приона и реципиентного животного. Более того, длительность анализа (60-80 дней) делает его неэффективным для широкомасштабных эпидемиологических исследований или регулярного анализа туш животных, идущих на переработку для продуктов питания [4].

Для идентификации патогенной формы прионного белка в настоящее время широко применяют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

Цель работы – разработать методические подходы генотипирования овец по гену PRNP, детерминирующему устойчивость к скрепи.

Материал и методы исследования. Исследования проводились в отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «Гродненский государственный аграрный университет». Были изучены аллельные варианты гена устойчивости к скрепи у овец пород дорпер, суффолк, иль-де-франс, тексель. Нуклеиновые кислоты выделялись перхлоратным методом по следующей методике:

1) 0,1 г ткани промывают дистиллированной водой, измельчают ножницами, перекладывают в эппендорф, объемом 1,5 мл;

2) добавляют 200 мкл 1 x STF буфера;

3) в пробирку добавляют 75 мкл 10 % SDS;

РЕПОЗИТОРИЙ ГГАУ

4) добавляют 10 мкл протеиназы К (свежеприготовленной), после 2-дневного хранения – 12 мкл. Хорошо перемешивают на вортексе;

5) пробу помещают в термостат на ночь при 37 °С;

6) в пробирку с лизатом добавляют 50 мкл 5М раствора перхлората натрия;

7) добавляют в пробирку 300 мкл СІА (хлороформа);

8) интенсивно перемешивают на вортексе;

9) центрифугируют 10 мин при 13000 об./мин;

10) верхнюю ДНК-содержащую фазу переносят в чистую 1,5 мл пробирку;

11) повторяют пункты 7, 8, 9, 10;

12) в пробирку с ДНК-содержащей фазой добавляют 300 мкл 96 % этанола, встряхивая до появления «медузы» ДНК;

13) в 0,6 мл эппендорф с 150 мкл 70 % этанола с помощью дозатора перемещают ДНК;

14) через 5-10 мин спирт удаляют и высушивают ДНК до прозрачного состояния;

15) растворяют ДНК в 100 мкл буфера для хранения ДНК.

Результаты исследований и их обсуждение. Полиморфизмы в кодонах 136, 154 и 171 гена PRNP анализировали методом ПЦР-ПДРФ.

В ходе выполнения исследований, на основе литературных данных, нами подобраны оптимальные последовательности олигонуклеотидов, синтезированных ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь).

Для 136/154 кодонов:

F: 5’-ATGAAGCATGTGGCAGGAG-3’;

R: 5’-CCAACCTGGCAAAGATTAAGA-3’.

Для 171 кодона:

F: 5’-GTACTACAGACCAGTGGAC-3’;

R: 5’-GATGCACATTTGCTCCACCA-3’.

Подобран оптимальный объем и соотношения реакционной смеси для 136/154 кодонов, который включает 10 х Taq-буфер – 1,2 мкл; 50 мМ $MgCl_2$ – 0,7 мкл; Смесь дНТФ – 1 мкл; Праймер 1 (прямой) – 15 пмоль; Праймер 2 (обратный) – 15 пмоль; Taq-полимераза – 0,5 U; геномная ДНК – 40 нг/мкл, H_2O (свободная от нуклеаз) – до14 мкл.

Для 171 кодона: 10 х Taq-буфер – 1,2 мкл; 50 мМ $MgCl_2$ – 0,7 мкл; Смесь дНТФ – 1 мкл; Праймер 3 (прямой) – 15 пмоль; Праймер 4 (обратный) – 15 пмоль; Taq-полимераза – 0,5 U; геномная ДНК – 40 нг/мкл, H_2O (свободная от нуклеаз) – до14 мкл.

После приготовления ПЦР-смеси применялись следующие циклы при амплификации: денатурация – при 94 °С / 5 мин с последующими 38 циклами при 94 °С / 30 с, отжиг праймеров – при 62 °С / 40 с, элон-

РЕПОЗИТОРИЙ ГГАУ

гация продуктов ПЦР – при 72 °С / 40 с и окончательная элогация – при 72 °С / 5 мин. Визуализацию амплифицированных фрагментов проводили с помощь гель-документирующей системы GelDoc (BioRad, США). Продукты амплификационных участков гена прионного рецептора (PRNP) составили: для 136/154 кодонов – 485 п. н., для 171 кодона – 160 п. н.

Полученные продукты амплификации подвергали расщеплению эндонуклеазой рестрикции BspHI для 136/154 кодонов и MspI для 171 кодона («СибЭнзим», Россия) в стандартных условиях при температуре 37 °С в течение 16 ч. После инкубирования рестрикционные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в 3%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, при постоянном напряжении 130 В. Результаты электрофореза анализировали под ультрафиолетовыми лучами с использованием GelDoc (BioRad, США). Для оценки длины фрагмента использовали маркер молекулярного веса «М50» фирмы ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь).

Полиморфизмы A136V (аланин, GCC → GTC, валин), R154H (аргинин, CGT → CAT, гистидин) и Q171R (глутамин, CAG → CGG, аргинин) связаны с восприимчивостью или устойчивостью к скрепи. Кроме того, в некоторых исследованиях сообщалось о другом полиморфном варианте, кодирующем гистидин в кодоне 171, но он встречается очень редко [6].

Сочетание этих полиморфизмов приводит к созданию 3-локусных гаплотипов и диплоидных генотипов, среди которых $A_{136}R_{154}Q_{171}$1 (далее ARQ) и $AA_{136}RR_{154}QQ_{171}$ (далее ARQ/ARQ). Считается, что эти генотипы – варианты дикого типа. Общепризнано, что полиморфизм, кодирующий A_{136} и R_{171}, придает устойчивость к скрепи, с ARR/ARR считается наиболее устойчивым генотипом у овец. Полиморфизм, кодирующий V_{136}, строго связан с восприимчивостью, и это кодирование Q_{171} делает животных более уязвимыми к скрепи, причем носители VRQ/VRQ являются наиболее восприимчивыми к болезни.

После расщепления эндонуклеазами BspHI и MspI амплифицированных фрагментов ДНК гена прионного белка (PRNP) проводилась визуализация продуктов с генерацией генотип специфических фрагментов.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГАУ

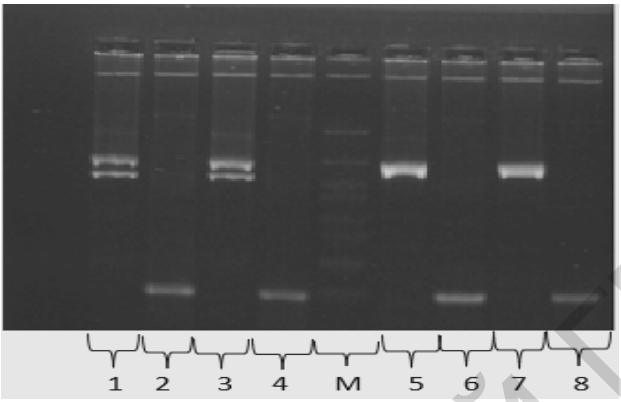

Рисунок – Амплифицированные фрагменты ДНК гена прионного белка

Для 1 и 3 исследуемого образца 136/154 кодоны составили 485, 411 п. н., что соответствует генотипу AAVV; для 2 и 4 образца 171 кодон составил 144 п. н. – генотип RR. Для 5 и 7 исследуемых образцов 136/154 кодоны составили 485 п. н., что соответствует генотипу AARR; для 6 и 8 образцов 171 кодон составил 144 п. н. – генотип RR.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований нами разработаны методические подходы проведения ПЦР-ПДРФ-анализа гена прионного белка (PRNP), ассоциированного с генетической устойчивостью к скрепи у овец, подобраны оптимальные режимы, объемы и концентрация реакционных смесей, режимы амплификации и рестрикции, что позволит в дальнейшем проводить генотипирование животных в раннем возрасте или при рождении, тем самым вести целенаправленную селекцию на устойчивость овец к скрепи, что будет способствовать интенсификации селекционного процесса в овцеводстве Республики Беларусь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овцеводство в Беларуси [Электронный ресурс]. – Режим доступа: Овцеводство в Беларуси (belplem.by). – Дата доступа: 05.05.2021.

2. Передача возбудителя скрепи через молоко / Т. Коннольд [и др.] // РВЖ СХЖ. – 2009. – № 1. – С. 1-4.

3. Сообщение о клинических наблюдениях за двумя овцами с атипичным скрепи / Т. Коннольд [и др.] // РВЖ СХЖ. – 2009. – № 1. – С. 1-4.

4. Просеков, А. Ю. Прионные заболевания – классификация и методы диагностики / А. Ю. Просеков, Е. Е. Драгунова // Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс. – 2013. – № 1. – С. 22-27.

5. The PRNP gene polymorphism in Rough-coated Pomeranian Landrace sheepn / W. S. Proskura [et al.] // South African Journal of Animal Science. – 2013. – Vol. 43. – P. 174-180.

6. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases / T. Moum [et al.] // J. Gen. – 2005. – Virol 86. – P. 231-235.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГАУ