

по сравнению с животными с генотипами LGB^{AA} и LGB^{AB} соответственно ($P < 0,05$; $P < 0,01$).

Аналогичная тенденция установлена и по третьей лактации. Так, коровы с генотипом LGB^{BB} имели удой, жирномолочность, количество молочного жира, белковомолочность и количество молочного белка на 412,7-450,1 кг, 0,03%, 17,0-18,7 кг, 0,03-0,06% и 15,7-18,6 кг больше, чем животные с генотипами LGB^{AA} и LGB^{AB} ($P < 0,05$; $P < 0,01$).

Таким образом, проведенные исследования указывают на возможность применения гена бета-лактоглобулина в качестве маркера при создании стад крупного рогатого скота, характеризующихся более высоким уровнем молочной продуктивности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alison, V. E. Marker – assisted selection in beef cattle / V.E. Alison // UC Davis. – 2007. – P. 1-2.
2. Quantitative traits loci affecting milk yield and protein percentage in a three-country brown swiss population / A. Bagnato [et al.] // J. Dairy Science. – 2008. – Vol. 91 (2). – P. 767-783.
3. Эрнст, Л.К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Л. К. Эрнст, Н. А. Зиновьева. – М.: РАСХН, 2008. – 260-273.
4. Хабибрахманова, Я. А. Полиморфизм генов молочных белков и гормонов крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.02.01 / Я. А. Хабибрахманова. – Лесные Поляны Моск. обл., 2009. – 20 с.
5. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук -М.: «Мир». – 1984. – 480 с.

УДК 636.2.082

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА ЭМБРИОНА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Епишко О. А.¹, Пестис В. К.¹, Чебуранова Е. С.¹, Кузьмина Т. И.²,
Усенбеков Е. С.³

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь

² – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт генетики
и разведения сельскохозяйственных животных»
г. Санкт-Петербург-Пушкин, РФ

³ – Казахский национальный аграрный университет
г. Алматы, Республика Казахстан

С помощью современных биотехнологических методов животноводство различных стран старается создавать стада животных с необходимыми фенотипическими признаками или с наиболее выгодными

признаками продуктивности. Так, для создания молочного стада, продуцирующего наибольшее количество молока экстра класса, требуется наличие племенных телочек. Чтобы не тратить деньги государства, требуется использовать новейшие методы молекулярной биотехнологии, с помощью которых можно на эмбриональной стадии определять пол будущего животного.

Известен принятый за прототип способ определения пола эмбриона крупного рогатого скота на основе гена амелогенина (amelogenin) молекулярно-генетическим методом исследования, включающий проведение ПЦР-анализа (полимеразная цепная реакция) для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям X и Y гена amelogenin, при этом используются праймеры [1]:

F 5'-AAA TTC TCT CAC AGT CCA AG-3';

R 5'-CAA CAG GTA ATT TTC CTT TAG-3';

инициирующие амплификацию локуса AML-гена образующихся генотип-специфических фрагментов (AMELX=241 bp, генотип AMELY=241/178 bp).

Недостатком указанного способа является высокая стоимость используемого оборудования, большие затраты на подготовку квалифицированных специалистов, невозможность точно определить пол эмбриона крупного рогатого скота.

На базе научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «ГГАУ» разработан эффективный способ определения пола эмбриона крупного рогатого скота на основе ПЦР-анализа. Исследования проводились методом ПЦР-анализа (полимеразная цепная реакция) для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям X и Y гена амелогенина (amelogenin).

Для определения пола предимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота на стадии поздней морулы и ранней бластоцисты использовали 3-4 бластомера, полученные путем бисекции эмбрионов под стереоскопическим микроскопом. С целью приготовления лизата, полуэмбрионы или 3-4 бластомера помещали в пробирку, содержащую 50 мкл лизирующего буфера с составом: 15 mM Tris HCl, pH 8,9, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,1%. Triton x 100, 150 мг/мл протеиназы K и инкубировали в течение 30-60 мин при температуре 37⁰C. Денатурацию ДНК осуществляли при 99⁰C в течение 8 мин.

Концентрацию ДНК, а также степень ее очистки определяли с помощью спектрофотометра Implen P330. Реакционная смесь для амплификации общим объемом 25 мкл включала: буфер – 2,5 мкл; смесь dNTP – 2,0 мкл; Taq-полимеразу – 0,5 мкл; MgCl₂ – 1,25 мкл;

праймер 1 – 0,25 мкл, праймер 2 – 0,25 мкл; деионизированную воду – 17,75 мкл. Далее в смесь вносили 10-100 нг/мкл выделенной ДНК.

Последовательность олигонуклеотидов:

AML – 1: 5' GGC CAA CAC TCC ATG ACT CCA - 3'

AML – 2: 5' TGG GGA ATA TYG GAG GCA GAG- 3'.

Для амплификации ПЦР использовали термоциклер C1000 Touch™ BIORAD с соответствующими температурными и временными профилями.

Режим амплификации

x1: 94⁰C – 5 мин

x34: 94⁰C – 45 с, 60⁰C – 45 с, 72⁰C – 1 мин

x1: 72⁰C – 10 мин.

Детекцию результатов ПЦР-анализа осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле в TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия.

По результатам практических исследований, направленных на апробацию разработанного нами способа по определению пола эмбрионов на основе гена амелогенина (amelogenin) крупного рогатого скота, нами получен обеспечиваемый заявленным способом технический результат, выраженный в эффективной идентификации искомым генотипов (AMELX, AMELY) ввиду корректной интерпретации генерируемых генотип-специфических фрагментов (AMELX=241 bp, AMELY=241/178 bp), где ПЦР-фрагменты с длинами 241 bp и 178 bp являются идентификационными.

ЛИТЕРАТУРА

Shirali Saeed. Non-invasive Fetal Sex Determination using Nested PCR of Free Fetal DNA in Maternal Plasma/ S. Shirali, A. R. Mesbah-Namin, H. Zahiri, E. Khodadi, S. M. Mirtorabi, // Journal of Academic and Applied Studies – September, 2014. – Vol. 4(9) – P. 22-30.