ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ИССЛЕДОВАНИЯ ОВЕЦ ПО ГЕНУ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА-9 (GDF9)

Чебуранова Е. С.¹, Епишко О. А.¹, Al-Saedi Raad Raheem Tolee²

- 1- УО «Гродненский государственный аграрный университет»
- г. Гродно, Республика Беларусь
- ²– УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы»
- г. Гродно, Республика Беларусь

На сегодняшний день на территории Республики Беларусь внедрена технология диагностики генов, ответственных за хозяйственно полезные признаки у крупного рогатого скота, позволяющие вести целенаправленную селекцию с раннего возраста. Одним из универсальных молекулярно-генетических методов для исследования хозяйственно ценных генов является метод ПЦР-ПДРФ-анализа, благодаря которому при последовательной смене температурного режима происходит копирование исследуемого фрагмента ДНК в несколько миллионов раз.

Актуальность данных исследований на территории Республики Беларусь обусловлена развитием овцеводства, а также внедрением в данную отрасль новейших биотехнологических методов, позволяющих вести не только целенаправленную селекцию на закрепление необходимого признака, но также и исключить наследственные аномалии из местной популяции овец. В племенных хозяйствах республики овцеводство в основном направлено на увеличение показателей мясной и молочной продуктивностей. Но для увеличения количества высокопродуктивного потомства необходимо учитывать воспроизводительные качества овец. Одним из генов-кандидатов, отвечающим за плодовитость овец, является ген дифференциального фактора роста — 9 (GDF-9), локализованный в 5-й хромосоме. Данный ген отвечает за поддержание идеальной среды для процесса яичникового фолликулогенеза.

На базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНКтехнологий» УО «ГГАУ» проводились исследования по выявлению полиморфизма гена GDF9 у овец, разводимых в хозяйствах республики. Материалом для исследований служила эпителиальная ушная ткань. Изолирование ядерной ДНК проводилось методом двойной очистки с использованием перхлората натрия. Для корректного проведения полимеразной цепной реакции необходимо учитывать концентрацию выделенной ДНК, а также степень ее очистки. Данные параметры определялись с помощью спектронанофотометра Implen P330 на длине волны 260 нм. Для многократного копирования исследуемого фрагмента были использованы специфические синтетические олигонуклеотиды (праймеры) [1]:

GDF9 – for – 5' – GAAGACTGGTATGGGGAAATG – 3';

GDF9 - rev - 5' - CCAATCTGCTCCTACACACCT - 3'.

Длина амлифицированного фрагмента ДНК составила – 462 п.н.

Реакционная смесь, общим объемом 25 мкл, состояла из следующих компонентов отечественного производства (ОДО «Праймтех»): ПЦР-буфер: 50 mM KCl, 10mMTris-HCl, 2.5 mM dNTPs; 1.5 mM MgCl2, 20-50 пмоль/мкл каждого праймера и 0.1 µL of 5U Таqполимеразы, 50-100 нг/мкл выделенной ДНК, деоинизированной водой доводим до необходимого объема.

ПЦР проводили с использование термоциклера C1000 Touch, производство BioRad, США, по следующей ПЦР-программе, состоящей из последовательных этапов, стартуя с начальной денатрурации в течение 2-х мин при температуре 94 °C; 35 циклов: 94 °C – 30 c, 63 °C – 40 c, 72 °C – 30 c; финальная элонгация в течение 4-х мин при температуре 72 °C.

Визуализация полученного амплификата проводилась в 2%-м агарозном геле с помощью системы гельдокументирования GelDocXR+ (BioRad, США), позволяющей регистрировать окрашенные бромфенолом синим фрагменты при УФ-излучении.

ПДРФ-анализ проводился в термостате в течение 12-16 ч при температуре 37 °C, используя рестрикционную эндонуклеазу HhaI (Invitrogen, США), позволяющую определить аллели гена GDF9, размер которых соответствует генотипам:

АА – 410/52 п.н.;

ВВ – 254/156/52 п.н.:

АВ – 410/254/156/52 п.н.

По результатам практических исследований, направленных на оптимизацию протокола по диагностике полиморфизма гена дифференциального фактора роста-9 (GDF9) у овец, нами получен технический результат, который выражается в эффективной визуализации искомых генотипов (AA, BB, AB), ввиду точной интерпретации исследуемых генотип-специфических фрагментов (AA=410/52 п. н., BB=254/156/52 п. н., AB=410/254/156/52 п.н.), где ПЦР-фрагменты с длинами 410 п. н., 254 п.н., 156 п. н. и 52 bр являются идентификационными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mohammad Mehdi Kasiriyan. Genetic polymorphism BMP15 and GDF9 genes in Sangsari sheep of Iran/ M. M. Kasiriyan, S. H. Hafezian, N. Hassani // International Journal of Genetics and Molecular Biology – January, $2011 - Vol.\ 3(1) - P.\ 31-34$.