

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТОЧКОВОЙ МУТАЦИИ G3072A В ГЕНЕ IGF2

Ковальчук М. А., Ганджа А. И., Журина Н. В., Симоненко В. П.,
Леткевич Л. Л., Кириллова И. В.

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству»
г. Жодино, Республика Беларусь

Применение метода ПЦР упрощает диагностику точковых мутаций, которые являются причиной полиморфизма. Высокая чувствительность метода позволяет определить аллели, различающиеся заменой лишь одного нуклеотида. Особенность ПЦР состоит в том, что амплификации подвергается область, находящаяся между участками отжига праймеров, первичная структура которых должна быть известна заранее.

В качестве генетического маркера мясных и откормочных качеств свиней рассматривается *ген инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2)*. Ген локализован на дистальном конце 2-й хромосомы свиней [1]. Замена нуклеотида G3072A ($q \rightarrow Q$) расположена в интроне 3, обуславливающая полиморфизм гена IGF2 и наличие двух аллелей Q и q [2]. Установлено, что точковая мутация в гене IGF2 влияет на откормочную и мясную продуктивность [3].

Исследования проводились в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству». При изучении полиморфизма *гена IGF2* у исследуемых животных были взяты биопробы ткани (спермы) и выделена ДНК перхлоратным методом. Оценку полиморфизма гена IGF2 проводили методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь конечным объемом 20-25 мкл, включающую: от 50 до 100 нг ДНК, праймеры в количестве от 10 до 25 пМ, по 200 мкМ каждого из дНТФ, 1х буфер (10 мМ трис pH 8,6, 50 мМ KCl, 0,1 % tween-20), 0,7-4,2 мМ MgCl₂ и 1,3-2,5 ед. акт. Taq-полимеразы.

ПЦР проводили в термоциклере «SureCycler 8800» («Bio-Rad», США) по следующей программе:

«Горячий старт» – 94 °С – 10 мин; 33 цикла: денатурация – 94 °С – 45 с, отжиг – 63 °С – 30 с, элонгация – 72 °С – 30 с, достройка – 72 °С – 5 мин.

Продукты ПЦР и рестрикционные фрагменты разделяли электрофоретически в 2-4%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидиумом, при напряжении 130-150 В в течение 20-30 мин. В качестве маркера использовали ДНК-маркер молекулярного веса М100bp. Специфичность фракций нуклеиновых кислот в гелях визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете с использованием компьютерной видеосистемы Infinity-3026 (VilberLourmat, Франция).

Оптимизация параметров проведения ПЦР амплификации фрагмента гена IGF2. Различные варианты постановки ПЦР направлены на увеличение эффективности реакции и снижение образования неспецифических продуктов; проведение как качественного, так и количественного анализа искомым участкам молекулы ДНК. Для проведения качественной реакции необходим оптимально подобранный состав реакционной смеси, а также температурный и временной режимы ПЦР. В целях оптимизации выхода продукта ПЦР в условиях неопределенности с температурой отжига праймеров используют градиент температур. Для того чтобы обеспечить специфичность амплификации фрагмента гена IGF2 использовали один и тот же образец ДНК в реакционной смеси при различных температурах отжига от 60,0 до 63,0 °С. При более низкой температуре отжига 60,0-62,5 °С наблюдается синтез неспецифических фрагментов ДНК, интенсивность которых снижается с повышением температуры отжига праймеров. Оптимальная температура отжига праймеров равна 63,0 °С, при данной температуре не образуются неспецифические фрагменты.

Важным этапом при проведении ПЦР и получении специфических фрагментов ДНК гена IGF2 является подбор оптимальной концентрации ионов Mg^{2+} . Выявлено влияние концентрации $MgCl_2$ на специфичность и интенсивность продуктов ПЦР. Для постановки реакции использовали 1 пробу, а в реакционную смесь добавляли разное количество $MgCl_2$ – от 0,7 до 4,2 мМс шагом 0,7 мМ. В качестве рабочей выбрана концентрация соли 0,7 мМ.

При подборе ДНК-полимеразы использовались два фермента с различной активностью стадии денатурации молекул ДНК в образце, т. е. начальный прогрев – 2 мин при 95 °С (ArtStart ДНК-полимераза) и 10 мин при 94 °С (SynTaq ДНК-полимераза). Специфичные фрагменты продуктов ПЦР гена IGF2 были получены при использовании ДНК-полимеразы SynTaq в количестве 1,5 ед. акт. и времени начальной денатурации 10 мин при температуре 94 °С.

Детекция полученных результатов. Результаты ПЦР амплификации ДНК гена IGF2 оценивали при помощи электрофоретического разделения нуклеиновых кислот в 2%-м агарозном геле, длина амплифи-

цированного фрагмента – 85 п. о. Полученные рестрикционные фрагменты гена IGF2 разделяли и оценивали посредством электрофореза в 4%-м агарозном геле. Расщепление продуктов амплификации гена IGF2 рестриктазой DraIII (AdeI) проводилось при 37 °С в течение 2 ч, при этом идентифицировались следующие генотипы: IGF2^{q_q} – 85 п. о. (гомозиготный генотип), IGF2^{q_q} – 85, 65 и 20 п. о. (гетерозиготный генотип), IGF2^{q_q} – 65, 20 п. о. (гомозиготный генотип, ассоциированный с высокими откормочными и мясными качествами).

В результате исследований была разработана методика оценки однонуклеотидной замены G3072A (q→Q) в последовательности гена IGF2, ассоциированного с признаками откормочной и мясной продуктивности. Оптимизированы параметры проведения ПЦР амплификации фрагмента гена IGF2. Подобрана оптимальная температура отжига праймеров гена IGF2 для ПЦР – 63,0 °С, при данной температуре не образуются неспецифические фрагменты. В качестве рабочей выбрана концентрация соли MgCl₂ 1,5 мМ, являющаяся оптимальной для ПЦР амплификации фрагмента гена IGF2. Специфические фрагменты гена IGF2 были получены при использовании в ПЦР ДНК-полимеразы S_{yn}Taq в количестве 1,5 ед. Разработанные режимы проведения анализа полиморфизма гена IGF2 методом ПЦР-ПДРФ будут использоваться в дальнейших исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs / C. Nezer [et al.] // Nat.Genet. – 1999. – Vol. 21. – P. 155-156.
2. Known mutation (A3072G) in intron3 of the IGF2 gene is associated with growth and carcass composition in Polish pig breeds / M. Oczkovicz [et al.] // J. ppl. Genet. – 2009. – Vol. 50(3). – P. 257-259. – DOI: 10.1007/BF03195681.
3. Гетманцева, Л. В. Влияние полиморфизма генов MC4R, IGF2 и POU1F1 на продуктивные качества свиней: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.02.07 / Гетманцева Любовь Владимировна. – п. Персиановский, 2012. – 24 с.
УДК 636.085.55-035.258

ОЦЕНКА УРОВНЯ ПОРАЖЕНИЯ МИКОТОКСИНАМИ КОМБИКОРМОВ И ИХ КОМПОНЕНТОВ

Козинец А. И.

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству»
г. Жодино, Республика Беларусь

Критериями качества применяемых в животноводстве кормов и кормовых добавок служат не только содержание в них обменной энергии, протеина, жира и др. питательных веществ, но и показатели безопасности, в т. ч. наличие в них микотоксинов – ядов, выделяемых в