

ный доход при выращивании каждой тысячи бройлеров на комбикормах с подкислителем «Биотроник СЕ-форте» составляет 3856,84 тыс. руб., а с подкислителем «Форс» – 4220,24 тыс. руб. или на 363,4 тыс. руб. больше. Следовательно, применение подкислителя «Форс» при выращивании цыплят-бройлеров оказалось экономически более целесообразным, чем препарата «Биотроник СЕ-форте».

**Заключение.** Результаты исследований подтверждают целесообразность применения подкислителя «Форс» в кормлении сельскохозяйственной птицы. Скармливание курам-несушкам комбикормов, обогащенных подкислителем «Форс», обеспечивает повышение яйценоскости на 0,87 и сохранности птицы на 0,23 п. п. Включение подкислителя «Форс» в комбикорма для цыплят-бройлеров способствует более высокой (на 2,5 п. п.) их сохранности, чем при использовании подкислителя «Биотроник СЕ-форте». Расходы на подкислитель «Форс» окупаются дополнительно полученной яичной продукцией в 1,34 раза. При выращивании каждой тысячи бройлеров на комбикормах с подкислителем «Форс» можно получить прибыли больше на 363,4 тыс. руб., чем при использовании препарата «Биотроник СЕ-форте».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кошелева, Г. Научно обоснованные рекомендации по кормлению поросят. / Г. Кошелева // Свиноферма. – 2006. - № 11. – С. 22-28.
2. Джафаров, А. Использование органических кислот в птицеводстве. / А. Джафаров // Комбикорма. – 2010. - №5. – 67 с.
3. Алтухов, Н. Пути профилактики желудочно-кишечных болезней поросят в период их отъема / Н. Алтухов, Ю. Бригадиров, А. Шамардина // Свиноводство. – 2005. - № 6. – С. 21-22.
4. Вестендорф, П. Энтеротоксемия эшерихия коли – бесконечная история? / П. Вестендорф // Промышленное и племенное свиноводство. – 2006. - № 3. – С. 63-65.
5. Чомаков, Х. Биологические основы борьбы с колибактериозом сельскохозяйственных животных / Х. Чомаков // Международный с.-х. журнал. – 1988. – № 4. – С. 61-64.
6. Кузнецов, А. Препарат для регулирования микрофлоры кишечника птицы / А. Кузнецов // Комбикорма. – 2010. - № 6. – С. 105-106.
7. Околелова, Т. Подкислителя меньше, а эффект тот же / Т. Околелова, В. Савченко // Комбикорма. – 2011. - № 2. – С. 93-94.

УДК 636.2

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ  
ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА ЛЕПТИНА (LEP),  
ВЛИЯЮЩЕГО НА ПРОДУКТИВНОЕ ДОЛГОЛЕТИЕ  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**Т. М. Комендант, О. А. Епишко, 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:** продуктивное долголетие, ген, лептин, полиморфизм, ПЦР-ПДРФ.*

***Аннотация.** В связи с актуальностью проблемы продуктивного долголетия крупного рогатого скота встаёт вопрос об изучении факторов, влияющих на срок хозяйственного использования животных. Наряду с такими факторами, как кровность, линейная принадлежность, быки-производители, возраст первого отёла, удой по первой лактации установлено влияние на продуктивное долголетие полиморфизмов гена лептина (LEP):C25R, A80V, Y7F. В нашей работе мы подобрали необходимые компоненты, определили подходящие реакционные смеси и режимы для амплификации и рестрикции фрагментов гена лептина (LEP), содержащего полиморфизмы C25R, A80V, Y7F. Исследования провели в отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий». Материалом исследований являлись образцы ДНК 20 животных крупного рогатого скота чёрно-пёстрой породы. Образцы исследовались методом ПЦР-ПДРФ. В результате проведения исследований в образцах ДНК были обнаружены все три полиморфизма гена лептина (LEP) с различными генотипами.*

**OPTIMIZATION OF THE METHOD OF DETECTING  
POLYMORPHISMS OF THE LEPTIN GENE (LEP),  
AFFECTING THE PRODUCTIVE LONGEVITY OF CATTLE**

**T. M. Komendant, O. A. Epishko, E. S. Cheburanova**

EI «Grodno State Agrarian University»

Grodno, Republic of Belarus

(Republic of Belarus, 230008, Grodno, Tereshkova Street, 28)

e-mail: ggau@ggau.by)

***Key words:** Productive longevity, gene, leptin, polymorphism, PCR-RFLP.*

***Summary:** In connection with the urgency of the problem of productive longevity of cattle, the question arises of studying the factors that affect the period of economic use of animals.*

*Along with such factors as bloodiness, linearity, bulls-producers, the age of the first calving, milk by the first lactation, the influence on the productive longevity of polymorphisms of the leptin gene(LEP):C25R, A80V, Y7F was established. In our work, we selected the necessary components, determined the appropriate reaction mixtures and regimes for amplification and restriction of fragments of the leptin gene(LEP) containing the polymorphisms C25R, A80V, Y7F. Research was carried out in the branch research laboratory of «DNA-technologies». The material of the studies were DNA samples of 20 animals of cattle of black and motley breed. Samples were examined by PCR - RFLP. As a result of studies in DNA samples, all three polymorphisms of the leptin gene(LEP) with different genotypes were found.*

*(Поступила в редакцию 01.06.2017 г.)*

**Введение.** В настоящее время молочное скотоводство является важной отраслью современного мирового сельского хозяйства. В мире насчитывается около 1,5 млрд. голов крупного рогатого скота. Поэтому поиск решения проблемы, связанной с повышением рентабельности и производства, является приоритетом для работников сельского хозяйства. Также перед учёными республики и работниками сельского хозяйства стоит сложная задача, которая заключается в создании отечественных пород с высоким потенциалом продуктивности и приспособленностью к конкретным природно-климатическим условиям. Кроме того, в последнее время актуальность приобрела проблема продуктивного долголетия животных, которую возможно решить совместными усилиями учёных нашей страны и специалистами в области сельского хозяйства.

Увеличение срока жизни приобретает все большее значение, т. к. срок хозяйственного использования животных с наивысшим генетическим потенциалом сократился до 3-х лактаций. Такое относительно раннее выбытие коров увеличивает себестоимость продукции из-за повышения доли затрат, направленных на выращивание молодняка.

Продуктивное долголетие является лимитирующим фактором, т. к. оно непосредственно влияет на пожизненный надой молока, количество приплода и, в конечном счете, на совершенствование пород и стада. Поэтому в современном животноводстве чрезвычайно важную роль играют высокопродуктивные коровы с продолжительным сроком их использования [2].

Многими учёными уже доказано влияние на срок хозяйственного использования таких факторов, как кровность, линейная принадлежность, быки-производители, а также возраст первого отёла, уровень удоя по первой лактации, сезон отёла и др.

Наряду с этими уже широко изученными факторами в литературе всё чаще встречается информация о влиянии на срок продуктивного

использования крупного рогатого скота генетических маркеров. К таким маркерам относятся полиморфизмы гена лептина (LEP): R25C, Y7F, A80V [1].

Лептин (LEP) – гормональный продукт гена тучности, участвует в контроле питания, расхода энергии, регулировании массы тела млекопитающих. Лептин (LEP) рассматривается в качестве одного из наиболее вероятных маркерных генов, оказывающих влияние на функциональное долголетие. Некоторыми учёными отмечается, что лептин влияет на функционирование иммунной системы и репродуктивную функцию, а также на рост и конституцию животных. Считается, что лептин (LEP) обладает плейотропным воздействием на организм [6].

Структурно лептин (LEP) представляет собой протеин, состоящий из 167 аминокислот и включающий 21 аминокислотную сигнальную последовательность. У крупного рогатого скота ген лептина расположен в 4 хромосоме (BTA 4) и состоит из трех экзонов, 1 из которых не транслируется. Только два экзона кодируют последовательность аминокислот белка лептина. В кодирующую область гена лептина (ее длина составляет 501 п.н.) входят второй и третий экзоны, которые разделены интроном с протяжённостью примерно 2 кб. Область промотора составляет около 3 кб [4].

При изучении SNP полиморфизма гена лептина (LEP) было проведено исследование (Giblin, 2010), направленное на количественное определение связи между полиморфизмами 10 однонуклеотидных замен в генах, кодирующих лептин и рецептор лептина с чертами производительности 848 быков голштино-фризской породы.

Результаты оказались следующие: SNP R25C имеет влияние на массовые доли жира и белка в молоке, на сложность отела и продолжительность срока беременности. Т аллель Y7F SNP в значительной степени связан с увеличением массы тела скота и снижением массовой доли белка в молоке. Также установлена связь полиморфизма Y7F с увеличением массы тела, снижением надоя и уменьшением срока стельности. A80V связан со снижением выживаемости в стаде [3].

Также учёными (Szyda, 2011) установлено, что коровы с генотипом CC (SNP R25C гена лептина) имеют в 3,14 раз больший риск выбраковки, чем животные с гетерозиготными генотипами, а коровы с генотипом FF (SNP Y7F гена лептина) – в 3,64 раз более высокий риск выбраковки, чем коровы с генотипом YY. Также показано влияние LEP-A80V полиморфизма на продолжительность хозяйственного использования и уровень рентабельности животных [5].

Таким образом, изучение полиморфизмов гена лептина (LEP) у крупного рогатого скота является очень важным аспектом для ведения

маркер-ассоциированной селекции в условиях Республики Беларусь с целью продления продуктивного долголетия крупного рогатого скота и, как следствие, получения большего экономического эффекта от его использования.

**Цель работы:** адаптировать и оптимизировать методику выявления полиморфизмов гена лептина (LEP), влияющего на продуктивное долголетие крупного рогатого скота, разводимого в Республике Беларусь для проведения исследований в условиях отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «ГГАУ».

**Материал и методика исследований.** Исследования проводились на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «ГГАУ». Материалом исследований являлись образцы ДНК крупного рогатого скота чёрно-пёстрой породы (n=20), выделенные перхлоратным методом. Образцы исследовались методом ПЦР-ПДРФ анализа на наличие полиморфизмов R25C, A80V, Y7F в гене LEP.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Для обнаружения полиморфизмов гена лептина (LEP) (R25C, A80V, Y7F) мы применили широко распространённые методы выявления полиморфизма последовательностей ДНК – анализ полиморфизма с помощью ПЦР и анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК (ПДРФ). Метод ПЦР основан на многократном копировании определённого участка нуклеотидов ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях. Амплифицирование происходит, если участок удовлетворяет заданным условиям и присутствует в исследуемом образце.

Для проведения ПЦР нам потребовались следующие компоненты:

1. Образцы ДНК крупного рогатого скота чёрно-пёстрой породы (n=20).
2. Буферный раствор. Он обеспечивает такие необходимые условия реакции, как pH, ионную силу раствора.
3.  $MgCl_2$  25 mM необходимый для работы полимеразы.
4. Смесь dNTP (водный раствор четырех высокоочищенных 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Не содержит ДНК и РНК).
5. Два праймера, комплементарные последовательностям ДНК на границах определённого специфического фрагмента. Праймерами служат короткие синтетические олигонуклеотиды длиной 18-30 оснований, комплементарные одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивающие начало и конец амплифицируемого участка. Также праймер служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы.

6. Термостабильная ДНК-полимераза – фермент, сохраняющий активность при высокой температуре длительное время, который катализирует реакцию полимеризации ДНК.

Для амплификации участков гена использовались следующие последовательности праймеров:

– для участка **R25C гена LEP:**

LEP-F: 5'-CCAGGGAGTGCCTTTCATTA-3',

LEP-R: 5'-GGTGTATCCTGGACCTTCC-3'.

– для участка **A80V гена LEP:**

LEP-F: 5'-CAAGCAGGAAATAGGGAGTCATGG-3',

LEP-R: 5'-CTGGTGAGGATCTGTTGGTAGGTC-3'.

– для участка **Y7F гена LEP:**

LEP-F: 5'CTGCGTGGTCTACAGCACACCTC-3',

LEP-R: 5'AGGGCCAAAGCCACAGGATTTCG-3'.

Общий объем смеси для проведения амплификации составил 15 мкл. В таблице 1 представлены три варианта реакционной смеси для амплификации фрагментов LEP, содержащих полиморфизмы R25C, Y7F и A80V.

Таблица 1 – Состав реакционной смеси для амплификации фрагментов LEP (R25C, Y7F и A80V)

Название компонента	Количество компонентов, мкл		
	R25C	A80V	Y7F
H <sub>2</sub> O	9,72	9,7	9,7
Буфер 10x	1,5	1,5	1,5
MgCl <sub>2</sub>	0,36	0,36	0,36
dNTP 10xPCR premix	0,24	0,24	0,24
Праймер 1	0,6	0,48	0,48
Праймер 2	0,6	0,48	0,48
Tag-полимераза	0,18	0,12	0,12
ДНК	1,8	2,1	2,1

Учитывая особенности амплифицируемых участков, а также технические характеристики амплификатора, нами были подобраны режимы амплификации для трех полиморфизмов. Следует отметить, что для участка, содержащего полиморфизм A80V, общее количество циклов ПЦР-режима составило 32, а для полиморфизмов R25C и Y7F – 29.

Режим амплификации для участка, содержащего полиморфизм A80V, представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Режим амплификации для участка, содержащего полиморфизм A80V

Стадия ПЦР	Температура С°	Длительность стадии
1	2	3
«Горячий старт»	95	3 мин

Продолжение таблицы 2

1	2	3
Денатурация ДНК	95	30 с
Отжиг праймеров	65	20 с
Синтез ДНК	72	30 с
Достройка	72	7 мин

В таблице 3 представлен режим амплификации для участка, содержащего полиморфизмы R25C и Y7F.

Таблица 3 – Режим амплификации участков гена лептина с полиморфизмами R25C и Y7F.

Стадия ПЦР	Температура С°	Длительность стадии
«Горячий старт»	94	2 мин
Денатурация ДНК	94	20 с
Отжиг праймеров	62	20 с
Синтез ДНК	72	30 с
Достройка	72	5 мин

Детекцию полученных в ходе проведения ПЦР-анализа результатов проводили в 1,5% агарозном геле методом горизонтального электрофореза с последующей визуализацией на системе геле-документирования GelDoc XR+, Biorad. В результате осуществления ПЦР-реакции были обнаружены ПЦР-продукты с размерами: 305 п.н. для R25C; 424 п.н. для A80V; 310 п.н. для Y7F.

Далее проводили рестрикционный анализ, для которого использовали соответствующие эндонуклеазы рестрикции. Для рестрикции амплификата гена лептина (LEP) по полиморфному участку R25C использовали эндонуклеазу Bsp 13 I, по участку A80V – PspEI, по полиморфизму Y7F – эндонуклеазу Bpu 14 I.

Рестрикцию проводили в 20 мкл инкубационной смеси, которая состояла из 15 мкл реакционной смеси и 5 мкл амплификата. В реакционную смесь входили вода, буфер и эндонуклеаза. Рестрикцию по полиморфизму R25C термостатировали при температуре 50 С° в течение 3 часов. Рестрикции по полиморфизмам Y7F и A80V термостатировали при температуре 37 С° в течение 3 часов. Детекцию фрагментов, полученных после рестрикции, определяли с помощью горизонтального электрофореза в агарозном 2,5% геле. Визуализацию осуществляли с помощью системы геле-документирования GelDoc XR+, Biorad.

После рестрикции амплификата гена лептина (LEP) по полиморфному участку R25C гомозиготные животные по аллелю R (генотип RR) образуют один фрагмент величиной 305 п.н., гетерозиготные RC – три фрагмента: 305, 283, 22 п.н., а несущие генотип CC – два фрагмента: 283, 22 п.н.

После рестрикции амплификата по полиморфизму A80V гомозиготные животные по аллелю А образуют один фрагмент – 424 п.н, гетерозиготные AV – три фрагмента: 424, 398 и 26 п.н., гомозиготные по аллелю VV – два фрагмента: 398 и 26 п.н.

Рестрикция амплификата по полиморфизму Y7F показала, что гомозиготные животные по аллелю Y образуют один фрагмент длиной 310 п.н., гетерозиготные YF – три фрагмента: 310, 288 и 22 п.н, гомозиготные по аллелю FF – два фрагмента: 288 и 22 п.н.

**Заключение.** Таким образом, проделанная работа свидетельствует о том, что нами разработана и адаптирована методика выявления полиморфизмов гена лептина (LEP), позволяющая изучить генетическую структуру популяции чёрно-пестрого скота, разводимого в сельскохозяйственных организациях Республики Беларусь, для дальнейшего ведения селекции на увеличение продуктивного долголетия животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алтухов, Ю. П., Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю. П. Алтухов, Е. А. Салменкова // Генетика. - 2002, - № 9. – С. 1173-1195.
2. Суровцев В. Н., Никулина Ю. Н. Экономические аспекты продуктивного долголетия коров // AgriTimes.ru. 2014. Режим доступа: <http://fs-1.5mpublishing.com/agritimes/cowlongevity2014> (дата обращения 25.05.2017).
3. Giblin L. All Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires / L. Giblin, S. Butler, B. Kearney, S. Waters et.al. // BMC Genetics – 2010, № 11:73.
4. Komisarek J. Impact of LEP end LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle / J. Komisarek // Animal Science Papers and Reports. – 2010 – V. 10- P. 133-141.
5. Szyda, M. Evaluation markers in selected genes for association with functional longevity of dairy cattle / J. Szyda, M. Morec-Кopec, J. Komisarek, A. Zarnecki // BMC Genetics – 2011, № 12:30.
6. Yoon D.H. Highly Polymorphic Bovine Leptin Gene / D. H. Yoon, B. H. Cho, B. L. Park et.al. // J.Anim.Sci. – 2005 - V. 18 - № 11 - P.1548-1551.