

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИЛОКУСНОЙ СИСТЕМЫ ПО STR-ЛОКУСАМ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ ЛОШАДЕЙ

Е. С. Чебуранова¹, О. А. Епишко¹, В. Ю. Горчаков¹,
Н. А. Глинская², А. А. Глазев³

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28
e-mail: labgen@mail.ru)

² – УО «Полесский государственный университет»
г. Пинск, Республика Беларусь, Днепровской флотилии, 23

³ – УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы»
г. Гродно, Республика Беларусь, Ожешко, 22

Ключевые слова: лошади, STR-локусы, полиморфизм, ПЦР, микросателлитный локус.

Аннотация. Повышение эффективности контроля происхождения племенных животных – одна из важнейших задач племенного животноводства. В настоящее время генетическая оценка лошадей в большинстве стран уже стала обязательной процедурой племенного учета и надежным методом идентификации животных. На сегодняшний день наиболее эффективным способом контроля достоверности происхождения и идентификации сельскохозяйственных животных, в том числе лошадей, является генетическое тестирование, основанное на использовании STR-локусов. На базе УО «Гродненский государственный аграрный университет» в научно-исследовательской лаборатории ДНК-технологий проведено генетическое тестирование по 17-STR локусам нуклеотидных последовательностей ДНК и разработана мультилокусная система по STR-локусам для молекулярно-генетической паспортизации лошадей.

MULTILOCUS DEVELOPMENT SYSTEM IN STR-LOCI FOR MOLECULAR GENETIC CERTIFICATION HORSES

E. S. Cheburanova¹, O. A. Epishko¹, V. Y. Gorchakov¹,
N. A. Glinskaya², A. A. Glazev³

¹ – EI «Grodno State Agrarian University»
(Belarus, Grodno, 230008 Tereshkova st, 28 e-mail: labgen@mail.ru)

² – UO «Polesky State University» Pinsk, Dneprovskoy Flotilii, 23

³ – EI «Grodno State University», Grodno, Ozeshko, 22

Key words: Horse, STR-loci, polymorphism, PCR, genotype, allele.

Summary. Increase of efficiency of control of an origin of breeding animals – one of the most important problems of breeding animal husbandry. Now genetic certification of cattle in the majority of the countries already became a compulsory procedure of the breeding account and a reliable method of identification of animals. Today in the most effective way of control of reliability of an origin and identification of agricultural animals, including cattle, the genetic testing based on use is STR-loci. On the basis of UO "Grodno State Agrarian University" in a research laboratory of DNA technology testing on 11-STR loci of nukleotidny sequences of DNA and development multilocus system in STR-loci for molecular genetic certification horses.

(Поступила в редакцию 01.06.2016 г.)

Введение. За рубежом достигается высокий уровень эффективности применения ДНК-технологий в селекционной практике животноводства, позволяющий обеспечить возможность для ведения направленной селекции животных на уровне генома, обирая биологический материал с заранее необходимым генотипом, который устойчив к наследственным заболеваниям. Ранее в Республики Беларусь и мировой селекции использовались иммунологические сыворотки для оценки достоверности происхождения животных, включая лошадей, но благодаря высокому уровню научно-технического прогресса в мире разработана технология анализа ДНК по STR-локусам [1, 3].

Следует отметить, что для проведения данного вида анализа необходимо закупить дорогостоящее импортное оборудование и полный комплект химических реагентов. При этом необходимо учитывать уровень финансовой поддержки племенного животноводства в Республике Беларусь, именно поэтому проведение генетической экспертизы племенных животных может быть выборочным [2]. Одним из вариантов выхода из сложившейся ситуации является разработка, а затем и внедрение отечественной технологии оценки достоверности происхождения животных, в том числе лошадей, по STR-локусам, которая позволит уменьшить затраты, исключить импорт технологий. Использование отечественной современной технологии анализа ДНК сделает процедуру оценки животного более доступной и позволит в дополнение к традиционным методам добавить и оценку на уровне ДНК в раннем возрасте.

Цель работы: разработка мультилокусной системы по STR-локусам для молекулярно-генетической паспортизации лошадей, по причине остро стоящей проблемы оценки и сохранения генетических ресурсов в отечественном животноводстве.

Материал и методика исследований. Исследования проведены на базе научно-исследовательской лаборатории ДНК-технологий УО «Гродненский государственный аграрный университет».

В качестве объекта исследований использовалась популяция лошадей, разводимых в СПК «Прогресс-Вертилишки».

Геномную ДНК выделяли из буккального эпителия слизистой оболочки перхлоратным методом с двойной очисткой, концентрацию которой измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P-Class.

Реакционная смесь для проведения 17-плексной реакции готовилась в объеме 15 мкл, включающей следующие компоненты: буфер – 2,5 мкл; дНТП – 4,0 мкл, Taq-полимераза – 0,5 мкл, деионизированная вода – 3 мкл, смесь праймеров – 4,0 мкл, геномная ДНК – 1-10 нг/мкл.

Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием *Термоциклера C1000 Touch, Bio-Rad*. Режим амплификации состоял из следующих этапов: начальный этап (денатурация) – 10 мин при температуре 95⁰С; 30 циклов, в которые входит – плавление 30 с t=95⁰С, отжиг праймеров 30 с t=60⁰С, элонгация 1 мин при температуре 72⁰С; финальная элонгация – 1 ч при температуре 72⁰С; финальное удержание при 4⁰С.

Определение длин амплифицированных фрагментов ДНК в исследуемых локусах проводили с использованием программы GeneMapper 5.0.

Результаты исследований и их обсуждение. Для разработки мультилокусной системы по STR-локусам для молекулярно-генетической паспортизации лошадей с использованием отечественных реактивов необходимо было подобрать панель, состоящую из наиболее информативных полиморфных микросателлитных локусов для тестирования лошадей. В то же время были подобраны наиболее оптимальные условия для проведения 17-плексной полимеразной цепной реакции и фрагментного анализа для выявления STR-полиморфизма [5].

Таблица 1 – Характеристика STR-локусов, отобранных для проведения установления происхождения лошадей

Локус	Длина фрагментов, п. н.	Метка праймера, Dye	Цвет
1	2	3	4
VHL20	83-102	6-FAM TM	Синий
HTG4	116-137	6-FAM TM	Синий
AHT4	140-166	6-FAM TM	Синий
HMS7	167-187	6-FAM TM	Синий
HTG6	74-103	VIC	Зеленый
AHT5	126-147	VIC	Зеленый
HMS6	154-170	VIC	Зеленый
ASB23	176-212	VIC	Зеленый
ASB2	237-268	VIC	Зеленый
HTG10	83-110	NED	Желтый
HTG7	114-128	NED	Желтый

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
HMS3	146-170	NED	Желтый
HMS2	215-236	NED	Желтый
ASB17	104-116	PET	Красный
LEX3	137-160	PET	Красный
HMS1	166-178	PET	Красный
CA425	224-247	PET	Красный

Учитывая рекомендации Международного общества генетики животных (ISAG), нами подобрано 17 локусов (таблица 1), обладающих высокой информативностью, приводимых для анализа ДНК лошадей [4]. Для выбранных локусов известны сведения об их локализации в хромосоме, числе выявленных аллелей, а также размеров тандемных повторов и сведения о используемых праймерах для детекции определенного локуса. Выбор состава и структуры праймеров определяет возможность проведения мультиплексных вариантов ПЦР.

Основная задача при подборе праймеров для мультиплекса состоит в том, что при смешивании все праймеры должны отжигаться на матрице при одинаковых температурных условиях и при этом не взаимодействовать друг с другом.

Для совместного использования праймеров в мультиплексе были подобраны их нуклеотидный состав, длина, а также условия отжига (температура плавления) таким образом, чтобы практически полностью исключить образование димеров праймеров (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика праймеров, используемых при проведении мультиплексной реакции ПЦР по STR локусам для определения достоверности происхождения лошадей, рекомендованных ISAG

Локус	Структура праймера (5'-->3')
1	2
VHL20 F VHL20 R	(FAM)-CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG
HTG4 F HTG4 R	(FAM)-CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC CTCCCTCCCTCCCTCTGTCTCTC
AHT4 F AHT4 R	(FAM)-AACCGCCTGAGCAAGGAAGT GCTCCCAGAGAGTTTACCCT
HMS7 F HMS7 R	(FAM)-CAGGAAACTCATGTTGATACCATC TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT
HTG6 F HTG6 R	(VIC)-GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG CTCCATCTTGTGAAGTGTAATCA
AHT5 F AHT5 R	(VIC)-ACGGACACATCCCTGCCTGC GCAGGCTAAGGGGGCTCAGC
HMS6 F HMS6 R	(VIC)-GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG CTCCATCTTGTGAAGTGTAATCA

Продолжение таблицы 2

1	2
ASB23 F ASB23 R	(VIC)-GCAAGGATGAAGAGGGCAGC CTGGTGGGTTAGATGAGAAGTC
ASB2 F ASB2 R	(VIC)-CCACTAAGTGTCTGTTTCAGAAGG CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG
HTG10 F HTG10 R	(NED)-CAATTCGCCGCCACCCCCGGCA TTTTTATTCTGATCTGTCACATTT
HTG7 F HTG7 R	(NED)-CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT
HMS3 F HMS3 R	(NED)-CCAACCTTTTGTACATAACAAGA CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT
HMS2 F HMS2 R	(NED)-CTTGACGTCGAATGTGATTAAT ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG
ASB17 F ASB17 R	(PET)-GAGGGCGGTACCTTTGTACC ACCAGTCAGGATCTCCACCG
LEX3 F LEX3 R	(PET)-ACACTCTAACCAGTGCTGAGACT GAAGGAAAAAAGGAGGAAGAC
HMS1 F HMS1 R	(PET)-CATCACTCTTCATGTCTGCTTGG TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC
CA425 F CA425 R	(PET)-AGCTGCCTCGTTAATTC A CTCATGTCCGCTGTGCTC

При оптимальном подборе структуры и состава праймеров полимеразная цепная реакция происходит в стандартных условиях. Фактически для того, чтобы мультиплексная реакция, в ходе которой проводится исследование больше чем по одному локусу, была успешной, зачастую необходимо дополнительно производить оптимизацию процесса.

При большом количестве циклов ПЦР возможно израсходование среды реакции по праймерам, нуклеотидам, а также Taq-полимеразе, в результате чего происходит накопление неспецифических продуктов, поэтому ПЦР программа состоит из 30 циклов. При увеличении или сокращении количества циклов результаты ПЦР не улучшаются. Длительность денатурации зависит от типа пробирок. Мы использовали тонкостенные пробирки, объемом 0,2 мл.

Нами была выбрана температура элонгации (Te) $Te=72^{\circ}\text{C}$, т. к. при данной температуре полимеразная активность является максимальной.

Во время выбора температуры отжига праймеров для 17-плексной реакции сначала определяли оптимальные температуры отжига для каждой пары синтетических олигонуклеотидов по отдельности, используя программу Oligo 5.0. Диапазон значений исследуемых оптимальных температур отжига составляет от 48°C до 72°C . На практике рассчитанная температура не всегда оптимальна, поэтому требует корректировки.

Провести мультиплексную амплификацию с 17 парами праймеров удалось при температуре 72°C , при этом выход продукции был достаточно высоким, что дало возможность проведение STR-анализа.

Качественное проведение ПЦР зависит не только от концентрации геномной ДНК, но также и от степени ее очистки, которая нами была определена с использованием современного спектрофотометра Implen P330 (при длине волны 260 нм). Оптимальная концентрация геномной ДНК, которой достаточно для проведения мультиплексной реакции, составила 10–100 нг/мкл. Нативность выделенной ДНК определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле по отсутствию «шлейфа» фрагментов ДНК, а также интенсивности свечения бромистого этидия в УФ свете (рисунок 1).

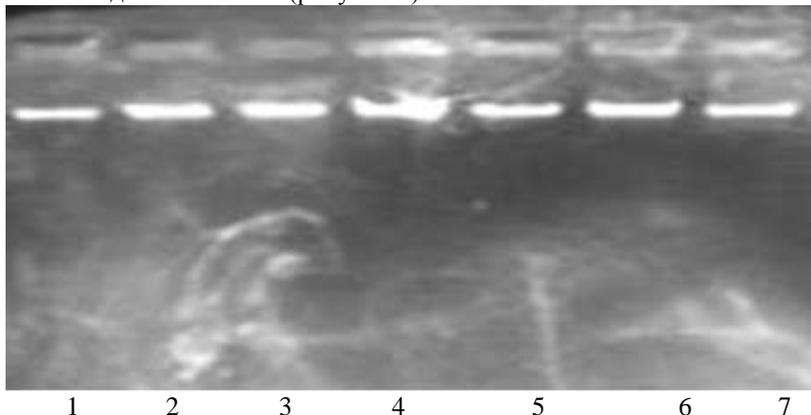
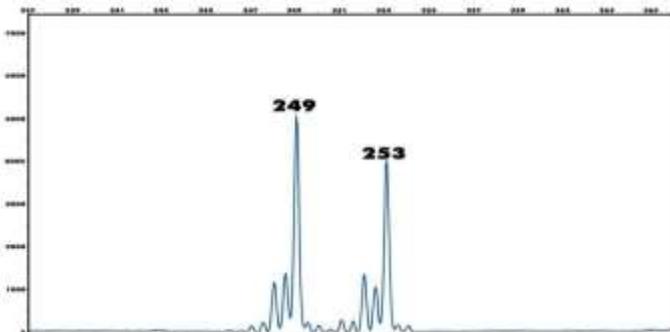


Рисунок 1 – Образцы ДНК после двухкратной очистки хлороформом. ДНК не деградирована, подвижна, не имеет низкомолекулярного шлейфа, с концентрацией около 100 нг/мкл.

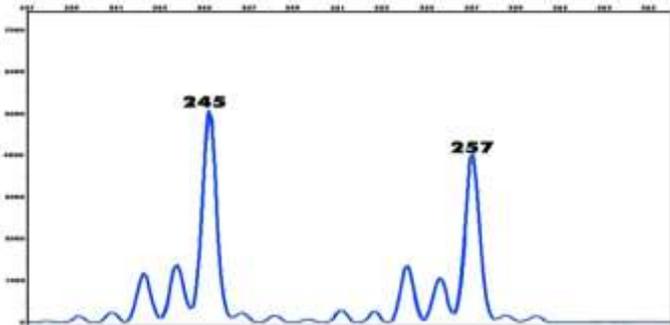
В то же время была подобрана оптимальная концентрация ионов магния (Mg^{2+}) и dNTP. Магний, как двухвалентный противион, необходим для dNTP, а также является кофактором для всех полимераз. Для амплификации необходимо небольшое количество магния.

Перед постановкой в секвенатор, образцы денатурировали в термостате TDB-120 в течение 5 мин при $95^{\circ}C$, с последующим охлаждением на льду в смеси объемом 15 мкл, включающей: 1,2 мкл амплификата, 0,5 мкл LIZ-500 Size Standart и 13,3 мкл Hi-Di Formamide. Затем производили непосредственную загрузку образцов в секвенатор 3500, руководствуясь протоколом. Результаты фрагментного анализа, обработанные с помощью программного обеспечения GeneMapper Software Version 5.0, вносились в форму «генетического сертификата животного», установленного образца. На рисунках 2, 3, 4 представлены результаты проведения оценки достоверности происхождения потомков лошадей по локусу ASB2.

Мать



Отец



Потомок

Размер аллеля, п.н.

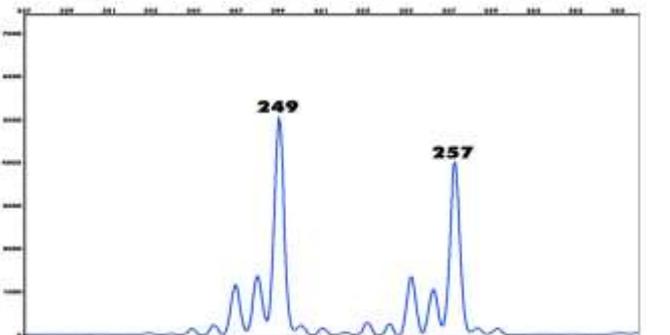
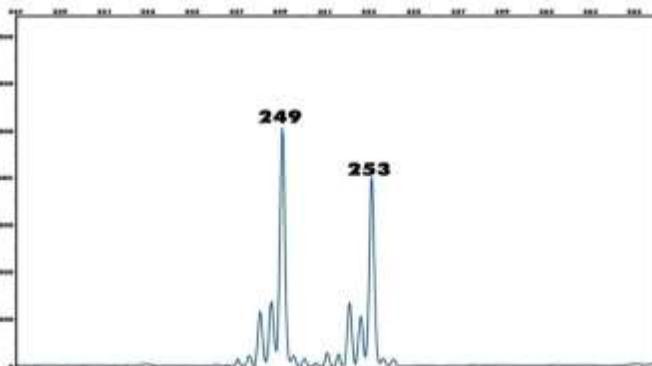


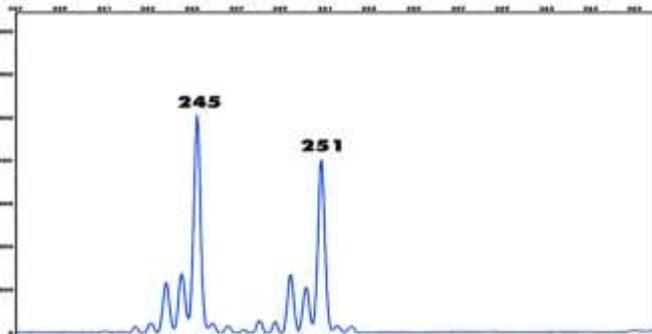
Рисунок 2 – Определение генотипа животного, получившего аллели обоих родителей, на примере локуса ASB2

На рисунке 2 показано, что потомок унаследовал один аллель от матери (249) и один аллель от отца (257). Если по всем 17 микросателлитным локусам просматривается такая же картина, то вероятность подтверждения родства составляет 99,999%.

Мать



Отец



Потомок

Размер аллеля, п. н.

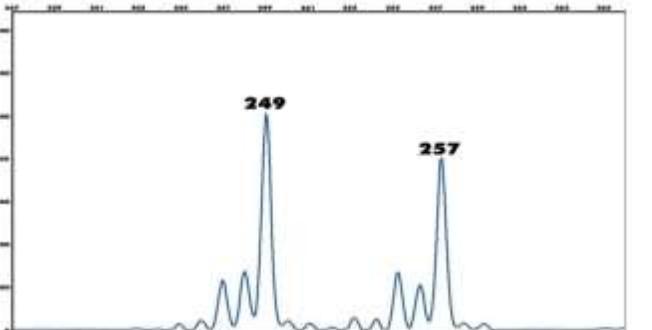
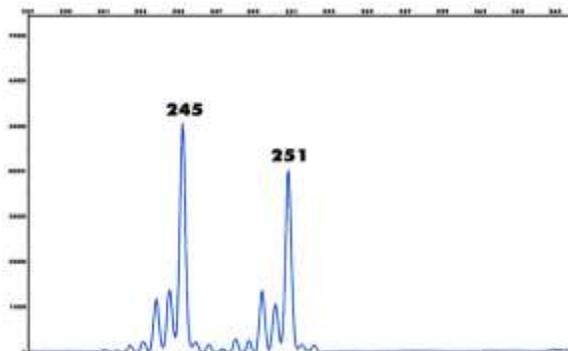


Рисунок 3 – Определение генотипа животного, получившего аллель только от матери, на примере локуса ASB2.

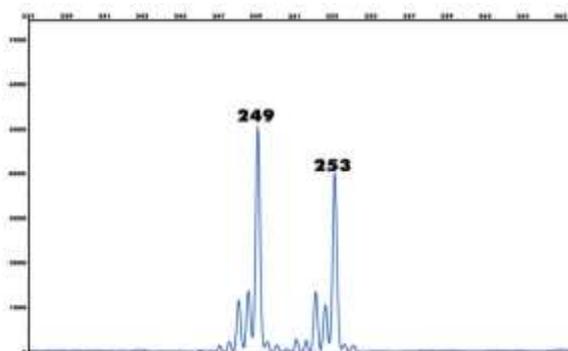
На рисунке 3 видно, что по локусу ASB2 потомок унаследовал аллель только от матери (249), а на рисунке 4 – только от отца (249). Если по 1 локусу потомок наследует аллель от одного родителя, а по

остальным локусам от обоих, то вероятность подтверждения родства составляет 99,973%.

Мать



Отец



Потомок

Размер аллеля, п.н.

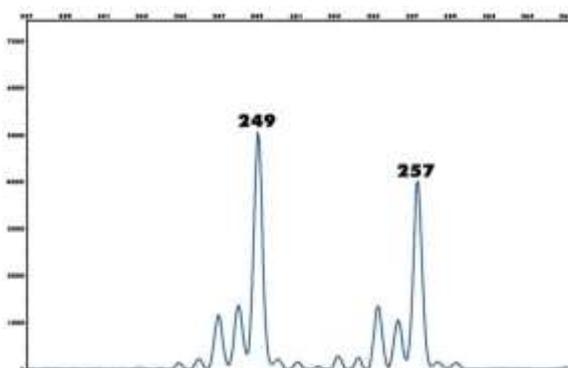


Рисунок 4 – Определение генотипа животного, получившего аллель только от отца, на примере локуса ASB2

Но если же по двум и более локусам у потомка аллель от отца и от матери отсутствовала, то родство полностью исключается. Аналогично, если данные по отцу или матери полностью отсутствовали.

Заключение. Технология контроля происхождения лошадей по STR-локусам позволяет исключить импорт дорогостоящих реактивов, которые являются основной статьёй затрат при проведении генотипирования и паспортизации племенных лошадей. Разработанная технология позволила адаптировать ее к требованиям массового анализа, сделав доступной для СПК республики разводимых племенных лошадей. Внедрение паспортизации племенных лошадей позволяет в раннем возрасте исключать из воспроизводства животных, не соответствующих своим генетическим характеристикам, что способствует интенсификации селекционного процесса в племенном коневодстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцева, М. А. Использование микросателлитных маркеров ДНК в контроле происхождения лошадей / М. А. Зайцева // Вклад молодых ученых в развитие аграрной науки 21 века : материалы междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов, Рязань, 2–3 марта, 2004 г. / М-во сел. хоз-ва Рос. Федерации, Ряз. гос. с.-х. акад. им. П. А. Костычева. – Рязань, 2004. – С. 105-107.
2. Сулимова, Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г.Е. Сулимова // Успехи соврем. биологии. – 2004. – Т. 124, № 3. – С. 260-271
3. Храброва, Л. А. Генетическая дифференциация чистокровных пород лошадей по микросателлитным локусам / Л. А. Храброва, М. А. Зайцева, Л. В. Калинкова // С.-х. биология. Сер. Биология растений. – 2008. – № 2. – С. 31-34.
4. Ailey, E. Linkage of the gene for equine combined immunodeficiency disease to microsatellite markers HTG8 and HTG4; Synteny and FISH mapping to ECA9 / E. Bailey et al. // Anim. Genet. – 1997. – V.28. – P.268-273.
5. Bowling, A. T. Horse genetics / A.T. Bowling. – Walingford, 1996. – P. 200.