

Литература

1. Лобан, Н. А. Крупная белая порода свиней – методы совершенствования и использования / Н. А. Лобан. – Минск : ПЧУП «Бизнесофсет», 2004. – 110 с.
2. Лобан, Н. А. Новый заводской тип свиней крупной белой породы Заднепровский / Н. А. Лобан, О. Я. Василюк, А. С. Чернов // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Гродно : УО Гродненский государственный аграрный университет, 2004. – Т. 39. – С. 77-82.
3. Лобан, Н. А. Достижения белорусских селекционеров / Н. А. Лобан, О. Я. Василюк, А. С. Чернов. // Животноводство России. – 2008. - № 3. – С. 33-34.
4. Эрнст, Л. К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Л. К. Эрнст, Н. А. Зиновьева. – М. : РАСХН, 2008. – 501 с.
5. Разведение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Н. А. Зиновьева [и др.]. – Дубровицы : ВИЖ, 2002. – 112 с. – Авт. также : Гладырь Е.А., Эрнст Л.К., Брем Т.
6. Молекулярная генная диагностика в свиноводстве Беларуси / Н. А. Лобан [и др.]. – Дубровицы : ВИЖ, 2005. – 42 с. – Авт. также : Зиновьева Н.А., Василюк О.Я., Гладырь Е.А.
7. Способ оценки сочетаемости родительских пар свиней по мясо-откормочным качествам потомков : пат. 17677 ВУ : С1 МПК А 01 К 67/02 / Шейко И.П., Лобан Н.А., Василюк О.Я., Маликов И.С. ; заявитель и патентообладатель Научно-практический центр Нац. акад. наук Беларуси по животноводству. – № а20100713 ; заявл. 11.05.2010 ; опубл. 30.10.2013, Афіц. бюл. № 3 (1 ч.). – 5 с. : ил.
8. Методика контрольного убоя. – М., 1976. – 10 с.

(поступила 22.02.2016 г.)

УДК 636.4.082:612.8:577.113.1

А.И. ГАНДЖА, О.П. КУРАК, Н.В. ЖУРИНА, М.А. КОВАЛЬЧУК,
Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, В.П. СИМОНЕНКО, И.В. КИРИЛЛОВА

ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ МУТАЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА СТАДИИ РАННИХ ЭМБРИОНОВ

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

В статье представлены результаты исследований проведения диагностики наследственных мутаций крупного рогатого скота на стадии ранних эмбрионов: синдрома иммунодефицита (BLAD), синдрома сложной деформации позвоночника (CVM), дефицита уридинмонофосфатсинтазы (DUMPS).

Ключевые слова: крупный рогатый скот, эмбрионы, метод ПЦР-ПДРФ, DUMPS, CVM, BLAD

DIAGNOSIS OF HEREDITARY MUTATIONS OF CATTLE AT STAGE OF EARLY EMBRYOS

RUE «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus on Animal Husbandry»

The article presents results of researches on diagnosis of hereditary mutations in cattle at the stage of early embryos: immunodeficiency syndrome (BLAD), complex deformation of the spine syndrome (CVM), deficiency of uridinmonophosphatesynthetases (DUMPS).

Key words: cattle, embryos, PCR-RFLP method, DUMPS, CVM, BLAD.

Введение. Преимущественным направлением современной селекции является отбор лучших генотипов с учётом широкого спектра критериев племенной ценности (воспроизводительные и продуктивные качества, стрессустойчивость, отсутствие наследственных заболеваний) и их массовое воспроизводство путём интенсивного использования метода искусственного осеменения. Это обеспечивает получение здоровых животных, способных к реализации заложенного генетического потенциала.

Ускорение селекционных процессов в скотоводстве невозможно без применения биотехнологических методов воспроизводства. Это связано, в первую очередь, с тем, что коровы относятся к малоплодным животным с генерационным интервалом 4-5 лет.

Одним из путей решения этой проблемы является использование клеточных технологий, в частности, трансплантации эмбрионов, полученных *in vitro* от высокопродуктивных коров-доноров. Это позволяет увеличить число потомков от высокопродуктивных животных, обеспечивает сохранение и рациональное использование их генофонда, разрабатывать методы конструирования новых генотипов с перспективой их массового воспроизводства.

При этом следует учитывать возможность получения эмбрионов, имеющих в генотипе мутантные аллели, определяющие носительство тех или иных наследственных мутаций крупного рогатого скота. Для исключения такой вероятности необходимо проведение оценки генотипа ранних эмбрионов с сохранением их жизнеспособности.

В настоящее время за рубежом с использованием информационных технологий осуществляется мониторинг имеющихся в криобанках эмбрионов, проводятся микробиологические исследования, а также генотипирование эмбрионов с помощью ПЦР-анализа.

Основное преимущество преимплантационной генетической диагностики (ПГД) заключается в возможности трансплантации генетически полноценных эмбрионов, получении здорового потомства и пре-

дупреждении передачи наследственных мутаций будущим поколениям [1, 2, 3]. Это даст возможность более эффективно использовать репродуктивный потенциал отечественного племенного поголовья, снизить частоты встречаемости наследственных заболеваний в популяции путём исключения из селекционного процесса животных-носителей мутантных аллелей.

В настоящее время наиболее интенсивно изучаются локусы генов CD18, UMPS, SLC35A3, точковые мутации в которых ассоциированы с такими заболеваниями, как BLAD (синдром врождённого иммунодефицита), DUMPS (дефицит фермента уридинмонофосфатсинтетазы) и SVM (синдром сложной деформации позвоночника).

В связи с этим диагностика наследственных мутаций крупного рогатого скота на стадии ранних эмбрионов является актуальной задачей, направленной на практическое использование в селекционном процессе методов преселекции с целью оздоровления племенного генотипа республики и повышения сохранности молодняка.

Материал и методика исследований. Исследования выполнялись в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Объектом исследований являлись эмбрионы крупного рогатого скота, полученные *in vitro*, на разных стадиях развития (2-16 клеток, морулы и бластоцисты), оценённые как «хорошие» или «отличные».

Процедура биопсии эмбрионов проводилась с использованием микроскопа «Axiovert 25» и микроманипуляторов «Narishige» в чашке Петри или на предметном стекле в зависимости от метода деления. Фиксация эмбрионов осуществлялась либо с помощью микроприсоски, либо за счёт штрихов, нанесённых на дно чашки Петри. Отделение бластомеров осуществлялось двумя способами: опусканием стеклянной микропипетки-иглы в медиальную плоскость эмбриона с одновременным разделением оболочки и внутриклеточной массы или с использованием полой иглы, позволяющей извлечь несколько бластомеров методом аспирации.

В первом случае деление осуществлялось стеклянной микропипеткой-иглой, изготовленной из стандартных капилляров с внутренним диаметром 0,8 мм и внешним – 1,2 мм по методу Никитина В.А. [4]. Нож устанавливался строго вертикально по отношению к поверхности, на которой находился эмбрион. Во втором случае игла вводилась под оболочку эмбриона и с помощью пневмонасоса часть бластомеров засасывалась в пипетку. Все манипуляции выполнялись под ламинаром в стерильных условиях.

Критериями успешного деления считались: минимальное

повреждение бластомеров, жизнеспособность биопсированных образцов, их восстановление в течение периода культивирования.

Выделение геномной ДНК проводилось двумя методами: «температурного шока» и с использованием лизирующего раствора. В первом случае осуществлялось циклическое нагревание-охлаждение образцов в термостате (первый вариант) либо в жидком азоте (второй вариант), во втором – к образцам добавлялся буфер следующего состава: 15 мМ Tris HCl, pH 8,9, 50 мМ KCl, 0,1% Triton x100, 150 мг/мл протеиназы К. Полученные препараты геномной ДНК подвергались спектрофотометрическому анализу с использованием аппарата GenQuant.

Диагностика мутаций осуществлялась методом ПЦР-ПДРФ с идентификацией генотипов здоровых животных и животных-носителей мутации в гомо- или гетерозиготной формах.

Для проведения генодиагностики были взяты праймеры:

CD18: BLAD1: 5' -TgAgACCAggTCAGgCATTgCgTTCA - 3' и BLAD2: 5'-CCCCCAgCT TCTTgACgTTgACgAggTC -3';

UMPS: AVA1:5'-gCAAATggCTgA AgAACATCCTg-3' и AVA2: 5'-gCTTCTAACTgAACTCCTCgAgT-3';

SLC35A3: F(wild): 5`- CACAATTTgTAggTCTCACTgCA-3`, F(cvm): 5`- CACAATTTgTAggTCTCAATgCA-3` и обратный праймер: R (SLC): 5`- CgATgAAAAAggAACCAAAAaggg-3.

Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы ОДО «Прайм-тех» (г. Минск).

Адекватность подбора праймеров была подтверждена на этапе оптимизации условий проведения ПЦР на материале геномной ДНК и ДНК, полученной из единичных бластомеров.

Реакцию амплификации проводили в 25 мкл смеси: 1х буфер, 2мМ дизоксирибонуклеотидтрифосфаты (0,5мМ каждого), 10-35 пМ каждого праймера, 2,5 ед. а. термостабильной Taq-полимеразы, 100-200нг геномной ДНК. В качестве положительного контроля во всех опытах была использована ДНК, выделенная из спермы или ткани. Использование отрицательного контроля (без ДНК) позволяло оценить вероятность присутствия случайных источников ДНК в случае контаминации амплификационной смеси.

Рестрикционный анализ осуществлялся с использованием эндонуклеаз TagI, Eco88I, Pst I и EcoT22I для CD18, UMPS, SLC35A3 соответственно.

Детекция результатов трёх этапов работы (выделения ДНК, амплификации фрагмента гена методом ПЦР и рестрикционного анализа) осуществлялась методом гель-электрофореза с последующей визуализацией на трансиллюминаторе в проходящем УФ-свете при помощи компьютерной видеосистемы или на генетическом анализаторе

(Agilent Technologies 2200 Tape).

Результаты эксперимента и их обсуждение. В ходе исследований проведена диагностика наследственных мутаций крупного рогатого скота на стадии ранних эмбрионов, что позволит использовать в процессе воспроизводства зародыши, генотипированные по генам, детерминирующим наследственные заболевания, исключив из селекционного процесса носителей мутации.

Проведён сравнительный анализ эффективности получения ДНК из ранних эмбрионов методами «температурного шока» и с использованием лизирующего раствора.

При выделении геномной ДНК методом «температурного шока» рассматривалось два варианта – циклического нагревания/охлаждения и жидкий азот (рисунок 1).

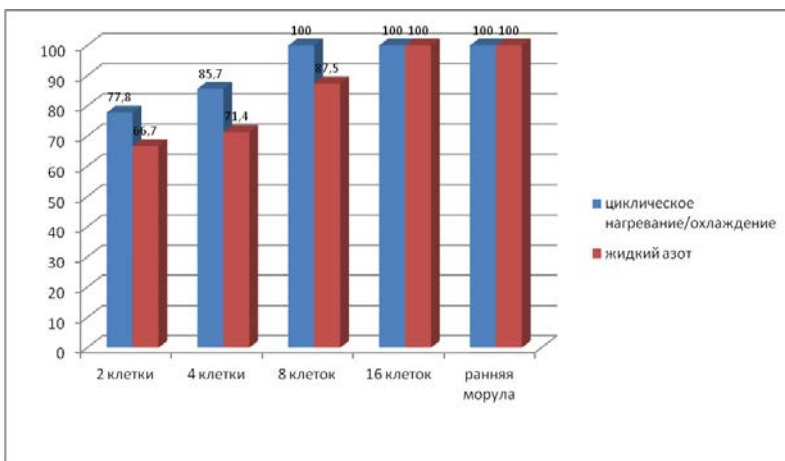


Рисунок 1 – Эффективность выделения ДНК методом «температурного шока»

Установлено, что в первом варианте эффективность выделения ДНК из эмбрионов составила в среднем 89,7 %, в том числе из эмбрионов на стадии двух клеток – 77,8 %, четырёх – 85,7 %, восьми – 100,0 %.

При использовании жидкого азота эффективность была ниже, составив в среднем 79,5 %, в том числе из эмбрионов на стадии двух клеток – 66,7 %, четырёх – 71,4 %, восьми – 87,5 %.

При использовании шестнадцатиклеточных эмбрионов и ранних морул эффективность выделения ДНК в обоих случаях достигла 100,0 %.

Выявлено, что при использовании второго варианта эффективность

снижается на 11,1 %, 14,3 и 12,5 % при выделении из двух-, четырёх- и восьмиклеточных эмбрионов соответственно.

Проведено исследование эффективности получения геномной ДНК из эмбрионов с использованием лизирующего раствора. Положительные результаты были получены в 66,7 % случаев при использовании двухклеточных эмбрионов, 80,0 % – четырёхклеточных, 93,3 % – восьмиклеточных эмбрионов (рисунок 2).

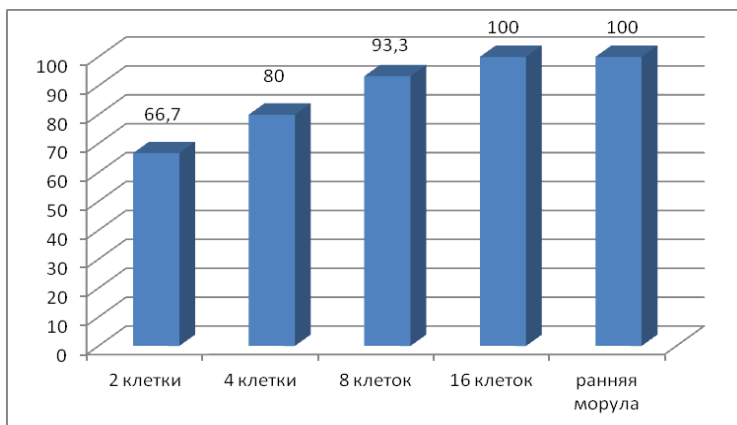


Рисунок 2 – Эффективность выделения ДНК с использованием лизирующего раствора

В результате сравнительного анализа установлено, что наиболее приемлемым следует считать быстрое (до 15 мин) выделение ДНК из биоптата методом «температурного шока» (вариант с циклическим нагреванием-охлаждением в термостате), позволяющее получить больший процент положительных результатов, особенно при использовании эмбрионов на ранних стадиях развития (2-8 клеток), на 11,1 %, 5,7 и 6,7 % соответственно.

Использование данного метода выделения не оказывает существенного влияния на эффективность амплификации, что подтверждается отсутствием необходимости тщательной депротенинизации ДНК. При этом значительно экономится время, исключаются потери ДНК, а также дополнительные источники контаминации, обуславливающие ошибки при генотипировании, снижается стоимость работы за счёт исключения дорогостоящей протеиназы К и других реагентов.

В серии опытов было выявлено, что с увеличением срока хранения эмбрионов в низкотемпературном морозильнике при -80°C (более двух недель) эффективность выделения ДНК снижается до 18-22 %.

На основе изучения термодинамических параметров реакции была

проведена оптимизация условий эффективного образования ПЦР-продукта, включающая: подбор праймеров, оценку стабильности буферной системы, оптимизацию процесса амплификации (по температурному и временному профилю реакции) и режима визуализации, использование адекватных позитивного и негативного контролей.

Проведена оптимизация буферной системы путём подбора концентрации ионов магния Mg^{2+} , dNTPs и Taq-полимеразы, влияющих как на специфичность реакции, так и на выход амплифицированных фрагментов.

Для оценки стабильности системы были проанализированы результаты амплификаций с различной концентрацией праймеров: 10, 15, 20, 25, 30 и 35 пМ. Установлено, для дальнейшей работы можно использовать более низкие концентрации праймеров (25 пМ), обеспечивающие равную (сходную) эффективность по сравнению с концентрацией 30-35 пМ.

При выполнении исследований температурный и временной профили реакции были отрегулированы таким образом, чтобы при амплификации желаемого локуса не наблюдалось побочных неспецифических продуктов ПЦР.

Оценена эффективность прохождения реакции при комбинировании различных методов выделения и количества используемых клеток. При этом объективность результатов генотипирования каждого эмбриона подтверждалась независимой амплификацией как минимум в двух повторностях. Получение для каждого из локусов фрагментов длиной 132 п.о., 108 и 233 п.о. соответственно свидетельствовало об успешной амплификации специфической последовательности.

При использовании в качестве матрицы ДНК, полученной методом «температурного шока» из целых эмбрионов, положительные результаты ПЦР наблюдались в 86,8-92,1 %, полуэмбрионов (на стадии 8-16 клеток) – 68,4-76,3 %. При работе с единичными бластомерами выход снизился до 55,2-65,7 % (рисунок 3).

При использовании в ПЦР образцов ДНК, полученных с использованием лизирующего раствора из целых эмбрионов, положительные результаты наблюдались в 78,9-89,4 % случаев; из полуэмбрионов (на стадии 8-16 клеток) процент успешно завершённой амплификации составил в 60,5-71,1 %. При использовании нескольких бластомеров положительные результаты были получены лишь в 42,1-57,8 % соответственно (рисунок 4).

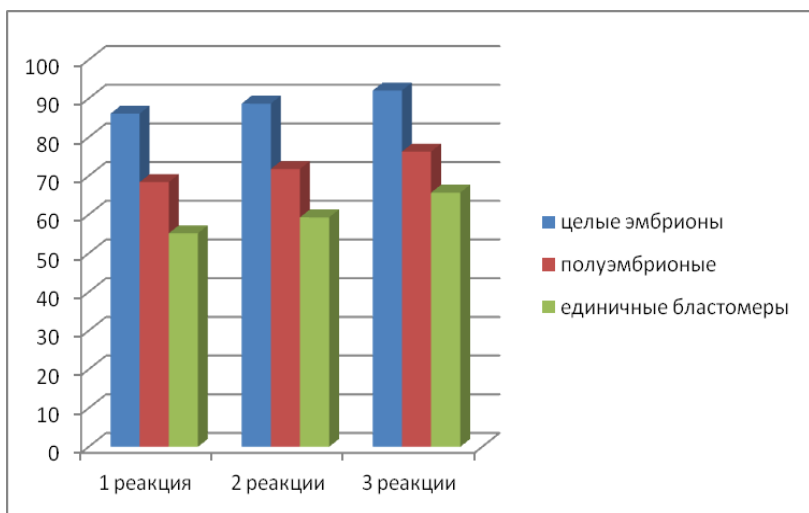


Рисунок 3 – Эффективность ПЦР при использовании в качестве матрицы ДНК, выделенной из эмбрионов на разных стадиях развития методом «температурного шока»

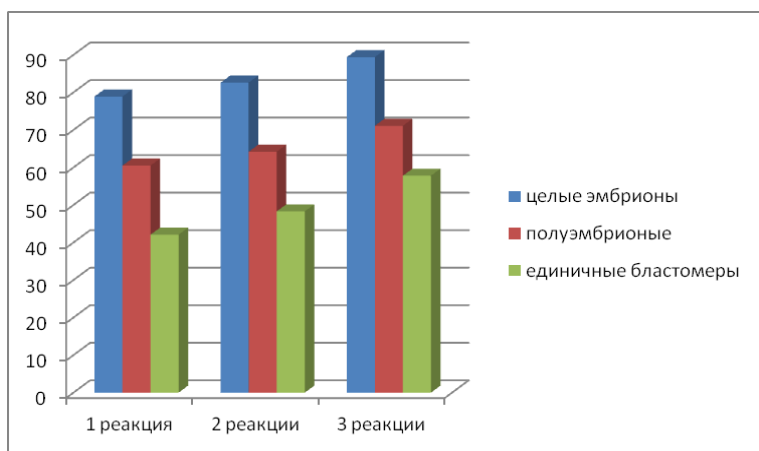


Рисунок 4 – Эффективность ПЦР при использовании в качестве матрицы ДНК, выделенной из эмбрионов на разных стадиях развития с использованием лизирующего раствора

Полученные биоптаты были оценены по полиморфным вариантам локусов CD18, UMPS и SLC35A3. Результаты диагностики ранних эмбрионов на носительство наследственных мутаций BLAD, DUMPS и

CVM приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты диагностики ранних эмбрионов на носительство наследственных мутаций

Мутация	Исследовано эмбрионов, n	Носители мутации, %	Свободные от мутации, %
BLAD	40	2,5	97,5
DUMPS	40	-	100
CVM	40	5,0	95,5

Установлено, что диагностика эмбрионов, особенно на стадии бластоцисты, является одним из перспективных направлений генетического анализа, так как на стадии бластоцисты зародыш состоит примерно из 64-130 клеток. При визуализации трофо- и эмбриобласта без ущерба для развития эмбриона можно удалить до 10 клеток трофобласта. Перспективы анализа большего числа клеток, безусловно, повышают разрешающую способность метода, однако следует учитывать, что культивирование эмбрионов *in vitro* до стадии бластоцисты может существенно снизить способность таких эмбрионов к имплантации.

Использование меньшего количества клеток лучше сказывается на жизнеспособности биопсируемых эмбрионов, в отличие от крупной биопсии, однако недостатками такого подхода являются: методические трудности, связанные с необходимостью работы с микроколичествами материала, и достаточно большая вероятность ошибочной диагностики, обусловленной сложностями анализа единичных клеток.

В ряде опытов было установлено, что для достижения достаточной эффективности генотипирования следует использовать в качестве матрицы не менее 10 % эмбриональной массы, что позволяет получить положительные результаты без значительного снижения способности к дальнейшему развитию биопсируемых эмбрионов.

Этот вопрос также является актуальным для обеспечения высокого уровня имплантируемости эмбрионов.

Результаты проведённых исследований свидетельствуют о принципиальной возможности использования в программах племенной работы с крупным рогатым скотом методов преселекции на ранней стадии эмбрионального развития. При этом значительное сокращение временных затрат вследствие модификации и оптимизации режимов выделения и анализа ДНК позволят завершить весь технологический процесс в течение 36-42 часов.

Заключение. 1. Проведена диагностика ранних эмбрионов крупного рогатого скота на носительство наследственных мутаций: BLAD, DUMPS и CVM. Установлено носительство мутации BLAD у 2,5 % и

мутации SVM у 5,0 % исследованных эмбрионов. Мутации DUMPS не выявлено.

2. Наиболее эффективным (в среднем 89,7 %) для выделения геномной ДНК из ранних эмбрионов является метод «температурного шока» с циклическим нагреванием/охлаждением в термостате.

3. Эффективность ПЦР при использовании в качестве матрицы ДНК, выделенной из эмбрионов, варьировала в пределах от 42,1 до 92,1 % в зависимости от метода выделения и стадии развития используемого эмбриона.

Литература

1. Эрнст, Л. К. Итоги перспективы исследования по биотехнологии животных / Л. К. Эрнст // Зоотехния. – 1999. – № 8. – С. 23-25
2. Ковтун, С. И. Генетические исследования раннего эмбриогенеза в условиях *in vitro* для племенного животноводства / С. И. Ковтун, П. А. Троицкий, М. Г. Порхун // Достижения в генетике, селекции и воспроизводстве с.-х. животных : материалы междунар. науч. конф. (ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, 9-11 июня 2009 г.). – СПб, 2009. – С. 115-118
3. Edwards, R. G. Sexing of live rabbit blastocysts / R. G. Edwards, R. L. Gardner // Nature. – 1967. – Vol. 214. – P. 576-577
4. Никитин, В. А. Техника изготовления микроинструментов для исследования клеток под микроскопом / В. А. Никитин. – Пушино, 1986. – 122 с.

(поступила 16.03.2016 г.)

УДК 636.4:612.621.5

О.И. ГЛИВАНСКАЯ

ВЛИЯНИЕ САНИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ НА ПОДВИЖНОСТЬ СПЕРМЫ ХРЯКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству»

В результате проведения исследований по влиянию антибиотиков широкого спектра действия на энергетическую активность спермы хряков-производителей установлено, что введение 250 мг/ 1 л санирующих препаратов цефотаксима, цефепима и ампициллина в состав разбавителя способствует получению более высоких результатов (на 8,8 %) подвижности половых гамет в сравнении с препаратами контрольной и других опытных групп.

Ключевые слова: антибиотики, подвижность, санация, сперма, хряки-производители.