

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА VOLA-DRB3 В СПЕРМЕ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

***Черникова Е.М., *Зайцева И.Е., **Гавриченко Н.И.**

**УО «Белорусская государственная орденов Октябрьской революции
и Трудового Красного Знамени сельскохозяйственная академия»,
г. Горки, Республика Беларусь*

***УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь*

Введение. Опыт зарубежных стран показывает, что рентабельность молочного скотоводства зависит, прежде всего, от способности к расширенному воспроизводству, продуктивности и длительности периода хозяйственного использования животных. Темпы генетического улучшения молочного скота на 85-90% определяются племенной ценностью быков-производителей. Поэтому оценка их генетических качеств является одним из главных звеньев племенной работы. Однако в нашей республике работа, связанная с оценкой быков-производителей по группам признаков, связанных с воспроизводством и продуктивным долголетием, практически не ведется. Следовательно, крайне необходим дополнительный критерий подбора производителей по данным признакам.

Проведя анализ литературы, мы выбрали в качестве гена-маркера высоко полиморфный ген крупного рогатого скота (VolA-DRB3), связанный с воспроизводительной способностью, продуктивностью, иммунной компетентностью и продуктивным долголетием животных [1, 2, 3].

Цель данных исследований – совершенствование метода ПЦР-ПДРФ исследования аллельного полиморфизма гена VolA-DRB3 в сперме быков.

Материалы и методы исследований. Материалом для исследований служила сперма быков-производителей Могилевского ГПП. Изучение аллельного полиморфизма гена VolA-DRB3 экон 2 проводили ПЦР-ПДРФ анализом с использованием олигонуклеотидных праймеров, указанных в работах van Eijk и др. [4]. Амплификацию проводили в 2 стадии. На первой стадии использовали праймеры HL030 и HL031, а на второй стадии – HL030 и HL032.

На первом этапе осуществлялась амплификация геномной ДНК с праймерами HL030 и HL031. Реакционная смесь для ПЦР включала 50-100 нг ДНК в конечном объеме 15 мкл PCR буфера, 300 нМ каждого праймера, 0,2 мМ каждого dNTP, 2xPCR буфер, 0,6 ед. Tornado полимеразы (Праймтех, Беларусь). Реакцию проводили в амплификаторе MiniOptical CFB-3120 (Bio-RAD). Температурный профиль для анализа полиморфизма гена VolA-DRB3 экон 2 включает 15 циклов. Циклы программы амплификации следующие: 1-й цикл – при 95°C 15 мин., 2-15-й циклы – 4 сек. при 99°C, 30 сек. при 60°C и 30 сек. при 72°C, финальная элонгация при 72°C в течение 2 минут, охлаждение при 16°C 10 сек.

Вторая реакция амплификации состояла из 25 циклов: 1-й цикл - 95°C 15 мин., 2-25-й циклы – 4 сек. при 99°C, 30 сек. при 65°C и 30 сек. при 72°C, финальная элонгация при 72°C в течение 2 минут, охлаждение при 16°C 10 сек. с использованием 2 мкл ПЦР продукта первой реакции в качестве матрицы в конечном объеме 50 мкл. Каждая ПЦР содержала 300 нМ праймера HL030, 300 нМ праймера HL032, 0,2 мМ каждого dNTP, 2xPCR буфер, 0,6 ед. Tornado полимеразы. Продукты амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле, визуализировали в ультрафиолете после окрашивания бромистым этидием с целью обнаружения продуктов нужного размера.

Продукты амплификации подвергались обработке эндонуклеазами Rsa I, Pvu II, Hae III, Rsa I/Pvu II (Fermtas/Thermo Fisher Scientific). Конечный объем для рестрикции составлял 20 мкл, ПЦР продукта - 10 мкл. Для гидролиза ДНК использовали 1-2 ед. активности фермента. Реакцию проводили в течение часа при 37°C по стандартной методике.

Продукты рестрикции анализировали в 10% полиакриламидном геле, где соотношение акриламида и бисакриламида составляло 30:1. В лунки для проведения вертикального электрофореза помещали по 6 мкл исходного образца. Напряжение электрического поля составляло 100-150 В. Длительность электрофореза - 4-5 часов. ДНК визуализировали окрашиванием в растворе этидия бромида. Генотипы определяли на основании рестрикционной карты на основе рестрикционного анализа, разработанной van Eijk и др. в 1992 году [4].

Результаты и обсуждение. Ряд авторов [1, 2, 3] для определения аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* экзон 2 рекомендуют использовать амплификацию с применением одного этапа. В наших многократных исследованиях после проведения амплификации только с одной парой праймеров образовывались продукты, имеющие неспецифические фрагменты, мешающие дальнейшему проведению анализа.

Поэтому мы модифицировали указанный метод и применили второй этап амплификации, что позволило сократить количество неспецифических фрагментов. После проведения второго этапа амплификации образовался фрагмент, равный 281, 284 п.н. (рисунок 1). Дорожки 2-9, 11-17 образцы, содержащие фрагмент 281, 284 п.н. 1,10 – маркер молекулярного веса (100 – 1500 п.н.).

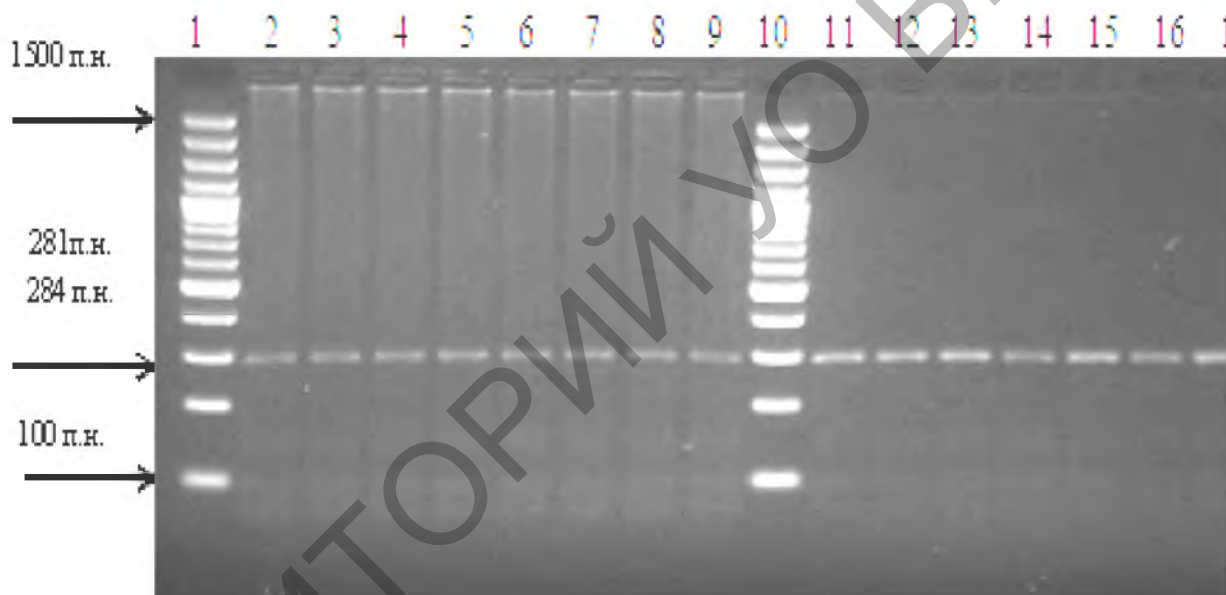


Рисунок 1 - Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК с праймерами к гену *BoLA-DRB3* экзон 2 HL030, HL031, HL032

Для проведения рестрикционного анализа фрагмента гена *BoLA-DRB3* экзон 2 длиной 281 или 284 п.н. были использованы ферменты эндонуклеазы рестрикции *RsaI*, *PsuI*, *Hae III*. Установлено, что распределение сайтов рестрикции эндонуклеаз *Rsa I*, *PsuI*, *Hae III* в экзоне 2 гена *BoLA-DRB3* у разных аллельных вариантов гена *BoLA-DRB3* различно, что приводит к образованию после обработки продуктов амплификации эндонуклеазами специфического спектра фрагментов ДНК, которые отличаются друг от друга по количеству и длине (ДНК-паттерны). Сопоставление ДНК-паттернов, полученных с использованием 3 указанных рестрицирующих эндонуклеаз, позволяет идентифицировать 54 аллеля гена *BoLA-DRB3*.

Выводы. Модифицированный нами ПЦР-ПДРФ метод пригоден для массового типирования животных и позволяет точно идентифицировать аллели гена *BoLA DRB 3* в сперме быков-производителей.

Литература. 1. Ковалюк, Н. В. Использование генетического маркера *BoLA – DRB 3* для получения помесей F1 пород КРС молочного направления / Н. В. Ковалюк, В. Ф. Сацук // Вестник РАСХН. – 2010. – № 4. – С.65-68. 2. Смазнова, И. А. Анализ генетического потенциала племенных быков Брянской области по гену *BoLA-DRB3* / И. А. Смаз-

нова, К. Н. Немцова, В. В. Заякин, И. Я. Нам // Факторы экспериментальной эволюции организмов. Сборник научных трудов. – Киев: Логос, 2013. – Т. 13. – С. 99-105. 3. Якушева, Л. Н. Способ подбора быков-производителей с использованием маркера BoLA – DRB 3 / Л. Н. Якушева // Сб. науч. трудов Северо-Кавказского научно-исследовательского института животноводства. – Краснодар, – 2012. – Т. 1. – № 1. – С. 57-62. 4. Van Eijk, M. J. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP / M. J. van Eijk, J. A. Stewart-Haynes, H. A. Lewin // Anim Genet. 1992. V. 23(6). P. 483-496.

УДК 619.+636.2+636.087.7

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ ДИСПЕПСИИ ТЕЛЯТ

Эшбуриев Б.М., Нормурадова З.Ф., Эшбуриев С.Б.

Самаркандский сельскохозяйственный институт, г. Самарканд, Узбекистан

Введение. Уже более 40 лет ученые ветеринарного профиля работают над проблемой борьбы с острыми желудочно-кишечными болезнями новорожденных телят, однако заболеваемость молодняка не снизилась, так как не изменился тип кормления стельных коров и нетелей, не улучшилось качество кормов. Попытки представить диспепсию как инфекционное заболевание и разработать защитные меры с применением специфических биологических препаратов не увенчались успехом. Однако нельзя исключать возможность появления острых инфекционных и инвазионных заболеваний (колибактериоз, парвовирусная, аденовирусная инфекции, вирусная диарея, криптоспоридиоз и др.) на фоне диспепсии или как самостоятельные заболевания новорожденных телят [2].

По литературным данным диспепсия является общим заболеванием организма и протекает расстройствами ферментативной и всасывательной функции пищеварительной системы, обезвоживанием и интоксикацией организма, нарушением водно-электролитного обмена.

При возникновении болезней желудочно-кишечного тракта неонатальной этиологии основными этиологическими факторами является недостаточность в рационе меди, цинка и кобальта на 15-20%, марганца и йода на 10-40% от потребности организма стельных коров. У телят, рожденных от этих коров, выявлено уменьшение количества иммуноглобулинов по сравнению с физиологической нормой [4].

Диспепсией телята заболевают в основном в первые три дня жизни, что характеризуется в начале болезни общей слабостью, снижением аппетита, поносами с примесью слизи и свернувшегося молозива. По мере развития болезни поносы усиливаются, кал серовато-желтоватый, неприятного запаха с примесью слизи и крови, реакция на окружающее понижена, появляются признаки обезвоживания (сухость носового зеркала, кожи, западание глазных яблок) и токсикоза (фибрилярные подергивания мышц, ступорообразное состояние, периодические клонико-тонические судороги) [3].

По данным Ю.Н. Алехина диспепсия телят характеризуется синдромами печеночной недостаточности – цитологический, синдром холестаза, гепатодепрессивный синдром [1].

При диспепсии телят за счет сильного обезвоживания организма повышаются гематокритные показатели крови. Ученые наблюдали повышение гематокрита при обезвоживании организма первой степени – в среднем до 50-55%, второй степени – 60-65% и третьей степени – обезвоживание организма до 70-75% (в норме – 40-45%) [2, 5].

Возникает необходимость введения в организм сложных растворов, содержащих в составе натрий хлорид, кальций хлорид, калий хлорид, натрий гидрокарбонат и глюкозу [2].

Материалы и методы исследований. С целью усовершенствования мето-