

Science and Biotechnology. – 2014. – № 5 (17). 3. Мартинишин, І. М. Стан імунної системи поросят після відлучення їх від свиноматки / І. М. Мартинишин // Біологія тварин. – 2009. – Т. 11, № 1-2. – С. 292–293. 4. Данчук, В. Шляхи підвищення продуктивності свинарства / В. Данчук // Тваринництво України. – 2000. – № 7-8. – С. 2–3. 5. Нові ефективні препарати для профілактики і лікування захворювань у тварин / В. Влізло., О. І. Віщур, І. В. Кичун [та ін.] // Вет. мед. Міжвід. темат. наук.збірн / Інститут експерим. і клін. вет. мед. УААН. – Харків. – 2004. – № 9. – С. 169-173. 6. Віщур, О. І. Ефективність дії препарату «Антоксан» на резистентність поросят після відлучення від свиноматок / О. І. Віщур // Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин УААН і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів, 2006. – Вип. 7, № 1–2. – С. 156–160. 7. Чумаченко, В. Ю. Довідник по застосуванню біологічноактивних речовин у тваринництві / В. Ю. Чумаченко, С. В. Стояновський, Р. Й. Кравців. – К. : Урожай, 1989. – 263 с. 8. Пат. 88819 Україна, МОН В01D 11/02, А61К 35/00 Спосіб переробки рослинної сировини / Бородатов Олександр Іванович; Хмельницький Григорій Олександрович; заявник і власник патенту Бородатов Олександр Іванович – № UA 88819 C2; заявл. 21.01.08; опубл. 25.11.09, Бюл. № 22. 9. Вабищев, Ф. С. Безопасные методы отбора проб крови у свиней / Ф. С. Вабищев, Л. А. Дудников // Сучасна ветеринарна медицина. – 2010. – № 2. – С. 7-10.

Статья передана в печать 25.03.2016 г.

УДК 636.2.054.082.2

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ НАСЛЕДСТВЕННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ ЦИТРУЛЛИНЕМИЯ (BC) У БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ РУП «ВИТЕБСКОЕ ПЛЕМПРЕДПРИЯТИЕ»

Вишневец А.В., Красочко П.П.

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

ДНК-тестирование позволяет выявлять носителей наследственного заболевания цитруллинемия (BC), что снизит темпы распространения аномалий в генофонде породы.

The citrullinaemia (BC) allows to reveal DNA-testing carriers of a hereditary disease that will reduce rates of distribution of anomalies in a breed gene pool.

Ключевые слова: быки-производители, ДНК-диагностика, селекция, идентификация, цитруллинемия.

Keywords: bull for service, DNA-diagnostics, selection, identification, citrullinaemia.

Введение. Интенсивное использование мирового породного генофонда позволило значительно повысить генетический потенциал продуктивности животных. В последние годы все большее значение в оценке генома животных приобретают молекулярно-генетические методы, которые позволяют изучать наследственность на уровне ДНК и идентифицировать рецессивные мутации, которые не поддаются выявлению по фенотипу [4].

У крупного рогатого скота выявлено свыше 400 генетически обусловленных морфологических и функциональных нарушений. При широком применении искусственного осеменения с использованием спермы лучших быков можно получить десятки тысяч потомков и легко представить последствия, когда один из таких производителей является носителем рецессивного летального гена [2].

Интродукция вредных мутаций как следствие миграции генов из одной популяции в другие при импорте и использовании племенного материала в товарных и племенных хозяйствах – один из главных факторов появления генетических аномалий [3].

Большое число аномалий установлено в голштинской породе крупного рогатого скота. Это связано с особенностями разведения и воспроизводства: в породе, как известно, существует ограниченное число линий, родственных групп, и формирование популяции голштинского скота на его родине происходило при интенсивном использовании небольшого числа быков. Так, в родословных практически всех животных породы в 7-10-м рядах предков имеется, по крайней мере, один из 20 быков-основателей. То есть при формальном аутбридинге фактически трудно избежать подборов пар, в родословных которых нет этих основателей или их потомков. С одной стороны, такая система разведения при интенсивном отборе способствует консолидации породы, с другой – повышает вероятность перехода в гомозиготное состояние комплекса мутантных генов, обуславливающих различные нарушения [5].

Анализ многочисленных источников свидетельствует о породной специфичности скрытого груза генных и хромосомных мутаций, связанной с миграциями, что вызывает необходимость обоснования и разработки новых принципов селекции, системы мониторинга, включая вопросы сертификации племенного материала, особенно при импорте [4].

Большое значение в животноводстве имеет выявление моногенных наследственных заболеваний. Цитруллинемия – это врожденное нарушение обмена веществ из-за дефицита фермента в цикле биосинтеза мочевины. Эта болезнь впервые была описана у людей, но относительно недавно установлена у молочного скота. При селекционном использовании быков-носителей данного заболевания на большом поголовье оно быстро распространяется в популяции и наносит значительный экономи-

ческий ущерб [1].

Исследования на наличие наследственных аномалий, разработки новых принципов селекции, системы мониторинга, включая вопросы сертификации племенного материала, особенно при импорте – обязательное условие ведения селекционно-племенной работы в Республике Беларусь. Проблемы генетической безопасности использования племенного материала в условиях животноводства становятся актуальными и практически значимыми.

Цель исследований – провести молекулярно-генетическую идентификацию и выявить носителей наследственного заболевания цитруллинемия (BC) у быков-производителей РУП «Витебское племпредприятие».

Материалы и методы исследований. ДНК-тестирование 26 быков-производителей РУП «Витебское племпредприятие» на наличие генетической аномалии цитруллинемия (BC) проводили в ПЦР-лаборатории УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». Объектом исследований были образцы ДНК, полученные из спермы быков-производителей.

Диагностика состояла из следующих этапов: выделение ДНК, амплификация участка гена-носителя мутации, рестрикционный анализ. Выделение ДНК проводили с помощью набора «Нуклеосорб. Комплекция С» (ОДО «Праймтех», РБ).

Для амплификации участка ДНК, содержащего возможную мутацию, использовали праймеры, синтезированные в ОДО «Праймтех»:

BCF – 5' GGCCAGGGACCGTGTTCATTGAGGACATC 3',

BCR – 5' TTCCTGGGACCCCGTGAGACACATACTTG 3'.

Подготовку реакционной смеси проводили следующим образом (на одну реакцию): праймеры по 20 pmol, ПЦР-буфер (10x) – 2,5 мкл, DNTP's (20 mM) – 3 мкл, ДНК-полимераза (10Ед./мкл) – 0,2 мкл, деионизированная вода – 5,9 мкл. Объем вносимой выделенной ДНК – 5 мкл.

Постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили в соответствии с температурно-временными циклами: первоначальное прогревание в течение 5 минут при температуре 95°C. Затем денатурация 30 с при температуре 95°C, отжиг 30 с при температуре 61°C, элонгация 30 с при температуре 72°C (35 циклов), заключительная элонгация 10 минут при температуре 72°C (1-й цикл).

Рестрикционный анализ проводили, используя рестриктазу *Avall*. Для этого готовили реакционную смесь из расчета 2,5 мкл буфера для рестриктазы, 0,1 мкл рестриктазы (10 Ед./мкл), 12,4 мкл деионизированной воды и 10 мкл продуктов амплификации. Подготовленные пробирки помещали в термостат при 37°C на 3 часа, после чего инактивировали рестриктазу при 60°C в течение 20 минут.

Визуализацию проводили в 2,5% агарозном геле при напряженности электрического поля 10 В/см геля.

Индекс по генотипу (I_r) быка определяли по формуле:

$$I_r = (I_o + I_M) \times 0,5,$$

где I_r - индекс по генотипу (происхождению);

I_o - индекс отца;

I_M - индекс матери;

0,5 – значение относительной племенной ценности при проверке и оценке быков по потомству.

Материалом для исследований служили племенные карточки быков-производителей.

Результаты исследований. Основной структурной единицей породы является линия. Разведение по линиям обеспечивает сохранение и совершенствование племенных и продуктивных качеств породы. Процесс возникновения новых и исчезновения старых линий происходит в породе непрерывно, однако продолжительность существования линии находится в зависимости от степени препотентности производителей, а также от эффективности селекционно-племенной работы.

Генеалогическая структура исследуемых быков-производителей РУП «Витебское племпредприятие» представлена на рисунке 1.

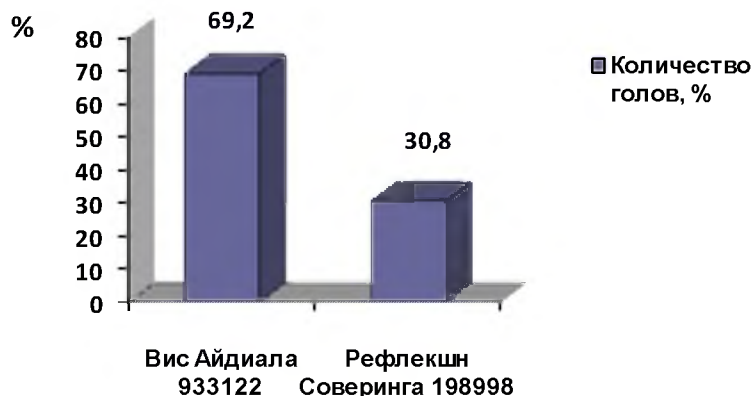


Рисунок 1 - Генеалогическая структура исследуемых быков-производителей РУП «Витебское племпредприятие»

Все исследуемые быки-производители принадлежат к линиям голштинской селекции: Вис Айдиала 933122 (69,2%) и Рефлекшн Соверинга 198998 (30,8%).

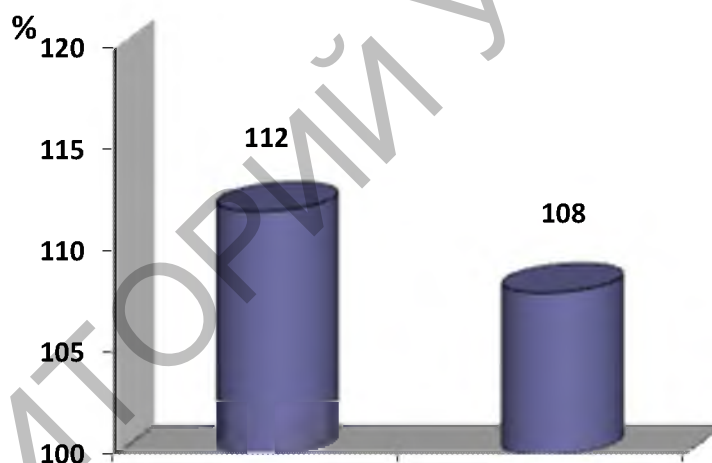
Исследуемые быки-производители были получены в различных хозяйствах Республики Беларусь и Российской Федерации (таблица 1).

Таблица 1 – Место рождения исследуемых быков-производителей

Наименование хозяйства	Количество быков-производителей, %
ГУСП «Племзавод «Мухавец», РБ	3,85
РУСП «Племзавод «Россь», РБ	3,85
КУСП «Красная Звезда», РБ	11,53
КСУП «Селекционно-гибридный центр «Заречье», РБ	7,69
МРУП «Агрокомбинат «Ждановичи», РБ	3,85
СПК «Агрокомбинат «Снов», РБ	3,85
СПК «Остромечево», РБ	3,85
Российская Федерация	61,53

При анализе данных таблицы 1 видно, что больше всего из исследуемых быков-производителей получено в Российской Федерации. Их количество составляет 61,53%. Наибольшее количество быков-производителей, полученных в Республике Беларусь, были из КУСП «Красная Звезда» – 11,53%. Следует отметить, что на племпредприятие поступают быки и из лучших высокопродуктивных товарных стад Республики Беларусь: СПК «Агрокомбинат «Снов» (3,85%), СПК «Остромечево» (3,85%) и др.

При определении племенной (генетической) ценности крупного рогатого скота учитываются фенотипические и генотипические признаки. Индекс по генотипу быков зависит от генотипов отца и матери. В связи с этим нами проведен сравнительный анализ результатов индекса по генотипу у быков разных линий (рисунок 2).



Вис Айдиала 933122 Рефлекшн Соверинга
Рисунок 2 – Индекс генотипа быков-производителей разных линий

Анализ рисунка 2 показал, что быки-производители линии Вис Айдиала 933122 имели индекс по генотипу 112, что выше на 4%, чем у быков линии Рефлекшн Соверинга 198998. У всех исследуемых быков-производителей высокий индекс генотипа, так как племенная ценность родителей высокая. Все исследуемые быки-производители происходят от коров-матерей, отличающихся высоким удоем (свыше 10000 кг) и от отцов, имеющих высокопродуктивных женских предков, что играет важную роль в формировании и реализации продуктивного потенциала потомков.

Цитруллинемия – это генетическая аномалия, обусловленная энзиматическим дефектом в цикле биосинтеза мочевины. Дефицит аргининсукцинатсинтетазы (или цитруллинемия, locus 2039) обусловлен наличием гена ASS. Анализ последовательности гена ASS показал, что нуклеотидная замена С на Т является точечной мутацией у крупного рогатого скота. Известно, что у животных-носителей мутации цитруллинемия исчезает сайт рестрикции для эндонуклеазы *Ava II*, и этот полиморфизм используется для ПЦР-диагностики. Ген ASS локализован на 11-й хромосоме, в пептидном продукте которого происходит замещение аминокислоты Arg 86, вследствие чего утрачивается его активность [1].

Процесс деградации аминокислот происходит преимущественно в печени. При этом освобождается аммиак, являющийся клеточным ядом. При высоких концентрациях он повреждает главным образом нервные клетки. Поэтому аммиак должен быстро инактивироваться и выводиться из организма. Мутационное нарушение обмена пуринов и пиримидинов отражается и на метаболизме нук-

леиновых кислот. В этой связи образующаяся в результате цитруллиноурии нуклеотидная недостаточность приводит к летальному исходу рецессивных гомозигот, что существенно отражается на экономике ведения животноводства [5].

Телята, гомозиготные по мутантному гену, при рождении выглядят нормальными, но через 2-6 суток у них проявляются депрессия ЦНС, атаксия, слепота, затем начинаются конвульсии, повышается температура и наступает смерть. Гетерозиготных носителей этой мутации выявляют с помощью комбинированного ПЦР-анализа и подтверждения наличия сайта рестрикции.

Визуализацию результатов после ПЦР провели в агарозном геле. Результаты рестриционного анализа представлены на рисунке 3 (электрофореграммы).

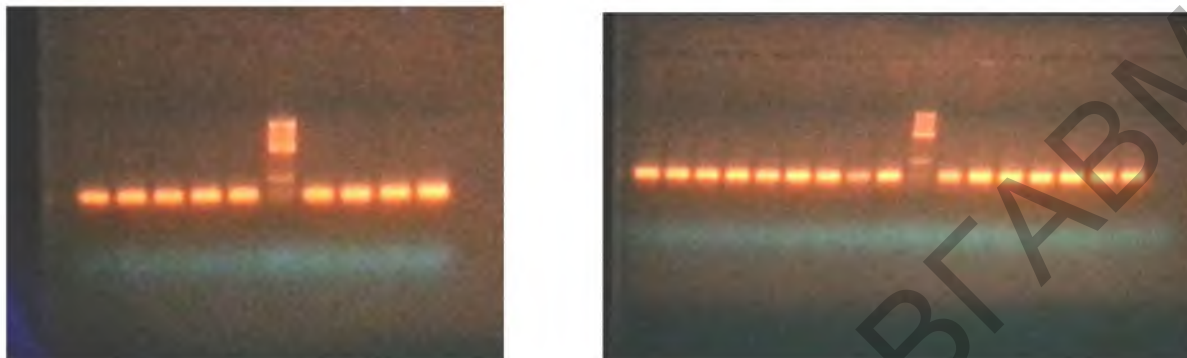


Рисунок 3 – Результаты рестриционного анализа на наличие генетической аномалии цитруллинемия (BC)

В результате проведенной молекулярно-генетической идентификации наследственного заболевания установлено, что среди исследуемых быков-производителей РУП «Витебское племпредприятие», таких как Афон 200538, Аракс 200619, Абрикос 200646, Акцент 200625, Варяг 300491, Динар 300484, Динго 300485, Крит 200578, Кубик 200581, Лакомка 200538, Лот 200602, Сигнал 200546, Салют 200544, Сибиряк 200543, Статус 200541, Тироль 200628, Табор 200562, Текстиль 200605, Байкал 200647, Щербет 200644, Мушкетер 200517, Шторм 200505, Шанхай 200519, Штрих 200639, Шиповник 200643, Монако 200631 носителей генетической аномалии цитруллинемия (BC) нет.

На основании исследований рекомендуем для исключения распространения мутации BC проводить регулярно мониторинг быков-производителей методом ПЦР-ПДРФ анализа. Своевременный ДНК-скрининг мутаций существенно снизит темпы распространения аномалий в генофонде породы.

Заключение. Установлено, что все исследуемые быки-производители принадлежат к линиям голштинской селекции: Вис Айдиала 933122 (69,2%) и Рефлексн Соверинга 198998 (30,8%). Больше всего исследуемых быков-производителей получено в Российской Федерации (61,53%). Наибольшее количество быков-производителей, полученных в Республике Беларусь, были из КУСП «Красная Звезда» – 11,53%. На племпредприятие поступают также быки из лучших высокопродуктивных товарных стад Республики Беларусь: СПК «Агрокомбинат «Снов» (3,85%), СПК «Остромечье» (3,85%). Быки-производители линии Вис Айдиала 933122 имели индекс по генотипу 112, что выше на 4%, чем у быков линии Рефлексн Соверинга 198998.

В результате проведенной молекулярно-генетической идентификации наследственного заболевания установлено, что среди исследуемых быков-производителей РУП «Витебское племпредприятие» носителей генетической аномалии цитруллинемия (BC) нет. На основании исследований рекомендуем регулярно проводить мониторинг быков-производителей для исключения распространения мутации цитруллинемия (BC), что предотвратит распространение аномалии и уменьшит экономический ущерб.

Литература. 1. Генетическая природа наследственных болезней крупного рогатого скота и молекулярно-генетические методы их диагностики / Е. С. Усенбеков [и др.] // Генетика и разведение животных. – 2014. – № 3. – С. 3-5. 2. Использование ДНК-технологий для генетического маркирования хозяйственно ценных признаков и идентификации скрытых носителей иммунодефицита крупного рогатого скота / М. Е. Михайлова [и др.] // Современные методы генетики и селекции в животноводстве : материалы Междунар. науч. конф., Санкт-Петербург, 26-28 июня 2007 г. / ВНИИГРЖ ; редкол. : П. Н. Прохоренко [и др.]. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 267-273. 3. Молекулярные методы в диагностике заболеваний и наследственных дефектов у сельскохозяйственных животных / Е. А. Гладырь [и др.] // Зоотехния. – 2010. – № 8. – С. 26-27. 4. Эрнст, Л. К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Л. К. Эрнст, Н. А. Зиновьева. – Москва : РАСХН, 2008. – 508 с. 5. Meydan, H. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphatesynthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey / H. Meydan, M. A. Yildiz, J. S. Agerholm // Acta Veterinaria Scandinavica. – 2010. – Vol. 52. – P. 56-63.

Статья передана в печать 31.03.2016 г.