

УДК 636.4.082.12

UDC 636.4.082.12

06.00.00 Сельскохозяйственные науки

Agricultural sciences

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-ПДРФ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ОВЕЦ

OPTIMIZATION TECHNIQUES FOR PCR-RFLP FOR GENOTYPING SHEEP

Широкова Надежда Васильевна
к.биол.н., научный сотрудник

Shirokova Nadegda Vasilevna
Cand.Biol.Sci.
researcher

Колосов Юрий Анатольевич
д.с.-х.н., профессор

Kolosov Yuri Anatolyevich
Doctor of Agricultural Sciences, professor

Гетманцева Любовь Владимировна
к.с.-х.н., ст. преподаватель

Getmantseva Lyubov Vladimirovna
Cand.Agr.Sci., senior lecturer

Радюк Анастасия Владимировна
аспирант

Raduk Anastasia Vladimirovna
postgraduate student

Бакоев Некруз Фарходович
Аспирант
*Донской государственный аграрный университет,
Персиановский, Россия*

Bakoev Nekruz Farhadovich
graduate
Don State Agrarian University, Persianovski, Russia

Диагностика методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестриционных фрагментов) является стандартным анализом точковых мутаций для диагностики аллельного полиморфизма генов-кандидатов, связанных с продуктивными качествами сельскохозяйственных животных. По длине фрагментов (ПДРФ) делают вывод об отсутствии или наличии точковой мутации, а также о гомозиготности или гетерозиготности особи. Целью нашей работы было оптимизация протоколов проведения ПЦР-ПДРФ-анализа для генотипирования овец по гену гормона роста (GN), гену дифференциального фактора роста-9 (GDF9) и гену кальпастатина (CAST)

Diagnosis by PCR-RFLP (polymerase chain reaction – polymorphism of the lengths of restriction fragments) is the standard analysis of point mutations for the diagnosis of allelic polymorphism of candidate genes related with productive qualities of farm animals. Along the length of the fragments (RFLP) make a conclusion about the absence or presence of the point mutation, and homozygosity or heterozygosity of the individual. The aim of our work was the optimization of protocols for conducting PCR-RFLP analysis for genotyping sheep for genes of the growth hormone gene differential growth factor and gene of calpastatin

Ключевые слова: ОВЦЫ, ДНК, ПЦР, ПДРФ, ГЕН GN, GDF9, CAST

Keywords: SHEEP, DNA, PCR, RFLP, GENE GN, GDF9, CAST

Полимеразная цепная реакция - экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Помимо амплификации (увеличения числа копий) ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется

в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов [12, 13, 14].

Метод ПЦР основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах, с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК [7].

В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20-40 тысяч пар нуклеотидов. Это всё равно значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки. Например, геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований [10,11].

Диагностика методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) является стандартным анализом точковых мутаций для диагностики аллельного полиморфизма генов-кандидатов, связанных с продуктивными качествами сельскохозяйственных животных. По длине фрагментов (ПДРФ) делают вывод об отсутствии или наличии точковой мутации, а также о гомозиготности или гетерозиготности особи [5, 8].

В настоящее время возрастает интерес к технологиям, основанным на использовании ДНК-маркеров, которые находят широкое применение в национальных селекционных программах ряда стран с развитым животноводством и оказывают значительное воздействие на улучшение состава туши, качество мяса и эффективность производства мяса [1, 2, 3].

В качестве ДНК-маркеров рассматриваются гены, аллельные варианты которых связаны с фенотипическим проявлением экономически важных признаков животных (воспроизводительные качества, вес, рост, выход мяса и т.д.) [4, 5, 6, 9].

На сегодняшний день, в качестве перспективных генов маркеров рассматривают ген кальпастина отвечающий за мясную продуктивность овец (CAST), ген гормона роста (GH), ген дифференциального фактора роста (GDF9) отвечающий за воспроизводительные качества овец [3].

Целью нашей работы было оптимизация протоколов проведения ПЦР-ПДРФ-анализа для генотипирования овец по гену гормона роста GH, гену отвечающему за воспроизводительные качества GDF9 и гену отвечающему за мясную продуктивность CAST.

Материал и методика исследований

Для проведения молекулярно-генетических исследований у животных были отобраны образцы ткани с ушной раковины площадью 1 см². ДНК выделяли с применением набора реагентов DIAtom DNA Prep 100 (ООО «НПФ Генлаб»). Анализ проводили методом ПЦР-ПДРФ (полимеразной цепной реакции - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (Россия).

Условия ПЦР гена GDF9: первоначальная денатурация – 2 мин при 94⁰С; денатурация 94⁰С - 30с, отжиг 63⁰С - 40с, элонгация 72⁰С – 30 с (35 циклов), завершающая элонгация при 72⁰С 4 мин. ПЦР-ПДРФ анализ фрагмента гена GDF9 длиной 462 н.п., проводили с использованием эндонуклеазы BstH1 (ООО «СибЭнзим-М»).

Условия ПЦР гена GH: предварительная денатурация при 95⁰С - 5 мин. и далее 33 цикла: 95⁰С - 45 с, 60⁰С - 45 с, 72⁰С - 45с; заключительный синтез при 72⁰С - 10 мин. Рестрикцию амплифицированного фрагмента проводили эндонуклеазой HaeIII.

Условия ПЦР гена CAST: предварительная денатурация при 95°C - 4 мин. и далее 35 циклов: 94°C - 45 с, 62°C - 45 с, 72°C - 45с; заключительный синтез при 72°C - 7 мин [15]. Рестрикцию амплифицированного фрагмента CAST длиной 622 bp проводили эндонуклеазой MspI.

Размер полученных рестрикционных фрагментов определяли методом электрофореза в агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Результаты исследований и их обсуждение

Для оценки качества работы известного протокола по генотипированию овец по гену дифференциального фактора роста (GDF9) нами были протестированы олигонуклеотидные праймеры:

5'- GAAGACTGGTATGGGGAAATG-3' и

5'- CCAATCTGCTCCTACACACCT-3' по усовершенствованной нами технике ПЦР-ПДРФ. ПЦР-ПДРФ анализ фрагмента гена GDF9-G1 длиной 462 н.п., проводили с использованием эндонуклеазы BstHNI (ООО «СибЭнзим-М»).

Праймеры инициируют амплификацию фрагмента гена GDF9 длиной 462 н.п., а ПДРФ- BstHNI профиль идентифицирует его генотипы (рис.1).

Для оценки качества работы протокола по генотипированию овец по гену гормона роста GH, нами были протестированы олигонуклеотидные праймеры: 5'-GGAGGCAGGAAGGGATGAA-3' и 5'- GGAGGCAGGAAGGGATGAA -3.

В результате проведения молекулярно-генетических исследования у овец были определены аллельные варианты гена GH (рис.2) и установлены генотипы, представленные фрагментами: 277-, 202-, 110-, 100-, 94-, 68-, 49-, 22-, 8- и 4 н.п. генотип AA; 256-, 202-, 110-, 100-, 94-, 68-, 49-, 22-, 21-, 8-

и 4н.п. генотип ВВ и 277-, 256-, 202-, 110-, 100-, 94-, 68-, 49-, 22-, 21-, 8- и 4 генотип АВ .

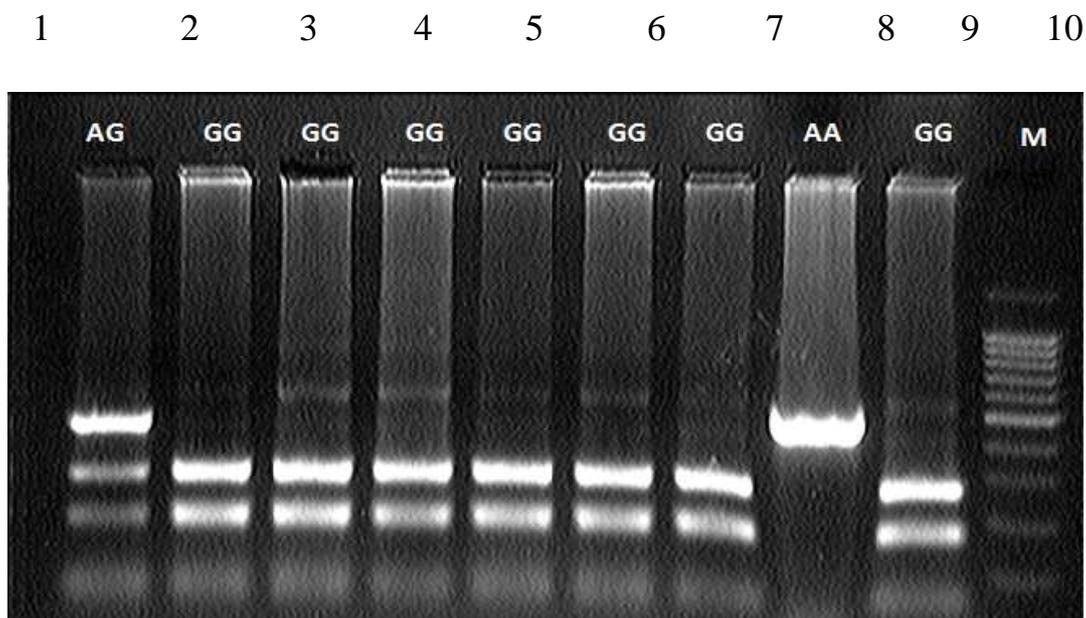


Рис. 1. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ гена GDF9 в 2% агарозном геле
 Обозначения: 10 - ДНК-маркеры 100 бр (СибЭнзим); 1 – генотип AG; 2,3,4 5,6,7,9 -
 генотип GG; 8 - генотип AA.

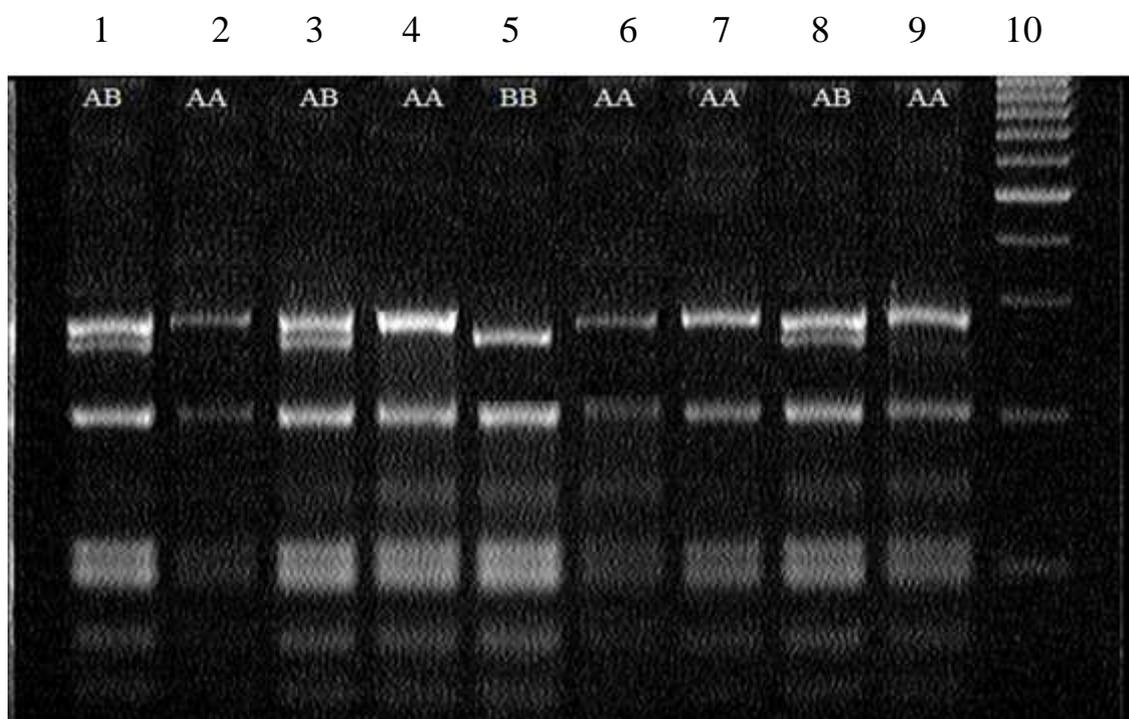


Рис.2. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ гена GN в 4% агарозном геле
 Обозначения: 10 - ДНК-маркеры 100 бр (СибЭнзим); 1,3,8 – генотип АВ; 2,4,6,7,9-
 генотип AA; 5 - генотип ВВ.

Праймеры инициируют амплификацию фрагмента гена GH длиной 934 н.п., а ПДРФ-*Hae*III профиль идентифицирует его генотипы (рис.3). Для оценки качества работы протокола по генотипированию овец по гену CAST нами были протестированы праймеры:

5'-TGGGGCCCAATGACGCCATCGATG-3' и

5'-GGTGGAGCAGCACTTCTGATCACCC-3'.

Праймеры инициируют амплификацию фрагмента гена CAST овец длиной 622 н.п., а ПДРФ- *Msp*I профиль идентифицирует его генотипы (рис.3).

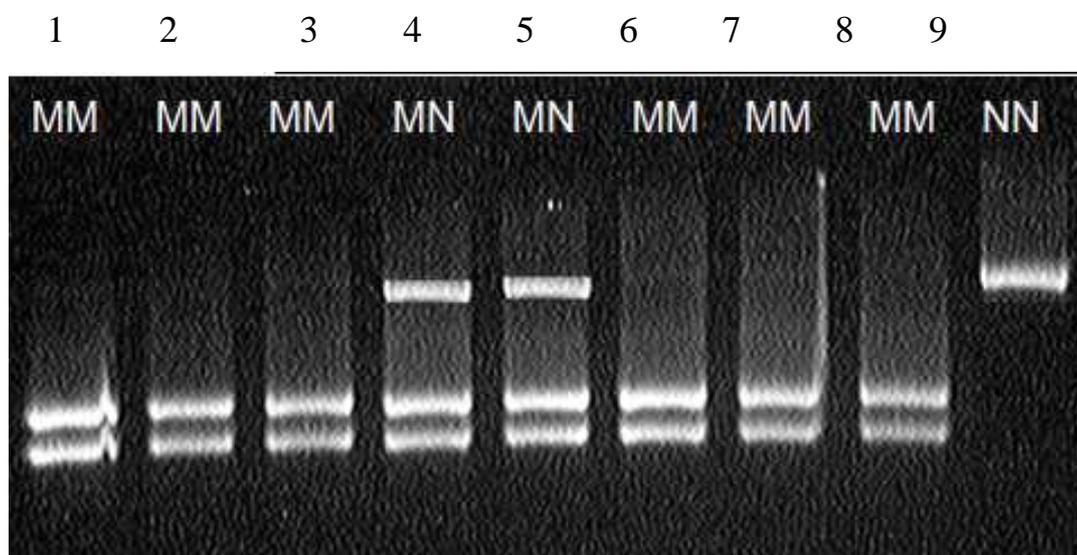


Рис. 3. Электрофореграмма результатов ПЦР-ПДРФ анализа гена *CAST* по *Msp*I у овец
Обозначения: 1,2,3,6,7,8 – генотип MM; 4,5- генотип MN; 9- генотип NN.

При наличии сайта рестрикции образуются два фрагмента длиной 336- и 286 bp, что соответствует аллелю M, при отсутствии сайта – длина фрагмента остается без изменения (622 bp).

Вывод

Проведение ПДРФ-анализа позволило идентифицировать генотипы и аллели генов *GDF9*, *GH* и *CAST* по соответствующим ПДРФ- *Bst*NI, *Hae*III, *Msp*I- профилям. Полученные результаты ПЦР-ПДРФ-анализа с праймерами являются удовлетворительными в плане

воспроизводительности и идентификации генотипов генов GDF9, GH и CAST овец.

Список литературы

1. Колосов Ю.А., Широкова Н.В. Мясные качества чистопородных и помесных баранчиков разного происхождения // Овцы, козы, шерстное дело.- 2012.- №3.- С 44-46.
2. Колосов Ю.А., Широкова Н.В. Некоторые продуктивные качества молодняка помесных овец // Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. – 2012.- Т.2.– №1.- С. 53-56.
3. Колосов Ю.А., Засемчук И.В., Дегтярь А.С., Широкова Н.В. Методическое пособие к лабораторно-практическим занятиям по курсу «ОВЦЕВОДСТВО И КОЗОВОДСТВО»// Министерство сельского хозяйства Российской Федерации Департамент научно-технологической политики и образования Донской государственный аграрный университет. п. Персиановский, 2011.
4. Колосов Ю.А., Засемчук И.В., Святогоров В.А. Использование генофонда ставропольской породы для совершенствования сальских овец//Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. 2012. Т. 2. № -1. С. 48-53.
5. Mihailov N.V., Getmantseva L.V., Bakoev S.U., Usatov A.V. Associations between PRLR/AluI gene polymorphism with reproductive, growth and meat traits in pigs. *Cytology and Genetics*. 2014. Т. 48. № 5. С. 323-326.
6. Леонова М.А., Гетманцева Л.В., Колосов А.Ю. Распределение частот аллелей и генотипов гена лейкемия ингибирующего фактора у свиней различных пород // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 2. С. 534.
7. Гетманцева Л.В. Влияние полиморфизма генов MC4R, IGF2 и POU1F1 на продуктивные качества свиней: Автореф. канд. с.-х. наук, п.Персиановский.- 2012.- 28 с.
8. Szkudlarek-Kowalczyk M., Wiśniewska E., Mroczkowski S. Polymorphisms of calpastatin gene in sheep. *Journal of Central European Agriculture*, 2011, 12(3), p.425-432 DOI: 10.5513/JCEA01/12.3.934
9. Sutiknoa, M. Yaminc , & C. Sumantric Association of Polymorphisms Calpastatin Gene with Body Weight of Local Sheep in Jonggol, Indonesia *Media Peternakan*, April 2011, hlm. 1-6 DOI: 10.5398/medpet.2011.34.1.1
10. Saleha Y. M. Alakilli Analysis of Polymorphism of Caplstatin and Callipyge Genes in Saudi Sheep Breeds Using PCR-RFLP Technique *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 30(1), January – February 2015; Article No. 60, Pages: 340-344
11. S. Georgieva, D. Hristova, I.Dimitrova, N. Stancheva, M. Bozhilova-Sakov Molecular analysis of ovine calpastatin (CAST)and myostatin (MSTN) genes in SyntheticPopulation Bulgarian Milk sheep using PCR-RFLP *J. BioSci. Biotechnol.* 2015, 4(1): 95-99.<http://www.jbb.uni-plovdiv.bg>
12. Onur YILMAZI, Tamer SEZENLER2 , Nezih ATA1 , Yalçın YAMAN2 , İbrahim CEMAL1 , Orhan KARACA Polymorphism of the ovine calpastatin gene in some Turkish sheep breeds *Turk J Vet Anim Sci* (2014) 38: 354-357 doi:10.3906/vet-1401-13
13. Kolosov Yu, Getmantseva L, Shirockova N/ Sheep Breeding Resources in Rostov Region // *World Applied Sciences Journal*. 2013. Т. 23. № 10.С. 1322-1324.

14. Karagodina N., Y. Kolosov, A. Usatov, S. Bakoev, A. Kolosov, M. Leonova, N. Shirokova, A. Svyatogorova and L. Getmantseva, 2014. Influence of Various Bio-Stimulants on the Biochemical and Hematological Parameters in Porcine Blood Plasma. World Applied Sciences Journal, 30 (6): 723-726.

References

1. Kolosov Ju.A., Shirokova N.V. Mjasnye kachestva chistopородnyh i pomesnyh baranchikov raznogo proishozhdenija // Ovcy, kozy, sherstnoe delo.- 2012.- №3.- S 44-46.

2. Kolosov Ju.A., Shirokova N.V. Nekotorye produktivnye kachestva molodnjaka pomesnyh ovec // Sbornik nauchnyh trudov Stavropol'skogo nauchno-issledovatel'skogo instituta zhivotnovodstva i kormoproizvodstva. – 2012.- T.2.– №1.- C. 53-56.

3. Kolosov Ju.A., Zasemchuk I.V., Degtjar' A.S., Shirokova N.V. Metodicheskoe posobie k laboratorno-prakticheskim zanjatijam po kursu «OVCEVODSTVO I KOZOVODSTVO»// Ministerstvo sel'skogo hozjajstva Rossijskoj Federacii Departament nauchno-tehnologicheskoy politiki i obrazovanija Donskoj gosudarstvennyj agarnyj universitet. p. Persianovskij, 2011.

4. Kolosov Ju.A., Zasemchuk I.V., Svyatogorov V.A. Ispol'zovanie genofonda stavropol'skoj porody dlja sovershenstvovaniya sal'skih ovec//Sbornik nauchnyh trudov Vserossijskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta ovcevodstva i kozovodstva. 2012. T. 2. № -1. S. 48-53.

5. Mihailov N.V., Getmantseva L.V., Bakoev S.U., Usatov A.V. Associations between PRLR/AluI gene polymorphism with reproductive, growth and meat traits in pigs. Cytology and Genetics. 2014. T. 48. № 5. S. 323-326.

6. Leonova M.A., Getmanceva L.V., Kolosov A.Ju. Raspredelenie chastot allelej i genotipov gena lejkemija ingibirujushhego faktora u svinej razlichnyh porod // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. 2015. № 2. S. 534.

7. Getmanceva L.V. Vlijanie polimorfizma genov MC4R, IGF2 i POU1F1 na produktivnye kachestva svinej: Avtoref. kand. s.-h. nauk, p.Persianovskij.- 2012.- 28 s.

8. Szkudlarek-Kowalczyk M., Wiśniewska E., Mroczkowski S. Polymorphisms of calpastatin gene in sheep. Journal of Central European Agriculture, 2011, 12(3), p.425-432 DOI: 10.5513/JCEA01/12.3.934

9. Sutiknoa, M. Yaminc , & C. Sumantric Association of Polymorphisms Calpastatin Gene with Body Weight of Local Sheep in Jonggol, Indonesia Media Peternakan, April 2011, hlm. 1-6 DOI: 10.5398/medpet.2011.34.1.1

10. Saleha Y. M. Alakilli Analysis of Polymorphism of Caplstatin and Callipyge Genes in Saudi Sheep Breeds Using PCR-RFLP Technique Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 30(1), January – February 2015; Article No. 60, Pages: 340-344

11. S. Georgieva, D. Hristova, I. Dimitrova, N. Stancheva, M. Bozhilova-Sakov Molecular analysis of ovine calpastatin (CAST) and myostatin (MSTN) genes in Synthetic Population Bulgarian Milk sheep using PCR-RFLP J. BioSci. Biotechnol. 2015, 4(1): 95-99. <http://www.jbb.uni-plovdiv.bg>

12. Onur YILMAZI, Tamer SEZENLER² , Nezih ATA¹ , Yalçın YAMAN² , İbrahim CEMAL¹ , Orhan KARACA Polymorphism of the ovine calpastatin gene in some Turkish sheep breeds Turk J Vet Anim Sci (2014) 38: 354-357 doi:10.3906/vet-1401-13

13. Kolosov Yu, Getmantseva L, Shirokova N/ Sheep Breeding Resources in Rostov Region // World Applied Sciences Journal. 2013. T. 23. № 10.S. 1322-1324.

14. Karagodina N., Y. Kolosov, A. Usatov, S. Bakoev, A. Kolosov, M. Leonova, N. Shirokova, A. Svyatogorova and L. Getmantseva, 2014. Influence of Various Bio-Stimulants on the Biochemical and Hematological Parameters in Porcine Blood Plasma. World Applied Sciences Journal, 30 (6): 723-726.