

8. *Groppa M.D., Benavides M.P.* Polyamines and abiotic stress: recent advances // *Amino Acids*.-2008.-34.- P. 35-45

Резюме

Проведен анализ стрессоустойчивости генетически модифицированных растений табака и картофеля, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы и характеризующихся повышенным содержанием пролина. Показано, что полученные растения характеризуются повышенной устойчивостью к засолению.

We studied the stress resistance of genetically modified (GM) tobacco and potato plants bearing an antisense suppressor of the gene for proline dehydrogenase. Such plants are characterized by elevated proline content. The transgenic plants were shown to have elevated salt tolerance.

КОПИЛОВ К.В., КОПИЛОВА К.В., КОВТУН С.І.

Институт розведення і генетики тварин УААН

*Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,
e-mail: kovtun_si@gala.net*

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ДНК-АНАЛІЗУ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ СТАТІ ТА ГЕНОТИПУВАННІ ДОІМПЛАНТАЦІЙНИХ ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Одним із основних завдань розвитку тваринництва України є впровадження у практику племінної справи сучасних методів ДНК-технологій з метою вдосконалення і підвищення ефективності селекційної роботи. Останні наукові розробки при дослідженні геному різних видів сільськогосподарських тварин на рівні ДНК, порівняно із класичними методами досліджень, дозволяють за більш короткий термін і на рівні носія спадкової інформації одержувати дані щодо особливостей генетичної структури, а також виявляти генетичні аномалії без застосування складного і дорогого методу генетичної експертизи за нащадками. Основу сучасних методів ДНК-аналізу складає використання маркерних систем поліморфних нуклеотидних послідовностей ДНК, що дозволяють тестувати генетичний поліморфізм безпосередньо на рівні генів.

Впровадження у практику сучасних методів ДНК-аналізу в Європейських країнах та США дає можливість отримати прибутки за рахунок скорочення часу генераційного інтервалу, раннього введення маточного поголів'я в процес відтворення та застосування різних молекулярно-генетичних маркерів, що дозволяють вести селекцію за допомогою маркерів (Marker Assisted Selection – MAS), тобто проводити підбір та добір батьківських пар певних генотипів та отримувати нащадків з відповідним генетичним потенціалом щодо основних показників продуктивності. У США, Німеччині селекція за В-алелем гена капа-казеїну включена до програм з відтворення великої рогатої худоби [1]. Крім цього, для підвищення ефективності ведення спеціалізованого скотарства вимагає впровадження економічно доцільних, сучасних методів ведення селекційної роботи одним з яких є визначення статі та генотипу доімплантаційних ембріонів [2, 3]. Цей метод дозволяє одержувати та відбирати ембріони, які мають племінну цінність та бажану стать і забезпечує можливість трансплантації декількох ембріонів одному реципієнту.

З метою розробки та впровадження швидкого методу визначення статі ембріонів великої рогатої худоби нами проведена робота з оптимізації умов ідентифікації статі доімплантаційних ембріонів із одночасним застосуванням Y-специфічних та X-специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції

(ПЛР) без наступного рестриктного аналізу фрагментів. Також виконані дослідження з генотипування ембріонів за генами продуктивності методом ПЛР-ПДРФ (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів) за геном капа – казеїну. З допомогою цього ДНК-аналізу скорочується процедура і спрощується інтерпретація одержаних результатів.

Матеріали і методи

Для відпрацювання методу визначення статі доімплантаційних ембріонів великої рогатої худоби та проведення ДНК-аналізу за геном продуктивності капа-казеїном було використано 12 штук 8-16-клітинних ембріонів, одержаних *in vitro*. Для цього дозрілі поза організмом яйцеклітини корів осіменяли *in vitro* вилученими із придатків сім'яників сперматозоїдами бугая і співкультивували гамети протягом 18 год. Потім сформовані поза організмом зиготи культивували *in vitro* в середовищі 199 на розчині Ерла (Sigma) з 10% фетальної сироватки крові корів 2 доби.

З метою перевірки відповідності отриманих результатів контролем були зразки ДНК тварин з відомою статтю (20 голів бугаїв та 20 голів корів).

ДНК ембріонів отримували шляхом перенесення їх в 0,5мл ПЛР-пробірки типу «Ependorf» з 3-5мкл деіонізованої води (Sigma). Зразки заморожували-розморожували 2-3 рази при -20°C для звільнення ДНК з бластомерів.

ДНК з периферійної крові великої рогатої худоби виділяли за допомогою системи «Сорб - Б» та за наступною методикою. Кров для досліджень брали з яремної вени тварин у пробірки з цитратом натрію. До 200 мкл цільної крові додавали 1 мл деіонізованої води і піддавали зразок заморожуванню-розморожуванню. Центрифугували протягом 5 хв. при 7 тис. об/хв. для осадження лейкоцитів. Повторювали процедуру до появи безбарвного осаду з додаванням 500 мкл розчину, що містить 25мМ ЕДТА, рН 8,0 і 75 мМ NaCl. Зразок інкубували 120 хв. при $+56^{\circ}\text{C}$. Для очищення ДНК від наявних у ній протеїнів і жирів суміш екстрагували в 500 мкл хлороформу і знову інкубували 30 хв. при кімнатній температурі. Після центрифугування (5 хв. при 14 тис. об/хв.) протеїни і жири осаджувалися в нижній фракції з хлороформом, а ДНК залишалася у верхній водяній фазі. В ДНК-розчин додавали такий же об'єм ізопропілового спирту. Зразок витримували від 30 до 180 хв. при -20°C , і центрифугували 15 хв. при 14 тис. об/хв. Після видалення рідкої фази ДНК-осад промивали 70 % розчином етанолу і очищену фракцію ДНК висушували при кімнатній температурі, а потім розчиняли в 50 мкл деіонізованої води. Концентрацію ДНК перевіряли за допомогою методу електрофорезу в 2% агарозному гелі.

Для тестування продуктів ампліфікації використовували 2% агарозні гелі з наступним їх фарбуванням в розчині бромістого етидію. Візуалізацію здійснювали на трансілюмінаторі в ультрофіолетовому світлі з наступним фотографуванням електрофореграм цифровою камерою. Диференціацію ампліконів за розмірами проводили за допомогою маркера молекулярної ваги DNA-Ladder 50bp («Fermentas»).

Результати і обговорення

В результаті проведених досліджень щодо відпрацювання та оптимізації кращого перебігу ампліфікації нами були підібрані оптимальні температурні та часові режими проведення ПЛР, а також склад реакційної суміші. Встановлено, що оптимальним є наступний склад реакційної суміші: 10-х ПЛР-буфер (100 мМ Tris HCL, рН- 8,8; 500 мМ KCl, 0,8% Nonidet P40); 25мМ MgCl_2 – 1,5мМ; 2мМ dNTP – 0,5 мМ кожного; Taq – полімераза (1,25U/50мкл). ДНК 50 – 100 нг/25 мкл. Суміш доводили до загального об'єму 25 мкл деіонізованою водою.

Підтверджено нами, що для ампліфікації найбільш ефективним є використання двох пар праймерів: одна – специфічна для Y-хромосоми великої рогатої худоби, яка була підібрана відповідно до Patent Cooperation Treaty No/WO 89/07154 [4], друга – видоспецифічна для великої рогатої худоби [5]. Умови ампліфікації пов'язані з температурою відпалу виявилася в результаті досліджень універсальними для перелічених праймерів і складала $+65^{\circ}\text{C}$.

Встановлено, що синтез фрагментів ДНК проходить за 35 циклів ампліфікації на термоциклері «Терцик» («ДНК – технологія», Москва): початкової денатурації – при +94°C, 5 хв.; відпал праймерів – +65°C, 45 сек.; синтез – +72°C, 45 сек.; денатурація – +94°C, 30 сек. Реакцію завершували етапом елонгації – +72°C, 5 хв.

Підібрані нами умови були перевірені на ДНК тварин відомої статі. Встановлено, що довжина специфічного для Y-хромосоми продукту ампліфікації у великої рогатої худоби складає 173 пар нуклеотидів (п.н.), а довжина X-специфічного фрагмента – 216 п.н. У корів спостерігався один амплікон розміром у 216 п.н., а у бугаїв два фрагмента розміром 173 п.н. та 216 п.н. (рис.1).

В результаті проведення ДНК-аналізу щодо відпрацювання методу визначення статі доїмплантаційних ембріонів великої рогатої худоби нами були одержані такі результати: з 12 досліджених ембріонів вісім мали по одному фрагменту розміром 216 п.н., що вказує на їх жіночу стать і чотири ембріона мали по 2-фрагмента розміром в 216 п.н. і 173 п.н., тобто чоловічої статі.

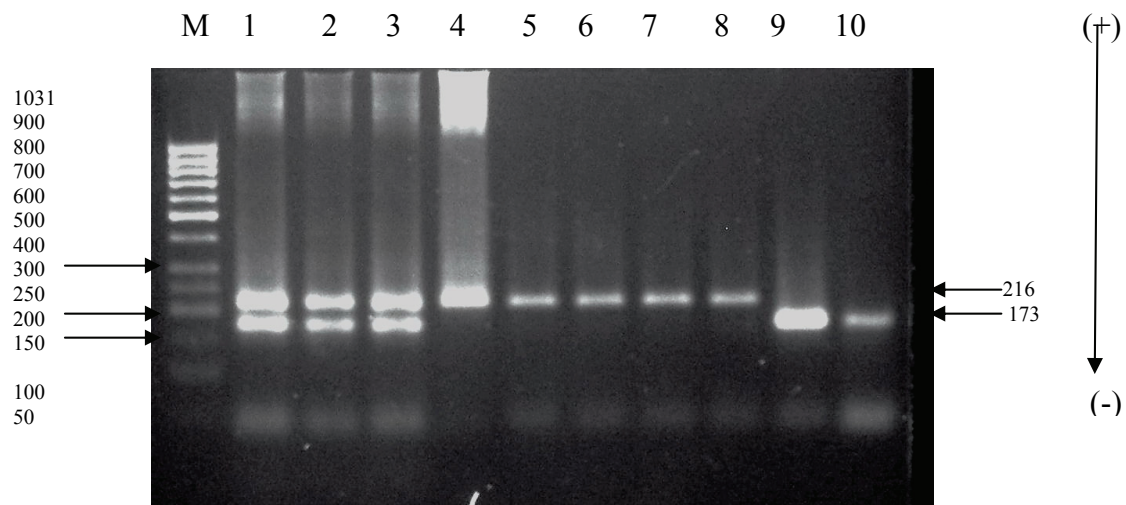


Рис.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації з X та Y специфічними праймерами Доріжки: Маркер молекулярної ваги DNA-Ladder 50bp; 1. Ембріон (бугай); 2. Ембріон (бугай); 3. Ембріон (бугай); 4. Ембріон (корова); 5. Ембріон (корова); 6. Ембріон (корова); 7. Ембріон (корова); 8. Ембріон (корова); 9. Бугай (Y); 10. Бугай (Y).

гену капа-казеїну методом ПЛР-ПДРФ. Ген капа-казеїну є маркером якості молока. Відомо, що А- і В-алелі гена капа-казеїна (CSN3), одного з основних білків молока, мають нерівнозначну господарську цінність. Наявність у молоці великої рогатої худоби В-алеля CSN3 дозволяє одержувати з такого молока високоякісні сири і як наслідок підвищувати рентабельність їх виробництва. В результаті проведення ДНК-аналізу нами були підібрані оптимальні умови перебігу ПЛР.

Для гену CSN3 були підібрані і штучно синтезовані наступні праймери і підібрана рестриктаза Hind III. Праймери: 5'GAAATCCCTACCATCAATACC-3'; 5'CCATCTACGCTAGTTTAGATG-3'. Умови ампліфікації: початкова денатурація +95°C – 2 хв., денатурація +95°C – 30 сек.; відпал праймерів +61°C – 30 сек; синтез +72°C – 1 хв.; кінцевий синтез +72°C – 5 хв.; 35 циклів ампліфікації.

Продукт ампліфікації гена CNS3 з вказаними в розділі матеріали та методи праймерами включав ділянку 4-го екзона і 4-го інтрона гена. Після рестрикції цього фрагмента рестриктазою Hind III виявляли два алельних варіанта А і В. У носіїв генотипу АА сайт рестрикції для цієї рестриктази відсутній і присутній нерестриційний продукт ампліфікації розміром 273 п.н. У тварин з генотипом ВВ після рестрикції виявляли два фрагменти довжиною 182 і 91 п.н (рис. 2). Варіант В гена CNS3 характеризується наявністю двох точкових мутацій, в положеннях 136 і

148, які призводять до амінокислотних замінів Туг на Пе і Ala на Asp. Генотип AA спостерігався у сімох досліджених ембріонів, а п'ять ембріонів мали генотип АВ.

Висновки

Застосований нами метод щодо визначення статі доімплантаційних ембріонів великої рогатої худоби дає можливість одночасно проводити ампліфікацію як X, так і Y – послідовностей хромосом, що скорочує час формування результатів, який складає в середньому 4 години. Впровадження сучасних генетико-біотехнологічних методів в тваринництві дає можливість одночасно проводити трансплантацію ембріонів з вже відомою статтю та визначеними генотипами, що може мати в перспективі суттєвий економічний ефект.

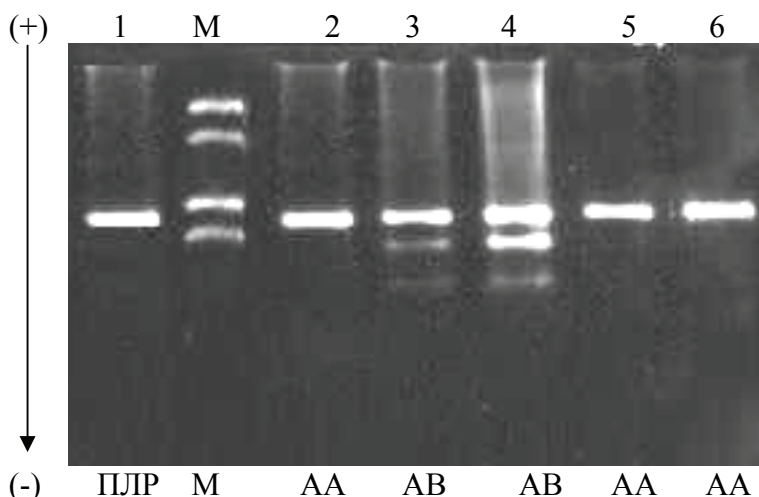


Рис.2. Спектри рестрикційних фрагментів гена капа-казеїна у ембріонів великої рогатої худоби, оброблених рестриктазою Hind III. Доріжки: 1 – продукт ПЛР без рестрикції (273 п.н.); М – маркер молекулярної ваги Ladder, Lov Range; 2, 5, 6 – гомозиготні тварини з генотипом AA; 3, 4 - гетерозиготні тварини з генотипом АВ.

Література

1. *Schaar J., Hansson B., Pettersson H.* Effects of genetic variants of κ -casein and beta-lactoglobulin on cheese-making // *J. Dairy Res.* - 1985. - V.52. - P. 429-437..
2. *Machaty Z., Paldi A., Csaki T., et al.* Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos // *Reproduction and Fertility.*- 1993.- №. 98 . – P.467-470.
3. *Зиновьева Н., Брем Г.* Определение пола предимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота путем аллель-специфической амплификации генов ZFX и ZFY // *Биотехнология.*- 1995.- №1-2.- С.50-53.
4. *Reed K.C., Mattheaei K.I., Mann D.A., Mattheews M.A.* Determination of genetic sex in ruminants using Y-chromosome specific polynucleotides.-1989.-Patent Cooperation Treaty No/WO 89/07154.
5. *Plucienniczak A, Skowronski J, Jaworski J.* Nucleotide sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences // *Mol.Biol.*-1982.-№158.-P.293-304.

Резюме

Представлены результаты по подбору условий и одновременной амплификации как X- так и Y-последовательностей хромосом методом полимеразной цепной реакции без последующего рестриктного анализа для определения пола доимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота и их генотипирования по гену каппа-казеина.

The results of selection conditions and the simultaneous amplification X and Y sequences of chromosomes are presented by using polymerase chain reaction, without following restriction analyze for sex determination bovine embryos and their kappa-casein locus genotyping.