

час проведення досліджень на тваринах дотримувалися «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухваленим Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Матеріалом для дослідження служила венозна кров, отримана з вушної вени свиноматок на 5 і 21 доби після опоросу. У свіжоотриманій крові тварин визначали чисельність еритроцитів і лейкоцитів та вміст гемоглобіну, а також активність ензимів пре амінування: аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АЛТ) за методиками, описаними у довіднику «Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині» [Влізло В.В. та ін., 2012].

У приміщеннях для утримання піддослідних тварин визначали температуру і відносну вологість повітря та концентрацію шкочинних газів у 5 точках по діагоналі приміщення на рівні розміщення тварин. Температуру та вологість повітря у приміщенні для утримання свиноматок вимірювали психрометром – гігрометром. Визначення рівня шкочинних газів (NO₂, H₂S, NH₃, CO₂ та CH₄) у повітрі приміщення здійснювали електрохімічним методом за допомогою переносного багатокомпонентного газоаналізатора ДЗОП – 5 СМ. Біометричну обробку результатів досліджень проводили з використанням пакету статистичних програм STATISTICA.

У результаті проведених досліджень встановлено що такі параметри мікроклімату як температура і вологість в приміщенні упродовж дослідного періоду не відповідали чинним нормативам. Зокрема температура повітря була вищою від норми на 35%, а відносна вологість – на 21,4%. Що стосується рівня шкочинних газів у приміщенні, то вони знаходилися у межах допустимих вітчизняних норм для утримання лактуючих свиноматок. За вказаних умов у крові свиноматок контрольної групи виявлено зменшення чисельності еритроцитів і лейкоцитів та вмісту гемоглобіну, а також зниження активності трансаміназ. При цьому введення до складу комбікорму свиноматок препарату Алкосель вірогідно підвищує вміст гемоглобіну починаючи з 5 до 21 доби після опоросу з 12,2 % до 14,4 % та кількості еритроцитів з 10,4 % до 12,6 % відносно контролю. Що стосується лейкоцитів у крові, то за аліментарного використання добавок Алкоселю у свиноматок на 5 добу після опоросу зменшується їх чисельність на 0,13 %, а до 21 доби – збільшується на 0,85 % відносно контролю. В процесі досліджень також встановлено, що застосування Алкоселю у комбікормі свиноматок зменшує у крові активність АЛТ з 35,1 % до 39,1 %, підвищуючи при цьому збільшується активність АСТ з 31,6 % до 36,7 % стосовно контролю.

Отримані дані в цілому свідчать про те, що підвищені стосовно нормативів параметри температури і відносної вологості повітря у приміщеннях для утримання лактуючих свиноматок виявляють негативний вплив на перебіг метаболічних процесів в організмі тварин, про що свідчать зміни у гематологічних показниках та активності трансаміназ крові, а введення до складу комбікорму тварин препарату Алкосель в означених дозах виявляє виражену позитивну корегуючу дію на вказані показники крові.

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ АЛЕЛЬ-СПЕЦИФІЧНОЇ ПЛР (AS-PCR) ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ АЛЕЛІВ А¹ ТА А² ГЕНА БЕТА-КАЗЕЇНУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Р.О. Кулібаба, М.І. Сахацький

Національний університет біоресурсів і природокористування України
romankx37@gmail.com

Вступ. Аналіз генетичної структури дослідних популяцій великої рогатої худоби відноситься до рутинних завдань генетики і маркер-асоційованої селекції у тваринництві. Однак, поряд з широко відомими локусами кількісних ознак, такими як каппа-казеїн,

пролактин, бета-лактоглобулін, лептин та іншими, які пов'язані з експресією продуктивних ознак тварин, за останні декілька років стійкий інтерес викликає ген бета-казеїну, алельні варіанти котрого пов'язані з параметрами якості молока.

До однієї з найбільш досліджених та перспективних, з точки зору прикладної генетики великої рогатої худоби, алельних систем відноситься A^1 та A^2 . У численних дослідженнях встановлено, що різні форми бета-казеїну асоційовані з низкою патологічних станів організму людини, що робить ген бета-казеїну (*CSN2*) актуальним об'єктом для досліджень, у першу чергу, у контексті молочної продуктивності корів різних порід. Алелі A^1 та A^2 відрізняються між собою за наявністю амінокислоти у позиції 67 білкової молекули бета-казеїну. У випадку з A^1 – це гістидин, у A^2 – пролін. Різні форми білка визначаються мутацією у гені *CSN2* – наявністю аденіну для алеля A^1 та цитозину для алеля A^2 . При цьому, заміна азотистих основ у ДНК не зачіпляє сайту рестрикції для будь-яких рестриктаз, що призводить до необхідності розробки альтернативних методів типування алелів локусу *CSN2*. До одного з найбільш актуальних та ефективних методичних підходів відноситься AS-PCR – алель-специфічна ПЛР, яка, незважаючи на всі переваги, має низку додаткових технічних складнощів, пов'язаних з особливостями проведення ампліфікації та аналізу результатів генотипування.

Мета дослідження – аналіз ефективності генотипування особин великої рогатої худоби за локусом бета-казеїну (алелі A^1 та A^2) за використання методу AS-PCR.

Методика. Дослідження проведені в лабораторії молекулярно-генетичних досліджень кафедри біології тварин НУБіП України. Для дослідження ефективності генотипування в якості модельного об'єкта використовували корів української чорно-рябої молочної породи. В якості основного використовували метод полімеразної ланцюгової реакції у варіанті алель-специфічної ПЛР. Дослідження проведено за використання комерційних наборів реактивів (Thermo Fisher Scientific). Для розрахунку температури відпалу праймерів використовували Tm Calculator (Thermo Fisher Scientific) на основі Allawi & Santa Lucia's thermodynamics method. Для проведення генотипування використовували дві системи AS-PCR – AS-PCR 244 bp (Ganguly et al.) та AS-PCR 854 bp (Keating et al.). Методи класифіковано за значенням розміру ампліконів. Оптимізацію протоколів ампліфікації проводили відповідно наступних схем: варіювання значень температури відпалу праймерів (від 55 °C до 68 °C з кроком в 1 °C); варіювання кількості проміжних стадій другого етапу ПЛР (від двох до десяти з кроком в одну стадію); тривалість проміжних стадій другого етапу ПЛР (від 15 до 120 секунд з кроком в 15 с.); протокол Touchdown PCR (Korbie & Mattick). Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили за використання бромистого етидію (інтеркалюючий барвник). Розділення продуктів ампліфікації проводили за використання агарозних гелів різних концентрацій.

Результати та їх інтерпретація. З метою проведення оптимізації протоколів ампліфікації для аналізу використовували тільки гомозиготних за алелем A^2 особин (A^2A^2), генотип яких був визначений раніше за використання методу ACRS-PCR (Ddel) (McLachlan). За результатами досліджень з'ясовано, що використання різних програм ампліфікації призводить до суттєвих варіацій ефективності ПЛР. Так, зниження температури відпалу нижче за мінімальну, що була теоретично розрахована для відповідних пар праймерів, призводить до зменшення специфічності методу – тобто до ампліфікації протилежного алелю. При цьому, максимальне зниження температури призводить, фактично, до збігу інтенсивності забарвлення ампліфікованих фрагментів алелів A^1 і A^2 . У свою чергу, використання методу touchdown PCR призводить до ампліфікації всіх можливих варіантів алелів у кожній з проб, що є причиною їх невірної інтерпретації в якості гетерозиготних особин A^1A^2 .

Використання оптимальних значень температури відпалу, а також кількості циклів, дало змогу вкрай знизити концентрацію невикористаних праймерів, тобто максимально підвищити ККД реакції, за умови зберігання високої специфічності, а також за повної відсутності неспецифічних продуктів ПЛР. За результатами досліджень був розроблений

найбільш ефективний протокол, використання якого забезпечує отримання максимально «чистої» електрофореграми.

Однак, незважаючи на оптимізацію загальних протоколів, у деяких пробах може бути виявлено наявність фрагменту, який є характерним для іншого алелю, що, імовірно, виникає за результатом збігу температур відпалу алель-специфічних праймерів (для кожного окремого алелю відповідно), а також цілої низки додаткових потенційних факторів – відмінностей у значеннях вихідної концентрації ДНК, типу ферменту, який використовується, концентрації праймерів. У наших дослідженнях ми використовували концентрацію праймерів 0.2 мкМ, що дало змогу отримати максимально можливу ефективність та специфічність ампліфікації. У цілому, за використання методу алель-специфічної ПЛР, залишається актуальною можливість ампліфікації неспецифічного алелю у достатньо широких межах. За умови недостатньої, у порівнянні з другим фрагментом, інтенсивності флуоресценції, можна зробити висновок стосовно ампліфікації саме неспецифічного алелю. В ідеальній системі, за умови максимально можливого ККД ампліфікації, інтенсивність забарвлення різних фрагментів (A^1 та A^2), у випадку з гетерозиготними зразками, буде однаковою, так як обидві варіанти представлені в еквівалентній кількості у вихідній ДНК. За умови недостатньої інтенсивності флуоресценції одного зі специфічних фрагментів можна зробити два припущення: неспецифічна ампліфікація або наявність інгібіторів у окремому зразку. У такому випадку необхідно використовувати алгоритм спрямованого тестування «проблемних» зразків на основі альтернативного методу (ACRS-PCR), що, на жаль, дуже часто ігнорується різними дослідниками. Також, додатково до всього вищезазначеного, доцільно періодично проводити «сліпе тестування» проб з вибірки на основі альтернативного методу.

Таким чином, з урахуванням всіх вищенаведених методичних підходів, використання оптимізованого протоколу ПЛР дає змогу успішно генотипувати представників виду *Bos Taurus* за алелями A^1 та A^2 .

Результати типування особин повністю підтверджено методом ACRS-PCR (DdeI).

Використання вищезазначених методичних підходів дало змогу отримати збіжні результати й за використання методу AS-PCR 856 bp. У цьому випадку, методи алель-специфічної ПЛР відрізняються за нуклеотидною послідовністю використаних праймерів та розміром амплікону (244 пн проти 854 пн). Оптимальні результати, які дають можливість несуперечливої ідентифікації алелів бета-казеїну, також були отримані за використання двохстадійного алгоритму ПЛР. При цьому значення температур відпалу праймерів істотно відрізнялися від запропонованих в інших наукових роботах.

Таким чином, результати досліджень на пряму вказують на необхідність ретельного підбору параметрів ампліфікації за використання методу алель-специфічної ПЛР для генотипування особин великої рогатої худоби за локусом бета-казеїну. Ідентичність результатів типування для двох праймерних систем для AS-PCR вказує на спільність методичних підходів у розв'язанні завдання з підвищення специфічності, відтворюваності та ефективності ампліфікації алелів A^1 і A^2 . Отримані результати можна використовувати для проведення масштабних рутинних генотипувань особин у популяціях різних порід великої рогатої худоби за алельними варіантами локусу бета-казеїну згідно завдань програм маркер-асоційованої селекції (MAS).