

УДК636.2.082.2

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМОРФИЗМА ИЗУЧЕННЫХ STR-ЛОКУСОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ

Н.А. Глинская, Л.А. Танана, О.А. Епишко

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 16.08.2013 г.)

Аннотация. Проведен генетико-популяционный анализ крупного рогатого скота по 11 микросателлитным локусам нуклеотидных последовательностей ДНК: BM1824, BM 2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53, рассчитана величина информативной ценности использованных маркеров (PIC).

Summary. The genetic and population analysis of the cattle according to 11 microsatellite loci of the nucleotide sequences of DNA: BM1824, BM 2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53 has been carried out, the value of informative value of used markers (PIC) has been calculated

Введение. Успешность решения задач общей и частной популяционной генетики многих видов, в том числе и сельскохозяйственных, зависит от изученности особенностей полиморфизма различных элементов геномов. В последнее время микросателлитные последовательности ДНК (STR-локусы) широко используются для генотипирования особей, исследования генофондов растений и животных, описания их изменений под влиянием факторов естественного и искусственного отборов, установления происхождения, поисков связей с фенотипическими признаками, картирования главных генов количественных признаков. Работы с использованием STR-локусов внесли определенный вклад в развитие новых направлений и нового взгляда на организацию генома как целого [1, 2, 5, 7, 9].

Геномика в наномасштабе, или геномное сканирование, – метод одновременного генотипирования внутри одного генома от десятков или пары сотен маркеров до истинного геномного сканирования путем полного секвенирования геномов. К настоящему времени геномы ряда сельскохозяйственных видов полностью секвенированы, широко используются оценки полиморфизмов по сотням тысячам мононуклеотидных замен (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) в целях картирования главных генов количественных признаков, полиморфизм которых можно использовать для прогноза желательного проявления хозяйственно ценных признаков. В то же время оказалось, что эффектив-

ность прямого включения результатов генотипирования нескольких десятков тысяч SNP в селекционные программы (genomic breeding values - GEBV) не очень высока и варьирует в зависимости от породной принадлежности и эколого-географических условий разведения животных. Поскольку у крупного рогатого скота были выявлены множественные сегментные дубликации, которые, предположительно, связаны с эффектами искусственного отбора, выполняются геномные сканирования по полиморфизму изменчивости числа копий нуклеотидных последовательностей длиной от 100 до 1000 пар нуклеотидов (п.н.) в геномах крупного рогатого скота [11, 13].

Альтернативным направлением геномного сканирования может быть использование оценок полиморфизма длин фрагментов ДНК, фланкированных короткими инвертированными повторами, поскольку, как правило, изменчивость по копиям нуклеотидных последовательностей ассоциирована с их наличием [10]. Применение микросателлитных последовательностей в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР) для геномного сканирования получило название ISSR-PCR (Inter-Simple Sequence Repeat - Polymerase Chain Reaction). Со времен появления метода [15] эти маркеры нашли широкое применение в популяционно-генетических исследованиях различных объектов, от растений и животных, различных инфекционных агентов до оценок нестабильности генетического аппарата при онкологических патологиях [3, 8]. Поэтому целью нашей работы послужило изучение полиморфизма 11 STR-локусов крупного рогатого скота черно-пестрой породы.

Материалы и методика исследований. На базе УО «Полесский государственный университет» в научно-исследовательской лаборатории промышленной биотехнологии проведено генетическое тестирование по 11 STR-локусам нуклеотидных последовательностей ДНК: BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, TGLA53 (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика микросателлитных локусов, рекомендованных ISAG для проведения достоверности происхождения крупного рогатого скота.

| Локус | Длины фрагментов, (bp) | Метка праймера, Дие | Цвет |
|---------|------------------------|---------------------|---------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| TGLA227 | 64–115 | FAM | Синий |
| BM2113 | 116–146 | FAM | Синий |
| TGLA53 | 147–197 | FAM | Синий |
| ETH10 | 198–234 | FAM | Синий |
| SPS115 | 235–265 | FAM | Синий |
| TGLA126 | 104–131 | JOE | Зеленый |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------|---------|-----|---------|
| TGLA122 | 134–193 | JOE | Зеленый |
| INRA23 | 193–235 | JOE | Зеленый |
| ETH3 | 90–135 | NED | Желтый |
| ETH225 | 136–165 | NED | Желтый |
| BM1824 | 170–218 | NED | Желтый |

В качестве объекта исследований использовали крупный рогатый скот черно-пестрой породы, разводимый в хозяйствах: КСУП «ПЗ «Красная звезда», СПК «Агрокомбинат Снов», ОАО «1-я Минская птицефабрика», СПК «Першаи-2003», РСУП «Брестплемпредприятие», РСУП «Шикотовичи», ПЗ «Муховец», ОАО «Птицефабрика «Дружба», РУСП «Минское племпредприятие».

Геномную ДНК выделяли из ткани животных перхлоратным методом, концентрацию которой измеряли на спектрофотометре «NanoDrop 1000».

Реакционная смесь для проведения мультиплексной реакции готовилась в объеме 15 мкл и включала следующие компоненты: ПЦР буфер – 1,5 мкл; $MgCl_2$ (25 mM) – 1,8 мкл; dNTP mix (10-12 mM) – 1,5 мкл; праймеры (mix) – 3 мкл; Таq-полимераза – 1 ед; ДНК 1 мкл (конц. 100 – 200 нг/мкл); вода (дистиллированная) – до 15 мкл.

Для проведения амплификации использовались меченные праймеры. В качестве меток использовались FAM, JOE и NED метки, флуорисцирующие синим, зеленым и желтым цветами соответственно.

Полимеразная цепная реакция была проведена на амплификаторе *TProfessional basic*. Режим амплификации состоял из следующих шагов: «горячий старт» – 3 мин при 95°C; 97°C – 20 сек; 32 цикла: денатурация – 30 сек при 95°C, отжиг – 65°C – 1 сек и 59°C – 1 мин 15 сек; синтез 30 сек при 68°C; достройка 30 сек – 70°C и охлаждение 4°C.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали в 1,5% агарозном геле (при напряжении 130 В в течение 20 минут).

Визуализацию и анализ результатов осуществляли на трансиллюминаторе Quantum.

Перед постановкой в секвенатор образцы помещали в амплификатор на денатурацию в смеси объемом 15 мкл, включающую: 1,2 мкл амплификата, 0,5 мкл LIZ-500 size standart и 13,3 мкл формамида.

Денатурацию проводили в течение 5 мин при 95°C с последующим охлаждением при 4°C. Затем производили непосредственную загрузку образцов в секвенатор «ABI Prism 3130», руководствуясь протоколом.

Определение длин выявленных генотипов ДНК в исследуемых локусах проводили при помощи программы GeneMapper Software Version 4.0.

Популяционно-генетические характеристики были рассчитаны по следующим формулам:

$$A_e = 1/C_a \quad (1)$$

где: A_e – уровень полиморфности (показатель числа действующих эффективных аллелей), C_a – коэффициент гомозиготности (формула Робертсона).

$$C_a = \sum p_i^2 \quad (2)$$

где: C_a – ожидаемая гомозиготность, p_i – частоты аллелей в локусе (формула Робертсона).

(3)

где: p_i – частота аллеля; p – разность между общим количеством исследованных в популяции особей и количеством носителей данного аллеля; n – общее количество обследованных животных [6].

$$H_o = \frac{h_j}{n} \quad (4)$$

где: H_o – наблюдаемая гетерозиготность по одному локусу; h_j – количество гетерозиготных генотипов в локусе; n – общее количество генотипов в локусе [12].

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2 \quad (5)$$

где: H_e – ожидаемая гетерозиготность по одному локусу; p_i – частота i -го аллеля [12].

$$F_{is} = (H_e - H_o)/H_e \quad (6)$$

где: F_{is} – индекс фиксации Райта, H_e – ожидаемая гетерозиготность, H_o – наблюдаемая гетерозиготность [14].

$$PIC = 1 - \sum p^2 - \sum \sum p^2 p^2 \quad (7)$$

где PIC – полиморфное информационное содержание локуса; p – частота аллеля [4].

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе анализа аллелофонда исследованных популяций КРС черно-пестрой породы ($n=518$) по 11 STR-локусам были получены данные, характеризующие полиморфизм каждого из маркеров (таблица 2).

Средний показатель уровня полиморфности, рассчитанный на один локус для всей исследованной выборки, составил 16,144. Исходя из этого, локусы были разделены на две группы. Первую группу составили локусы, имеющие значение уровня полиморфности ниже средне-

го – BM1824, BM2113, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126. Во вторую группу входили локусы, для которых значение уровня полиморфности превышает средние показатели: ETH10, TGLA227, TGLA53.

Таблица 2 – Характеристика полиморфизма изученных STR-локусов

| STR-локус | NV | Ae | He | Ho | Fis | PIС |
|----------------|---------------|---------------|--------------|--------------|----------|--------------|
| BM1824 | 9,889 | 8,795 | 0,886 | 0,875 | 0,012 | 0,873 |
| BM2113 | 14,667 | 14,818 | 0,933 | 0,918 | 0,016 | 0,928 |
| ETH10 | 12,556 | 32,496 | 0,969 | 0,897 | 0,074 | 0,968 |
| ETH225 | 12,222 | 11,146 | 0,910 | 0,911 | -0,001 | 0,902 |
| ETH3 | 10,000 | 6,549 | 0,847 | 0,900 | -0,063 | 0,824 |
| INRA023 | 3,889 | 13,129 | 0,924 | 0,901 | 0,025 | 0,918 |
| SPS115 | 11,444 | 7,556 | 0,868 | 0,875 | -0,008 | 0,850 |
| TGLA122 | 16,333 | 12,381 | 0,919 | 0,947 | -0,030 | 0,913 |
| TGLA126 | 9,444 | 7,670 | 0,870 | 0,876 | -0,007 | 0,853 |
| TGLA227 | 16,222 | 19,295 | 0,948 | 0,971 | -0,024 | 0,945 |
| TGLA53 | 12,778 | 43,744 | 0,977 | 0,902 | 0,077 | 0,977 |
| среднее | 12,677 | 16,144 | 0,914 | 0,907 | - | 0,905 |

Учитывая, что уровень полиморфности, по сути, является показателем эффективно действующих в популяции аллелей, эта величина коррелирует с числом аллелей, выявленных в каждом из исследованных локусов.

Каждый из изученных локусов характеризовался специфическим распределением частот. Было выявлено три основных типа распределений, представленных на рисунках 1, 2 и 3. Большинство STR-локусов характеризуется полимодальным распределением частот, к ним относятся: BM1824, BM 2113, ETH225, ETH3, TGLA227, TGLA53 (рис 1). Бимодальным распределением характеризуется только локус ETH10 (рис 2). Остальные четыре локуса – INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126 – характеризуются унимодальным распределением частот (рис. 3).

В отношении значений ожидаемого уровня гетерозиготности максимумом характеризовался локус TGLA53 (0,977), а минимальное значение отмечено в локусе ETH3 (0,847). Анализ данных показал, что среди 11 изученных STR-локусов только два – ETH225 и TGLA126 – отличаются близким к равновесному распределением. Локусы BM1824, BM2113, ETH10, INRA023 и TGLA53 отличаются смещением равновесия в сторону недостатка гетерозигот. Во всех остальных случаях наблюдалась различная степень преобладания показателей наблюдаемой гетерозиготности над ожидаемой, максимальная в локусе ETH3.

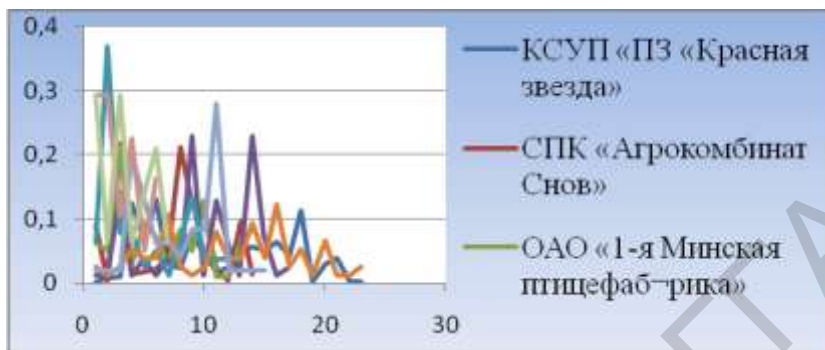


Рисунок 1 – полимодальное распределение частот в STR-локусах у КРС изученных популяций

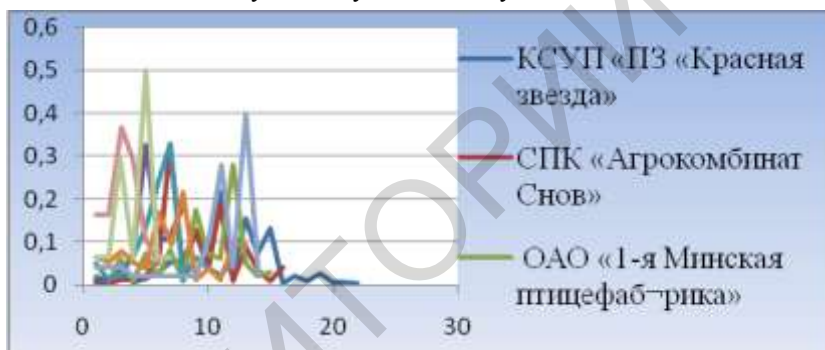


Рисунок 2 – бимодальное распределение частот в STR-локусах у КРС изученных популяций

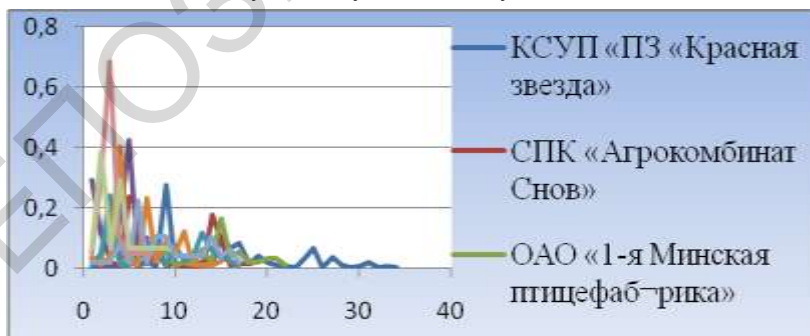


Рисунок 3 – унимодальное распределение частот в STR-локусах у КРС изученных популяций

Кроме того нами была рассчитана величина информативной ценности использованных маркеров (PIC). Чем больше величина PIC для данного локуса, тем информативнее оказывается он в качестве маркера. Принято следующее разделение величин PIC: при $PIC > 0,5$ локус очень информативен, при $0,5 > PIC > 0,25$ достаточно информативен и при $PIC < 0,25$ слегка информативен. В проведенных нами исследованиях было установлено, что все изученные STR-локусы имели $PIC > 0,5$.

Заключение. Таким образом, обнаруженные особенности STR-полиморфизма крупного рогатого скота черно-пестрой породы, разводимого в Беларуси, позволяет более эффективно использовать отдельные локусы для различных целей генетико-популяционных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багиров, В.А., Насибов, Ш.Н., Кленовицкий, П.М. и др. Сохранение и рациональное использование генофонда животных // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2009. № 2. С. 37-40
2. Зиновьева, Н.А., Гладырь, Е.А. Генетическая экспертиза сельскохозяйственных животных: применение тест-систем на основе микросателлитов // Достижения науки и техники АПК. 2011. № 9. С. 19-20.
3. Зиновьева, Н. А. Оценка роли ДНК-микросателлитов в генетической характеристике популяции черно-пестрого скота / Н. А. Зиновьева, Н. И. Стрекозов, Л. А. Молофеева // Зоотехния. – 2009. - № 1. – С. 2–4.
4. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях // Научно-методическое руководство / под ред. Сиволопа Ю.М. – Киев, Агрона наука, 1998. – 156 с
5. Калашникова, Л.А. Геномная оценка молочного скота // Молочное и мясное скотоводство. 2010. № 1. С. 10-12.
6. Меркурьева, Е. К. Генетические основы селекции в скотоводстве – Москва «Колос» – 1977. 174.
7. Харченко, П.Н., Глазко, В.И. ДНК-технологии в развитии агробиологии. М.: Воскресенье, 2006. 480 с.
8. Храброва, Л.А., Зайцева, М.А., Калинин, Л.В. Генетическая дифференциация чистокровных пород лошадей по микросателлитным локусам // Сельскохозяйственная биология. Серия: Биология растений. Серия: Биология животных. 2008. № 2. С. 31-34.
9. Эрнст, Л.К. Роль биологии в развитии животноводства в XXI веке // Достижения науки и техники АПК. 2008. № 10. С. 7-8.
10. Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M. et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269, 496-512.
11. Flori L., Fritz, S., Jaffrezic, F. et al. The Genome Response to Artificial Selection: A Case Study in Dairy Cattle // PLoS ONE. 2009. Vol. 4, No.8. e6595.
12. Guo, S. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles / S. Guo, E. Thomson // Biometrics. – 1992. – Vol. 48 – P. 361–372.
13. Seroussi, E., Glick, G., Shirak, A. et al. Analysis of copy loss and gain variations in Holstein cattle autosomes using BeadChip SNPs // BMC Genomics. 2010. Vol. 11. P. 673-701.
14. Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating / S. Wright // Evolution. – 1965. – Vol. 19. – P. 355-420.
15. Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.