

УДК 577.21:599.735.51:636.2.082.2

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА STR–МАРКИРОВАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ УСТАНОВЛЕНИИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПОТОМКОВ

*Н.А. ГЛИНСКАЯ<sup>1</sup>, Л.А. ТАНАНА<sup>2</sup>, О.А. ЕПИШКО<sup>2</sup>, Д.А. КАСПИРОВИЧ<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Полесский государственный университет,

г. Пинск, Республика Беларусь, [nil\\_pb@mail.ru](mailto:nil_pb@mail.ru)

<sup>2</sup>Гродненский государственный аграрный университет,

г. Гродно, Республика Беларусь, [dnateh@mail.ru](mailto:dnateh@mail.ru)

**Введение.** Важнейшим фактором повышения эффективности племенной работы в животноводстве являются оценка генетической ценности племенных животных и контроль достоверности их происхождения.

Ранее в мировом животноводстве, в том числе и Республике Беларусь, для оценки достоверности происхождения животных использовали иммуногенетические маркеры, однако с достижениями молекулярной биологии в качестве альтернативы серологическим методам разработан метод анализа ДНК по STR–локусам, являющийся более информативным, который предложен как основной для установления происхождения сельскохозяйственных животных [2, 3].

Следует отметить, что патентная технология требует закупки дорогостоящего импортного оборудования и полного комплекта реагентов для проведения генетической экспертизы. Учитывая уровень финансирования племенного животноводства в Беларуси, тестирование племенных животных в этом случае может быть лишь выборочным. Поэтому выходом из сложившейся ситуации является разработка отечественной технологии оценки достоверности происхождения животных по STR–локусам, позволяющая снизить затраты на генотипирование в 2,4 раза.

**Методика и объекты исследования.** Исследования проведены в УО «Гродненский государственный аграрный университет», а также УО «Полесский государственный университет» в научно–исследовательской лаборатории промышленной биотехнологии.

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 «Мухавец», 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<sub>2</sub> (25 mM) – 1,8 мкл; dNTPmix (10–12 mM) – 1,5 мкл; праймеры (3 mix) – 55,28mM; праймеры (8 mix) – 64,45mM; Taq–полимераза – 1 ед; ДНК 1 мкл (конц. 30–200 нг/мкл); вода (дистиллированная) – до 15 мкл.

Полимеразная цепная реакция была проведена на амплификаторе *TProfessional Basic*. Режим амплификации состоял из следующих шагов: «горячий старт» – 3 мин при 95<sup>0</sup>С; 97<sup>0</sup>С – 20 сек; 32 цикла: денатурация – 30 сек при 95<sup>0</sup>С, отжиг – 65<sup>0</sup>С – 1 сек и 59<sup>0</sup>С – 1 мин 15 сек; синтез 30 сек при 68<sup>0</sup>С; достройка 30 сек – 70<sup>0</sup>С и охлаждение 4<sup>0</sup>С.

Определение длин выявленных фрагментов ДНК в исследуемых локусах проводили при помощи программы GeneMapperSoftwareVersion 4.0.

**Результаты и их обсуждение.** Разработана система установления происхождения потомков крупного рогатого скота белорусской черно–пестрой породы по STR–локусам с использованием отечественных реактивов. Для достижения поставленной цели была подобрана панель информативных полиморфных локусов для тестирования крупного рогатого скота, стандартизированы протоколы и панели маркеров для возможности сравнения результатов, полученных в различных лабораториях и странах. Также были подобраны оптимальные параметры проведения мультиплексной полимеразной цепной реакции и фрагментного анализа для выявления STR–локусов.

С учетом рекомендаций ISAG [5], нами отобрано 11 локусов (таблица 1), обладающих достаточной информативностью, приводимых для анализа ДНК крупного рогатого скота в наибольшем числе публикаций. Для этих локусов имеются сведения об их хромосомной локализации, числе выявленных аллелей и размерах тандемов, а также сведения о праймерах, используемых для де-

текции конкретного локуса. Выбор структуры праймеров в значительной мере определяет возможность реализации мультиплексных вариантов ПЦР и представляет собой значительно более сложную задачу, чем аналогичная работа в варианте моноплексной тест-системы [4].

Сложность подбора праймеров состоит в том, что при мультиплексировании весь набор праймеров (в случае двухплекса – 4 праймера) должен отжигаться на матрице при одних и тех же температурных условиях и при этом не взаимодействовать друг с другом [1].

Таблица 1 – Характеристика STR-локусов, отобранных для установления происхождения крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы

Локус	Длина фрагментов, п.н.	Метка праймера, Dye	Цвет
TGLA227	64–115	6-FAM <sup>TM</sup>	Синий
BM2113	116–146	6-FAM <sup>TM</sup>	Синий
TGLA53	147–197	6-FAM <sup>TM</sup>	Синий
ETH10	198–234	6-FAM <sup>TM</sup>	Синий
SPS115	235–265	6-FAM <sup>TM</sup>	Синий
TGLA126	104–131	JOE <sup>TM</sup>	Зеленый
TGLA122	134–193	JOE <sup>TM</sup>	Зеленый
INRA23	193–235	JOE <sup>TM</sup>	Зеленый
ETH3	90–135	NED <sup>TM</sup>	Желтый
ETH225	136–165	NED <sup>TM</sup>	Желтый
BM1824	170–218	NED <sup>TM</sup>	Желтый

Для пригодности использования праймеров в мультиплексных комбинациях подбирались их длина, нуклеотидный состав, а также параметры отжига (температура плавления продукта) таким образом, чтобы максимально исключить образование димеров праймеров или «шпилькоподобных» структур (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика праймеров, используемых при проведении оценки достоверности происхождения крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы

Локус	Структура праймера (5'→3')	Оптимальная (максимальная) температура отжига, °C
BM1824 (F) BM1824 (R)	gagcaaggtgttttccaatc cattctccaactgcttccttg	51,1 (70,0)
BM2113 (F) BM2113 (R)	gctgcctctacaaataccc cttcctgagagaagcaacacc	54,6 (70,5)
ETH10 (F) ETH10 (R)	gttcaggactggccctgctaaca cctccagcccactttctcttc	58,7 (72,0)
ETH225 (F) ETH225 (R)	gatcaccttgccactatttctc acatgacagccagctgctact	53,6 (70,9)
INRA023 (F) INRA023 (R)	gagtagagctacaagataaactc taactacaggggttagatgaactc	50,0 (62,0)
SPS115 (F) SPS115 (R)	aaagtgcacacaacagcttccag aacgagtgtcctagtgttgctgtg	52,6 (72,0)
TGLA122 (F) TGLA122 (R)	ccctcctccaggtaaatcagc aatcacatggcaataagtacatac	48,4 (68,0)
TGLA126 (F) TGLA126 (R)	ctaattagaatgagagagcttct ttggctctattctctgaatattcc	52,7 (67,0)
ETH3 (F) ETH3 (R)	gaacctgcctctcctgattgg actctgcctgtggccaagtagg	57,5 (72,0)
TGLA227 (F) TGLA227 (R)	cgaattccaatctgttaattgct acagacagaaactcaatgaaagca	51,0 (71,0)
TGLA53(F) TGLA53 (R)	gctttcagaaatagttgcattca atcttcacatgatattacagcaga	47,8 (67,0)

При образовании праймер–димеров компоненты реакции перестают синтезировать нужный продукт, все это приводит к снижению эффективности и чувствительности анализа.

Способность последовательностей праймеров образовывать дуплексы проанализировали с помощью программного обеспечения для конструирования праймеров Oligo 5.0 Primer Design Software.

В наших исследованиях в локусах BM1824, ETH3, SPS115, TGLA126 и TGLA227 происходит образование 3'-димеров между праймерами. Но для исключения сильных димеров на 3'-конце выбраны праймеры с остатками 1G или C в последних 3 основаниях (BM1824, ETH3, SPS115, TGLA126) и с A или T на 3'-конце (TGLA227).

При правильном выборе структуры праймеров полимеразная цепная реакция осуществляется в стандартных условиях. На практике, чтобы мультиплексный ПЦР–анализ, в ходе которого за одну реакцию проводится исследование более чем одной мишени, был успешным, часто требуется дополнительная оптимизация процесса. Учитывая, что G/C–богатые последовательности способны ренатурировать после тепловой денатурации при +95°C до достижения температуры отжига праймеров, мы использовали прием «hot–start» (предварительная денатурация матрицы).

При слишком большом числе циклов возможно истощение среды реакции по праймерам, нуклеотидам и полимеразе, что приводит к накоплению неспецифических продуктов, поэтому в ПЦР программу включили 32 цикла. Увеличение или уменьшение числа циклов не приводило к заметному улучшению результатов ПЦР. Время денатурации сильно зависит от типа используемых пробирок. Мы использовали тонкостенные пробирки объемом 0,2 мл, поэтому достаточно 30 сек при 95°C.

Была выбрана температура элонгации ( $T_e$ )  $T_e = 68^\circ\text{C}$ . Широко распространено использование  $T_e = 72^\circ\text{C}$ , т. к. при этой температуре полимеразная активность максимальна (определяется по включению метки в денатурированную ДНК, взятую в большом избытке, т. е. в условиях, значительно отличающихся от реальных условий проведения ПЦР). Вместе с тем элонгация при  $T_e = 72^\circ\text{C}$  может оказаться неоптимальной, т.к. в условиях мультиплексной ПЦР при наличии гетерогенности мест связывания *Taq*–полимеразы работает преимущественно с «легкочитаемыми» участками, пренебрегая «неудобными» (G/C богатыми). При температуре элонгации  $68^\circ\text{C}$  синтез меньше зависит от нуклеотидного состава матрицы, нежели при  $72^\circ\text{C}$ .

При выборе температуры отжига праймеров для мультиплексной амплификации сначала определяли оптимальные температуры отжига для каждой пары олигонуклеотидов отдельно с помощью программы Oligo 5.0. Диапазон значений исследуемых оптимальных температур отжига праймеров составил 48–59°C, а максимальных температур 62–72°C. Рассчитанная температура не всегда является оптимальной для конкретной ПЦР и на деле требует корректировки.

Провести мультиплексную ПЦР с 11 парами праймеров не при одной из исследуемых температур не удалось, специфический продукт амплификации отсутствовал, либо выход продукта амплификации был очень низким (при 59°C и 65°C), что делало невозможным последующее проведение STR–анализа. Поэтому было решено проводить амплификацию в процессе двух мультиплексных ПЦР и включить в ПЦР–программу две температуры отжига: 59°C и 65°C.

Нами была реализована одна ПЦР с 3 парами праймеров для локусов ETH3, TGLA227, TGLA53 (3 mix) и вторая – с 8 парами праймеров для локусов BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126 (8 mix). Очень важным было определение концентраций праймеров, которые входили в смесь (mix), чтобы наблюдалось устойчивое протекание ПЦР с образованием детектируемого количества продуктов реакции. Все пары праймеров предварительно консервировались в объеме 150 мкл добавлением 10 mM ЭДТА. Объем доводили бидистиллированной водой.

В таблице 3 приведены концентрации праймеров (прямой, F + обратный, R) при консервировании и рабочие концентрации праймеров, оптимизированные экспериментальным путем в ходе выполнения работы.

Успех проведения ПЦР в значительной степени зависит от степени очистки и концентрации ДНК, которая была оценена спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDgor 1000 (при длине волны 260 нм).

Таблица 3 – Рабочие концентрации праймеров для 8- и 3-плексной реакций амплификации STR-локусов

Локус	Концентрация праймеров при консервировании (F + R), mM	Рабочая концентрация праймеров (F + R), mM
8-плексная реакция (8 mix)		
BM1824	75	5,65
BM2113	75	4,70
ETH10	40	1,30
ETH225	150	18,80
INRA023	75	5,65
SPS115	75	5,65
TGLA122	100	8,30
TGLA126	120	14,40
Сумма	–	64,45
3-плексная реакция (3 mix)		
ETH3	80	6,40
TGLA227	200	40,00
TGLA53	120	8,88
Сумма	–	55,28

Оптимальная концентрация геномной ДНК, необходимой для проведения мультиплексной реакции, составила 30–200 нг/мкл (рисунок 1). Нативность ДНК определяли проведением электрофореза в 1% агарозном геле по отсутствию «шлейфа» фрагментов ДНК и интенсивности свечения бромистого этидия в УФ свете.

Также была подобрана оптимальная концентрация ионов магния ( $Mg^{2+}$ ) и dNTP (mix), которые составили 3,5 и 1,2 mM соответственно. Магний выполняет несколько функций в полимеразной цепной реакции. Это двухвалентный противоион, необходимый для dNTP, и кофактор для всех полимераз. Двухвалентные катионы оказывают большое влияние на двухцепочечную гибридизацию ДНК, и увеличение концентрации магния повышает стабильность, т.е. температуру плавления, дуплекса ДНК. Следовательно, высокий уровень магния повышает склонность праймеров к гибридизации, включая случаи нецелевого связывания и взаимодействия праймер–димер.

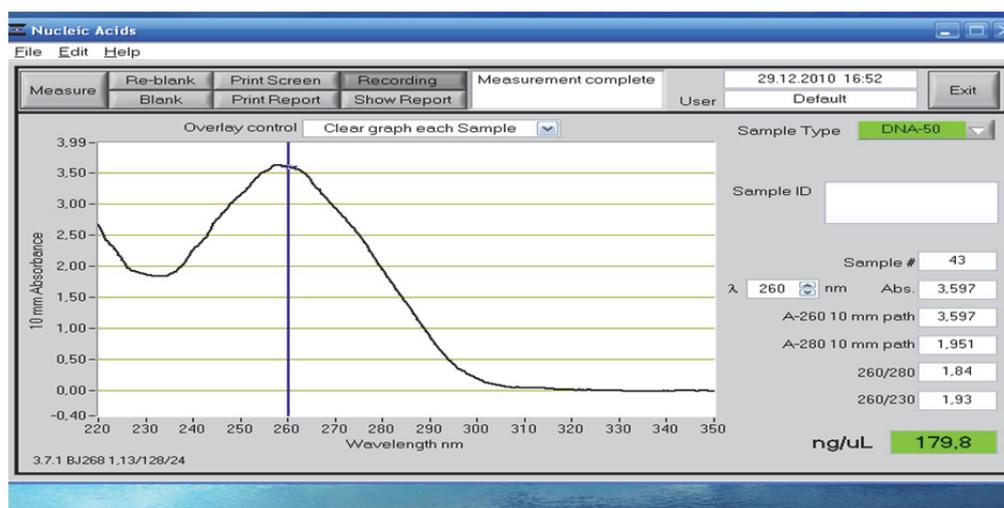
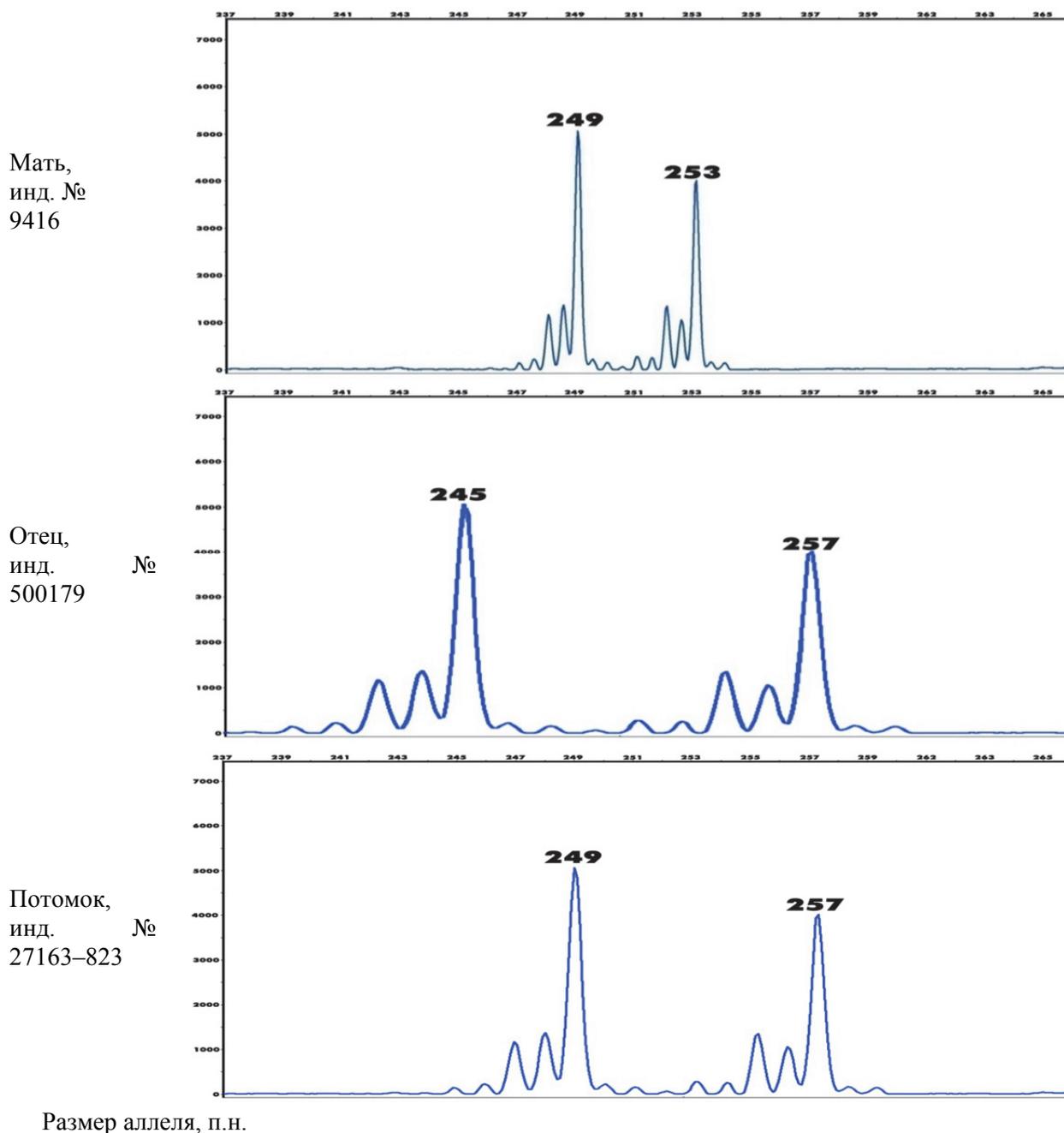


Рисунок 1 – Результат определения концентрации ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000

Для ПЦР необходимо минимальное количество магния, при этом по мере нарастания концентрации катионов меняются и эффективность, и температура отжига продукта. Этот эффект возрастает при проведении мультиплексной ПЦР, т. к. автоматически возникает конкуренция между реагентами, а оптимальность условий снижается, что отражается на эффективности ПЦР.

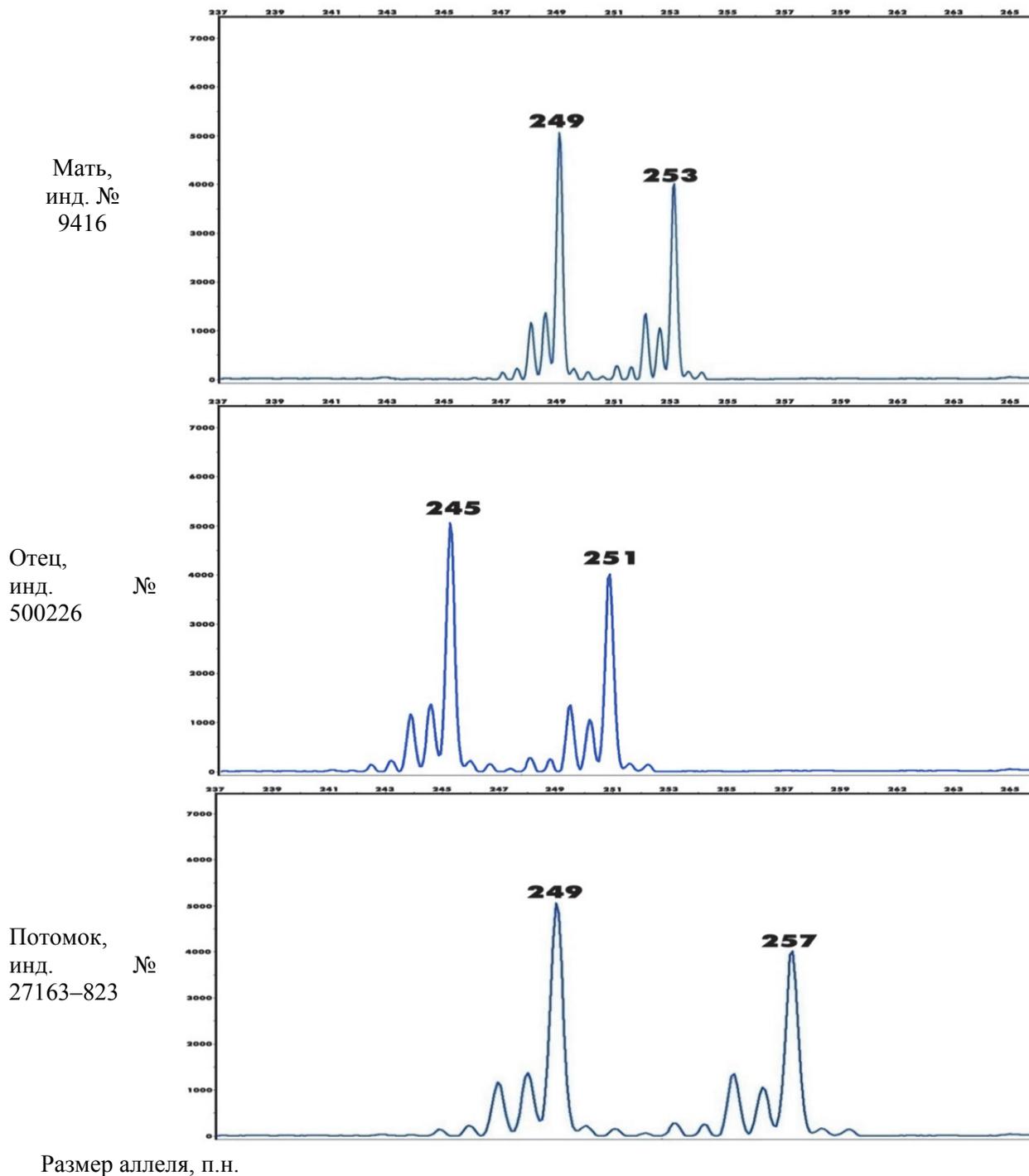
Перед постановкой в генетический анализатор, образцы денатурировали в амплификаторе типа *TPProfessional Basic* в течение 5 мин при 95<sup>0</sup>С, с последующим охлаждением при 4<sup>0</sup>С в смеси объемом 15 мкл, включающей: 1,2 мкл амплификата, 0,5 мкл LIZ-500 size standard и 13,3 мкл Hi-Di formamide. Затем производили непосредственную загрузку образцов в секвенатор ABI Prism 3130, руководствуясь протоколом. Результаты фрагментного анализа, обработанные с помощью программного обеспечения GeneMapper Software Version 4.0, вносились в форму «генетического сертификата животного».

На рисунках 2, 3 и 4 представлены результаты проведения оценки достоверности происхождения потомков крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы по локусу SPS115.



**Рисунок 2 – Определение генотипа животного, получившего аллели обоих родителей, на примере локуса SPS115**

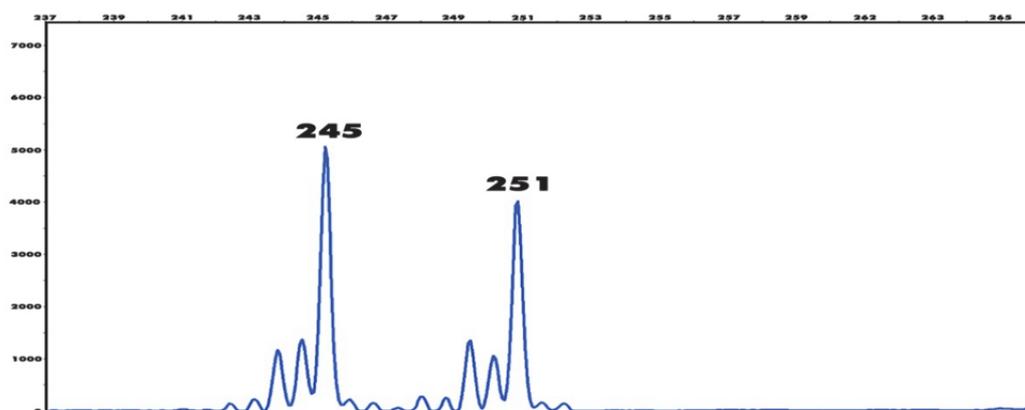
На рисунке 2 видно, что потомок унаследовал один аллель от матери (249) и один от отца (257). Если по всем 11 STR-локусам наблюдается такая же картина, то вероятность подтверждения родства составляет 99,999%.



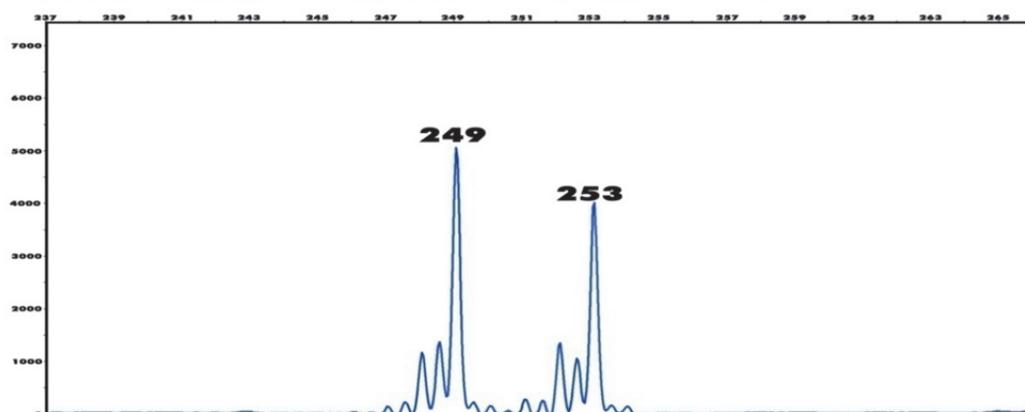
**Рисунок 3 – Определение генотипа животного, получившего аллель только от матери, на примере локуса SPS115**

На рисунке 3 видно, что по локусу SPS115 потомок унаследовал аллель только от матери (249), а на рисунке 4 – только от отца (249). Если по 1–2 локусам потомок наследует аллель одного из двух родителей, а по остальным локусам аллели обоих родителей, то вероятность подтверждения родства составляет 99,973%.

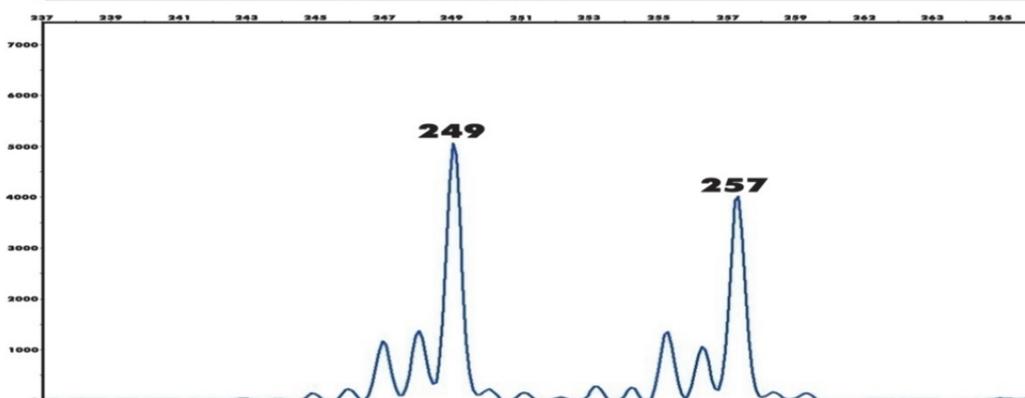
Мать,  
инд. №  
9416



Отец,  
инд. №  
500226



Потомок,  
инд. №  
27163–823



Размер аллеля, п.н

**Рисунок 4 – Определение генотипа животного, получившего аллель только от отца, на примере локуса SPS115**

Но если же по трем и более локусам у потомка аллель от отца или матери отсутствовал, то родство исключалось. Аналогично, если данные по отцу или матери вообще отсутствовали.

**Выводы.** Разработана импортозамещающая система применения 11 STR-локусов в оценке достоверности происхождения потомков крупного рогатого скота черно-пестрой породы с использованием отечественных реактивов, позволяющая с точностью 99,999% достичь уровня достоверности происхождения высокоценных племенных животных и исключить покупку импортных дорогостоящих наборов. Данная система установления происхождения животных исследуемой породы адаптирована к анализатору типа «ABI Prism 3130» фирмы Applied Biosystems.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами для изучения геномов / С.А. Булат [и др.] // Генетика. – 1992. – Т. 28, № 5. – С. 19–28.
2. Сулимова, Г.Е. Возможности использования ДНК-маркеров хозяйственно-ценных признаков крупно-

го рогатого скота в селекционных программах / Г.Е. Сулимова // Актуальные проблемы биологии в животноводстве: Материалы второй Междунар. конф., 5–8 сент. 1995 г., г. Боровск / Всерос. науч.–исслед. ин–т физиологии, биохимии и питания с.–х. животных. – Боровск, 1995. – С. 224–225.

3. Шевченко, В.Г. Генетические маркеры в селекции крупного рогатого скота / В.Г. Шевченко, Т.Ю. Шмидт // Актуальные проблемы биологии в животноводстве: тез. Докл. III Междунар. Конф., 6–8 сент. 2000 г., Россия, г. Боровск / сост.: Б.Д. Кальницкий [и др.]; Рос. Акад. с.–х. наук, Всерос. науч.–исслед. ин–т физиологии, биохимии и питания с.–х. животных. – Боровск, 2000. – С. 442–443.

4. Constructing universal multiplex PCR systems for comparative genotyping / J.M. Wallin[et al.] // J. of Forensic Sciences. – 2002. – Vol. 47, № 1. – P. 52–65.

5. Notter, D.R. The importance of genetic diversity in livestock population of the future / D.R. Notter // J. of Animal Science. – 1999. – Vol. 77, № 1. – P. 61–69.

## **OPTIMIZATIONS FOR STR MARKING PROTOCOL FOR PROOF OF CATTLE PARENTAGE**

*N.A. GLINSKAYA, L.A. TANANA, O.A. EPISHKO, D.A. KASPIROVICH*

### *Summary*

Control of an origin of animals – an indispensable condition for conducting selection work.

On the basis of the educational establishment "Polesye State University" in a research laboratory of an industrial biotechnology the system of establishment of an origin of descendants of cattle of the Belarusian black and motley breed on STR loci with use of domestic reactants allowing to exclude purchase of expensive import sets is developed.

© Глинская Н.А., Танана Л.А., Епишко О.А., Каспирович Д.А.

*Поступила в редакцию 22 сентября 2014г.*