

УДК 636.2:612.621

Терлецкий В.П., Усенбеков Е.С., Буралхиев Б.А., Спанов А.А.

*ФГБНУ «ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных»,
Санкт-Петербург-Пушкин, Россия
Казахский национальный аграрный университет,
ТОО «Казахский НИИ животноводства и кормопроизводства», Республика Казахстан*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТЕЛЯТ ТРАНСПЛАНТАНТОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ДНК ФИНГЕРПРИНТИНГА

Аннотация

Авторы работы для идентификации происхождения телят трансплантантов предлагают использовать метод геномной дактилоскопии (ДНК фингерпринтинг). Следует отметить, что метод ДНК фингерпринтинга совместно с компьютерной программой RFLPscan позволяет с высокой точностью (99,99 %) определить генотип животных, исключить или подтвердить отцовство, проводить генетическую паспортизацию племенных животных и биологических материалов (замороженная сперма, ооциты, эмбрионы).

Ключевые слова: пересадка эмбрионов, идентификация происхождения телят трансплантантов, ДНК фингерпринтинг, геномная ДНК, нейлоновые фильтры.

Введение

Внедрение в животноводство Республики Казахстан современных инновационных методов, основанных на достижениях молекулярной генетики и клеточной репродуктивной технологии является приоритетным направлением в воспроизводстве животных. К современным биотехнологическим методам воспроизводства крупного рогатого скота относятся технология искусственного осеменения коров, глубокое замораживание спермы, трансвагинальная аспирация ооцитов и их экстракорпоральное оплодотворение, трансплантация эмбрионов [1].

Достижения иммуногенетики до сих пор широко используются в практике животноводства для контроля происхождения племенных животных, определения родства пород, для идентификации происхождения телят трансплантантов. В последние три десятилетия проявляется интерес к изучению полиморфизма белков, в основе наследования которого лежит явление множественного аллелизма и кодоминантности. Результаты анализа полиморфизма белков (трансферрины, гемоглобин, ряд ферментов и др.) используются для выяснения биохимической индивидуальности организма, генетической экспертизы происхождения животных [2].

Более перспективным представляется использование в качестве маркерных систем полиморфных последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК [3, 4]. Гомологичные последовательности ДНК у различных индивидов могут различаться по одному или нескольким основаниям в результате точечных мутаций, вставок, делеций или инверсий. Использование в качестве маркерных систем полиморфных последовательностей ДНК позволяет тестировать генетический полиморфизм непосредственно на уровне генотипа, включая отдельные функциональные гены, связанные с формированием продуктивных признаков у крупного рогатого скота [5, 6, 7].

ДНК фингерпринтинг (DNA fingerprinting, англ. finger - палец и print - печать, оттиск, отпечаток) - метод создания генетических «отпечатков пальцев», основанный на анализе полиморфизма ДНК. Вначале геномная ДНК расщепляется эндонуклеазами рестрикции, затем образующиеся фрагменты разделяются при помощи электрофореза в геле и переносятся на фильтры. После этого фильтры гибридизуют со специфическими мечеными зондами. Фрагменты ДНК, гомологичные зондам, образуют полиморфные полосы гибридизации, отдельные из которых специфичны для каждого индивидуума. Поэтому метод может быть использован для генетической идентификации животных, полученных методом трансплантации эмбрионов, для подтверждения или исключения отцовства [8, 9]. В настоящее время ДНК фингерпринтинг и другие методы молекулярной генетики применяется в селекции и биотехнологии при картировании генов, выявлении породных особенностей животных [4, 9, 10], определении отцовства и материнства при трансплантации эмбрионов.

Целью работы была разработка методики идентификации происхождения телят, полученных методом трансплантации эмбрионов, с помощью ДНК фингерпринтинга, основанного на анализе образцов крови телят трансплантантов и коров доноров.

Материалы и методы исследования

Для геномного анализа использовались образцы ДНК быка-производителя Apolloho, коров доноров и телят трансплантантов молочного комплекса ТОО «Байсерке-Агро» Талгарского района Алматинской области, работа проводилась в рамках реализации научного проекта МОН РК «Интенсификация селекционного процесса в животноводстве на основе использования клеточных репродуктивных технологии».

За период с апреля по июль 2016 года отелились 6 реципиентов из 8, которым были пересажены эмбрионы нехирургическим способом в июне и сентябре 2015 года. Контроль за реципиентами проводился в течение года следующими методами: ректальное обследование стельных коров реципиентов, в начале стельности исследовали динамику содержания гормона прогестерона в плазме крови методом ИФА. Для геномной дакти-лоскопии были взяты образцы крови из яремной вены у телят трансплантантов, у коров доноров (в вакуумные пробирки с антикоагулянтном ЭДТА) и замороженная сперма быка производителя голштинской породы Apolloho Канадской селекции, которая использовалась при искусственном осеменении коров-доноров. Работа по выделению ДНК из образцов крови и идентификации телят трансплантантов методом ДНК фингерпринтинга проводилась в 2016 году в условиях лаборатории молекулярной цитогенетики ВНИИГРЖ (Санкт-Петербург, Пушкин).

Выделение ДНК проводили с использованием фенольного метода. К 1 см³ образца крови прибавляли равный объем буфера 100 мМ трис-20 мМ ЭДТА-10 мМ NaCl, pH = 8,0 и центрифугировали в течение 5 минут при 5000g. Осадок отмывали таким же образом еще раз и суспендировали в 400 мкл буфере. Затем вносили в суспензию 5 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и 25 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия (ДСН). Осторожно перемешивали. Инкубировали при 55°C в течение 3 часов. Затем добавляли фенол (pH = 8,0) в равном объеме и полученную смесь встряхивали 15 минут, затем центрифугировали при 10000g 15 минут и осторожно отбирали верхнюю водную фазу, содержащую ДНК. При этом содержимое центрифужной пробирки разделялись на 4 фазы: 1) осадок на дне - остатки клеток, 2) фаза фенола с растворенными в нем белками, 3) интерфаза - денатурированные белки, не растворимые в феноле, 4) верхняя фаза - водный раствор очищенной ДНК. Экстрагирование фенолом повторяли два раза до полного исчезновения следов белка в интерфазе. К полученному водному раствору ДНК прибавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия и два объема холодного этанола. ДНК переходит в видимое состояние и промывали

70° этанолом для удаления остатков солей и фенола. ДНК слегка подсушивали при комнатной температуре и растворяли в буфере TE (10 мМ трис HCL - 1 мМ ЭДТА, pH 7,4).

Идентификацию происхождения телят трансплантантов проводили методом ДНК фингерпринтинга [11]. Метод требует выделения высокомолекулярной ДНК для обеспечения специфичности ферментативного расщепления и получения в результате более четких полос гибридизации. Ферментативное расщепление геномной ДНК проводится рестриктазами, узнающими короткие последовательности двуцепочечной ДНК, обычно 4 пары оснований. Принципиально важным является отсутствие сайта узнавания рестриктаз в гипервариабельном участке ДНК. Необходимо сохранить интактность этого участка в геноме с целью выявления полиморфизма по его длине у сравниваемых животных. Стабильной работой отличается рестриктаза *HaeIII*, которая достаточно устойчива к повышенным температурам, способна проявлять активность длительное время, сохраняя свою специфичность.

Перед постановкой реакции расщепления, проводили тщательное выравнивание концентрации ДНК в образцах. Было установлено, что оптимальной рабочей концентрацией ДНК для ферментативного расщепления является 50 мкг/мл. В пробирку помещали 50 мкл раствора ДНК в буфере TE (2,5 мкг ДНК) и 40 мкл дистиллированной воды, что составляет в сумме 90 мкл, затем прибавляли 10 мкл 10×кратного буфера для данной рестриктазы. Если использовали рестриктазу *BsuRI* (изошизомер *HaeIII*), то соответствующий буфер называется R-буфер, в случае использования рестриктазы *HaeIII* – буфер 2. Смесь тщательно размешивали и только после этого вносили 5 мкл рестриктазы. Размешивание повторяем еще раз и готовую реакционную смесь ставили на инкубацию при 37°C на 3 часа. Полное расщепление ДНК является непременным условием получения четких полос на картинах фингерпринтинга ДНК.

Горизонтальный электрофорез использовали для разделения расщепленной ДНК по длине фрагментов. В микропробирки с 8 мкл расщепленной ДНК в буфере TE вносили 2 мкл буфера для нанесения: 0,25% бромфенол голубой - 0,25% ксиленцианол FF - 15% фиколл тип 400 и смешивали. Полученную смесь медленно вносили в кармашки предварительно подготовленного агарозного геля в камере для электрофореза. После этого подводили рабочее напряжение в 60 В. Электрофорез проводили примерно 48 часов. Известно, что получение полос на фингерпринтах хорошего качества предполагает применение длинных агарозных гелей, в которых фрагменты ДНК могут разделиться с наибольшим разрешением. Мы использовали 30 см 0,8% агарозные гели. Так как получение фингерпринтов требует хорошего разрешения фрагментов, желателно использовать электрофорезный буфер с большой буферной емкостью. Для этой цели применяли трис - боратный буфер (TBE), который выгодно отличается от широко используемого буфера TAE.

В качестве маркеров, позволяющих оценить длину фрагментов ДНК на геле, были использованы фрагменты ДНК фага λ , меченых дезоксигенином. Фрагменты были получены при расщеплении ДНК фага λ рестриктазами *Hind III* и *BstI* II. В результате образуется более 20 фрагментов ДНК различной длины, 11 из которых превышают 3675 пар оснований и могут быть использованы как маркеры длины. Фрагменты по концам метили дезоксигенином с помощью ДНК полимеразы (фрагмент Кленова). Длина фрагментов маркерной ДНК составляла 23130, 9416, 8454, 7242, 6557, 6367, 5686, 4822, 4361, 4324 и 3675 пар оснований.

В наших экспериментах мы использовали положительно заряженные фильтры фирмы Amersham (Hybond+). В качестве среды для переноса использовали нейтральный буфер: 10×SSC. ДНК в геле денатурировали путем инкубирования геля в течение 30-40 минут в

щелочном растворе: 0,5 М NaOH – 1,5 М NaCl. После этого помещали гель в буфер для нейтрализации, который имел следующий состав: 0,5 М Tris – 1,5 М NaCl. Нейтрализовали в течении 30 – 40 минут.

На перфорированную подложку аппарата помещали лист фильтровальной бумаги 3М, которую смачивали нейтральным буфером 10×SSC. Затем сверху на нее помещали лист нейлонового фильтра Hybond+ и снова смачивали поверхность буфером для переноса. Осторожно удаляли все пузырьки и неровности между слоями. Резиновую прокладку накладывали точно посередине. Помещали гель на фильтр так, чтобы он накрыл края резиновой прокладки со всех четырех сторон. Затем скальпелем срезали лишнюю часть геля, которая не соприкасается с фильтром и находится со стороны электрофорезных кармашков. На гель сверху осторожно накладывали специальный матрикс, который предварительно смачивали буфером для переноса.

После этого герметично с помощью зажимов закрепляли крышку аппарата. Перенос ДНК на фильтр проводим под давлением 80 мм ртутного столба в течении 60 минут. После окончания переноса срезали угол на нейлоновом фильтре для определения рабочей стороны фильтра и положения первой дорожки. Фильтр помещали на несколько минут в буфер 5×SSC (1×SSC: 0,15 М NaCl – 0,015 М натрия цитрат). Полноту переноса можно контролировать с помощью окрашивания геля бромистым этидием. Данная система переноса фрагментов ДНК в наших экспериментах обеспечивала 100% эффективность, так как не наблюдалось никакого свечения ДНК в геле после переноса при ультрафиолетовом облучении.

Фрагменты ДНК ковалентно пришивали к фильтру путем облучения ультрафиолетовыми лучами. Для этого фильтр помещали в аппарат Stratalinker™ рабочей стороной вверх и в режиме автооблучения (≈ 9000 Кдж/см²) ДНК пришивалась к поверхности фильтра. Процедура длится около 1 минуты. Такая фиксация ДНК позволяла проводить любые манипуляции без риска потери фрагментов ДНК с фильтра. После этапа фиксации фильтры хранились в герметически закупоренных пластиковых пакетах довольно продолжительное время вплоть до использования.

Фильтр с фиксированной геномной ДНК помещали в ванночку и вносили туда 200 мл прегибридизационного раствора. Прегибридизация проводилась в течение 2 часов или более при 45°C в таких ванночках, плотно накрытых стеклом для предотвращения испарения раствора. По окончании стадии прегибридизации буфер удаляли и в ванночку вносили свежий буфер в объеме 200 мл, содержащий меченый олигонуклеотид (ГТГ)5 в конечной концентрации 5рМ/мл. Инкубировали 15-30 минут при 45°C. На этом стадия гибридизации ДНК заканчивалась.

После гибридизации проводили отмывку фильтра от избытка меченого дезоксигенином зонда (ГТГ)5. Отмывки заключались в погружении фильтров в раствор 5×SSC при 45°C на 1 минуту при легком покачивании. Процедура повторялась три раза. После всех трех отмывок фильтр, содержащий фрагменты геномной ДНК и связанный в процессе гибридизации меченый зонд (ГТГ)5, был высушен и сохранен до стадии иммунохимической детекции на фильтре комплекса (ГТГ)5- дезоксигенин.

Фильтры промывали с легким покачиванием на шейкере в ванночке 1 минуту в буфере следующего состава: 0,1 М малеиновая кислота рН 7,5 – 0,15 М NaCl (буфер МАВ). Фильтры инкубировали с покачиванием в буфере 2, который состоит из буфера МАВ, содержащем 1/10 объема 10-ти кратного блокирующего агента (Blocking Agent, фирмы Roche®). Инкубация на шейкере продолжалась не менее 30 минут. Следующим этапом является инкубация фильтра с конъюгатом антител к дезоксигенину и фермента щелочной фосфатазы. Антитела эффективно связывались с остатками дезоксигенина, которые находятся в меченом олигонуклеотиде, связанным, в свою очередь, с гипервариабельными

участками генома животного. Фильтр помещали строго на ровную горизонтальную поверхность рабочей стороной вверх, наносили 5 мл буфера с антителами в разведении 1:5000. Сверху накрывали пленкой так, чтобы раствор антител покрыл всю поверхность нейлонового фильтра. Длительность процедуры – 30 минут.

После этого фильтр отмывали в буфере МАВ на шейкере 2 раза по 15 минут при комнатной температуре. При этом удаляются все несвязанные с фильтром антитела. Подготовка фильтра к детекции включает инкубацию 1 минуту в щелочном буфере 3: 0,1 М трис – 0,1 М NaCl, pH 9,5. Выявление конъюгата дезоксигенин-щелочная фосфатаза на фильтре происходит в иммунохимической реакции с двумя красителями: 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат (BCIP) и нитро голубой тетразолий хлорид (NBT).

В щелочных условиях, фермент щелочная фосфатаза использует субстраты, расщепляя их с формированием интенсивного сине-фиолетового окрашивания. Фильтр помещали в полиэтиленовый пакет, вносили туда 30 мл щелочного буфера 3 с субстратами BCIP и NBT в количестве по 100 мкл. Красители растворяли в 70 и 100% диметилформамиде для NBT и BCIP, соответственно. Рабочие концентрации субстратов составляли 0,075 мг/мл в щелочном буфере. Наиболее интенсивные полосы начинали проявляться уже через 5-10 минут. Выявление полос заканчивалось через 12-16 часов. После этого фильтры отмывали деионизированной водой 10 минут. Фильтры запаивали снова в полиэтиленовые пакеты, содержащие небольшое количество буфера TE. В таком состоянии фильтры могут сохраняться продолжительное время.

Первым этапом анализа является перевод изображения в цифровой формат, для чего использовали 3-CD камеру и специальную программу IPlab™. После ввода изображения анализ проводили с помощью программы RFLPscan. Маркерные фрагменты использовали для построения линий выравнивания.

Результаты и обсуждение

Интерпретация полученных результатов ДНК фингерпринтинга свидетельствует, что на нейлоновом фильтре дорожки №2 и 6 были образцами ДНК быка производителя Apolloho, сперма которого была использована для искусственного осеменения коров доноров.

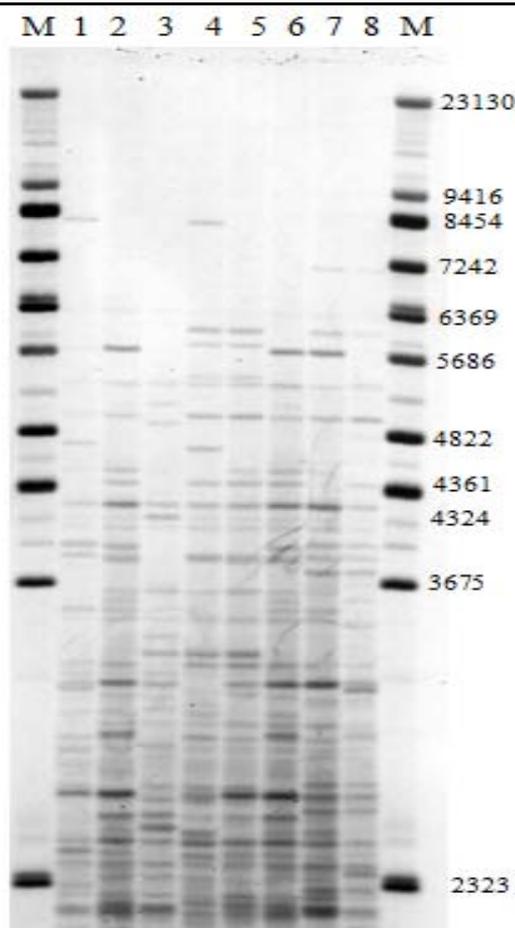


Рисунок 1. Нейлоновый фильтр с результатами подтверждения отцовства и материнства телят трансплантантов с помощью метода ДНК фингерпринтинга. М – маркер длин фрагментов, ДНК фага λ , расщепленная ферментами *Hind*III и *Bst*YII, дорожки 1 и 3 – контрольные особи (случайные две коровы из стада), дорожки 2 и 6 – отец (бык производитель Apolloho), 4 – мать (корова донор 1193), 5 – трансплантант, бычок инв, № 6089 (сын коровы 1193 и Apolloho), 7 – трансплантант, телочка инв, № 6083 (дочь коровы 2675 и Apolloho), 8 – мать (корова донор 2675).

В качестве отрицательного контроля были использованы ДНК случайных коров из данного стада, дорожки № 1,3. Образцы ДНК телят трансплантантов (дорожки 5, 7) и отца (дорожки 2,6) имеют рестрицированные фрагменты одинакового размера, так как биологическим отцом этих трансплантантов является бык производитель Apolloho (дорожки 2,6), а длина отдельных рестрицированных фрагментов ДНК совпадают с образцами коров доноров, дорожка 4 (инв. № 1193) и дорожка 8 (инв. № 2675), которые являются биологической матерью указанных телят.

Анализ картинки ДНК фингерпринтинга показывает, что у бычка-трансплантанта (дорожка 5, инд № 6089) длина рестрицированных фрагментов на уровне между фрагментами 6369 и 5686 пар нуклеотидов, совпадают с образцом биологической матери (дорожка 4, донор с инд № 1193) и отца (дорожка 6, бык производитель Apolloho). Аналогичная картина (рис 1) наблюдается у телочки-трансплантанта (дорожка 7, инд № 6083), размеры всех рестрицированных фрагментов совпадают по длине с образцом коровы донора инд № 2675 или с образцом отца (дорожка 6, бык-производитель Apolloho).

Использование технологии искусственного осеменения и трансплантации эмбрионов у крупного рогатого скота требует строгого соблюдения зоотехнического учета (дата

осеменения коров доноров, регистрация инвентарного номера быка производителя, учет полученных эмбрионов и их маркировка, учет записи в журналах по трансплантации эмбрионов).

Таким образом, полученные результаты генетической экспертизы подтверждают, что отцом телят трансплантантов является бык-производитель Apolloho, а биологической матерью бычка трансплантанта № 6089 является донор (корова донор с инд № 1193) и матерью телочки трансплантанта № 6083 донор №2675, что соответствует сведениям, которые имеются в журнале регистрации результатов пересадки эмбрионов.

Заклучение

В племенных хозяйствах, где применяются современные биотехнологические приемы воспроизводства: искусственное осеменение, осеменение сексированной спермой, пересадка эмбрионов, трансвагинальная аспирация ооцитов и их экстракорпоральное оплодотворение, рекомендуем использовать для идентификации происхождения племенных животных метод ДНК фингерпринтинга. Метод геномной дактилоскопии (ДНК фингерпринтинг) позволяет с 99,99 % точностью определить генотип животных, исключить или подтвердить отцовство, проводить генетическую паспортизацию племенного материала.

Литература

1. *Никитина З., Никитин А., Никитин К.* Трансплантация эмбрионов – перспективный путь селекции скота. Молочное и мясное скотоводство // 2006-№2.-С.11-13.
2. *Сердюк Г.Н., Иванов Ю.В., Погорельский И.А., Карпова Л.В.* Достижения и возможности иммуногенетики. Международный Научный Институт "Educatio", Биологические науки, 2015, VI (13)
3. *Дементьева Н.В., Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Яковлев А.Ф.* Использование метода фингерпринтинга ДНК для изучения генетической дивергенции в популяциях сельскохозяйственных животных // Вестник РАСХН.-2003.-№1.-С.79-80.
4. *Киселева Т.Ю., Подоба Б.Е., Заблудовский Е.Е., Терлецкий В.П., Воробьев Н.И., Kantanen J.* Анализ 30 микросателлитных маркеров у шести локальных популяций крупного рогатого скота // Сельскохозяйственная биология.-2010.-№6.-С.20-25.
5. *Lin B.Z., Sasazaki S., Lee J.H., Mannen H.* Genetic diversity of growth hormone receptor gene in cattle // Anim. Sci J. 2009. - V.80. - no.5. - P.528-531.
6. *Maj A., Oprzadek J., Dymnicki E., Zwierzchowski L.* Association of the polymorphism in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene with meat production traits in Polish Black-and-White cattle // Meat Sci. - 2006. - V.72. - no.3. - P.539-544.
7. *Waters S.M., McCabe M.S., Howard D.J., Giblin L., Magee D.A., MacHugh D.E., Berry D.P.* Associations between newly discovered polymorphisms in the Bos taurus growth hormone receptor gene and performance traits in Holstein-Friesian dairy cattle // Anim. Genet. - 2011. - V.42. - no.1. P.39-49.
8. *Иванов П.Л., Гуртовая С.В., Вербовая Л.В.* Геномная “дактилоскопия” в экспертизе спорного отцовства и определении биологического родства // Суд. мед. эксп.-1990.-Т.2.-С.36-38.
9. *Тыщенко В.И., Дементьева Н.В., Терлецкий В.П.* Определение происхождения потомства у животных методом анализа ДНК // Практик.-2002.-№11-12.-С.44-46.
10. *Тыщенко В.И., Дементьева Н.В., Терлецкий В.П., Яковлев А.Ф.* Оценка генетического разнообразия в популяциях кур на основе геномной дактилоскопии. // Сельскохозяйственная биология.-2002.-№6.-С.43-46.

11. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

**Настоящая публикация выполнена в рамках реализации проекта МОН РК «Интенсификация селекционного процесса в животноводстве на основе использования клеточных репродуктивных технологии», финансируемого в рамках бюджетной программы 217 «Развитие науки», по подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований» госрегистрация № 0115РК00728.*

Терлецкий В.П., Усенбеков Е.С., Буралхиев Б.А., Спанов А.А.

ДНК ФИНГЕРПРИНТИНГ ӘДІСІМЕН ТРАНСПЛАНТАНТ БҰЗАУЛАРДЫ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ

Аңдатпа

Жұмыс авторлары алынған трансплантант бұзауларды идентификациялау үшін геномдық дактилоскопия (ДНҚ фингерпринтинг) әдісін қолдануды ұсынады. ДНҚ фингерпринтинг әдісі компьютерлік RFLPscan бағдарламасымен қоса қолданғанда жануарлардың генотипін 99,99 % дәлдікпен анықтауға және жануардың әкесі немесе әкесі емес екенін дәлелдеуге мүмкіндік береді, асыл тұқымды жануарлар мен биологиялық материалдарды (қатырылған шәует, ооциттер, эмбриондар) генетикалық паспорттаздандырудан өткізуге қолданылады.

Кілт сөздер: эмбриондарды көшіріп қондыру, трансплантант бұзаулардың тегін идентификациялау, ДНҚ фингерпринтинг, геномдық ДНҚ, нейлондық фильтрлер.

Terletskiy V.P, Ussenbekov Y.S., Buralchiev B.A., Spanov A.A.

IDENTIFICATION OF TRANSPLANT CALVES USING THE METHOD DNA FINGERPRINTING

Annotation

Manuscript authors employed DNA fingerprinting technique for parentage verification of calves obtained by embryo transplantation. It is worthwhile to note that DNA fingerprinting along with RFLPscan computer program allow high accuracy (99.99%) identification of animal genotypes, exclude or confirm parentage, conduct genetic certification of pedigree animals and biological samples (frozen sperm, oocytes, embryos).

Keywords: embryo transfer, parentage verification of calves obtained by transplantation, DNA fingerprinting, genomic DNA, nylon filters.