

Российская академия сельскохозяйственных наук

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ЯРОСЛАВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЖИВОТНОВОДСТВА И КОРМОПРОИЗВОДСТВА

СИСТЕМА ОЦЕНКИ ПЛЕМЕННЫХ ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

ДНК-ТЕХНОЛОГИИ

Ярославль 2009

УДК 636.22.0824.4

Авторы: д.б.н., профессор Максименко В.Ф.; А.В.Ильина;

к. с-х. н. Н.С. Фураева; А.Н.Белоногова

Система оценки племенных животных с использованием ДНК-технологии.- Ярославль, ГНУ ЯНИИЖК, 2009- 41 с.

«Система» предназначена для биологов, генетиков, научных сотрудников, специалистов селекционных центров, племобъединений, племенных хозяйств, студентов биологических факультетов, ВУЗов.

Одобрена ученым советом ГНУ ЯНИИЖК (протокол № 6 от 15.09.2009)

© Максименко В.Ф., А.В.Ильина, Н.С. Фураева, А.Н.Белоногова

© ГНУ ЯНИИЖК Россельхозакадемии

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современной концепции развития животноводства усилия с/х работников следует направить на повышение получения продукции, используя научные разработки. Только это позволит сделать область рентабельной и конкурентоспособной и обеспечит население качественными продуктами животноводства по приемлемым ценам.

Ярославская порода крупного рогатого скота выведена в определенной зоне и является продуктом многовековой целеустремленной селекции в конкретных условиях среды. Генетический потенциал ярославского скота отвечает перспективным направлениям повышения продуктивности пород (В.Ф Максименко, 1991).

Повышение эффективности селекционной работы все больше связывают с развитием ДНК-технологий.

Молекулярно-генетические маркеры позволяют получать информацию о полиморфизме генов и исследовать, какие варианты генных ансамблей имеют преимущественное распространение у групп организмов, несущих желательный комплекс признаков в конкретных условиях. Появляется возможность поиска таких признаков, которые тесно связаны с уровнем пожизненной продуктивности животного.

В настоящее время все большее использование получают маркеры II поколения (ДНК-маркеры). Однако их применение требует дополнительного изучения с проведением более масштабных исследований.

Полиморфизм ДНК может быть использован для исследования закономерностей эволюции генома сельскохозяйственных животных, генетической изменчивости и наследования полиморфных вариантов. Полиморфные последовательности ДНК используются для маркирования ге-

нов, участков хромосом, генома, особей, популяций и видов при решении различных задач. Из них можно выделить следующее: оценка генетического полиморфизма (гетерозиготность популяции, микроэволюция), филогения и таксономия, генетическое картирование видов, пород животных, использование в селекции (MAS-marker assistant selection- селекция с помощью маркеров), выявление дефектных генов, ответственных за развитие наследственных болезней, диагностика болезней (Л.А. Калашникова и др., 1999).

Современные методы молекулярной биологии (ПЦР, ПДРФ и др.) позволяют быстро идентифицировать гены, ответственные за количественные признаки животных, оценить их сочетание (генотип) у производителей и молодняка. Значительную помощь селекции в молочном животноводстве может оказать генетическая информация об аллельных вариантах генов, кодирующих синтез белков (каззинов, бета-лактоглобулинов молока) и их сочетание в геноме.

В данной системе представлены экспериментальные данные по полиморфизму каззина, бета-каззина, альфа-лактальбумина, бета-лактоглобулина, гормона роста, пролактина. Выявлены связи между полиморфизмом белков и ДНК и молочной продуктивностью (по удою, болку, жиру). Изучены различия в генотипах генов по белкам молока (частоты и распределение аллелей). Обобщены научные данные и практический опыт последних лет по совершенствованию ДНК-методики по оценке животных.

Описаны основные методы, используемые в лабораторной практике для выделения ДНК, определения ее концентрации и степени очистки, дана характеристика стандартных температурных и временных режимов и способов оптимизации ПЦР.

I. МЕТОДИКА

1.1. Выделение лейкоцитов из цельной крови

Биологический материал. В качестве материала для исследований может быть использована цельная кровь, консервированная гепарином или цитратом натрия, пробы тканей, сперма.

Кровь центрифугируют 20 минут при 3000 об/мин.

Сыворотку сливают, к лейкоцитам добавляют свежеприготовленный 0,1мМ ЭДТА, центрифугируют 20 минут при 3000 об/мин.

К полученному осадку (эритроцитарной массе) приливают 1x TE Трис-HCl, ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота) в соотношении 1:3, ресуспензируют, центрифугируют.

Процедуру очистки повторяют в растворе 1xTE несколько раз до получения белого осадка лейкоцитов (отмытых от гемоглобина).

Выделенные лейкоциты переносят в пробирки типа «Эппendorф» в чистый раствор 1xTE (в соотношении 1:2). Хранят при -20°C в морозильной камере.

1.2. Методы выделения ДНК

В разделе описаны основные методы, используемые в лабораторной практике для выделения ДНК. Выбор методики определяется в зависимости от наличия исходного материала - источника ДНК (кровь, сперма, ткань, молоко), целей использования ДНК (кратковременное или длительное хранение).

Для кратковременного хранения можно использовать быстрые и малотрудоемкие методы выделения ДНК без последующей очистки от продуктов лизиса белков (щелочной лизисный буфер, метод Каваски). Для длительного хранения ДНК рекомендуется проведение экстракции лизата

органическими растворителями с последующим осаждением спиртом с целью получения очищенной фракции ДНК (солевой, перхлоратный методы, фенольно-хлороформовая экстракция).

1.3. Перхлоратный метод

Преимуществом данного метода является возможность его использования для образцов, содержащих деградированную ДНК (высушенные ткани, консервы и т.п.).

К 300 мкл консервированной крови добавляли 1,2 мл реагента А, тщательно перемешивали и центрифугировали при 7500 об/мин 2 мин. Процедуру очистки клеточных шариков от гемоглобина повторяют с использованием реагента А. 100 мкл спермы смешивают с 400 мкл реагента А, центрифугируют при 7500 об/мин 2 мин, супернатант сливают, а к осадку добавляют 13 мкл 1М DTT. Кусочек ткани (2-3 мм^3), сперму, осадок лейкоцитов крови или соматических клеток молока помещают в 1.5 мл пробирки. Добавляют 150 мкл реагента В. 5 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и инкубируют при 60°C в течение 8-12 часов или на ночь. К клеточному личинту добавляют 0.33 об. (50 мкл) 5M раствора Na-перхлората и хорошо перемешивают. Затем добавляют 300 мкл СIA, интенсивно смешивают 3-5 мин и центрифугируют 5 мин при 15000 об/мин. Верхнюю ДНК-содержащую фазу осторожно, не затрагивая промежуточного слоя, переносят в чистую пробирку и при необходимости проводят повторную очистку СIA. К ДНК-содержащей фазе добавляли 2 об. (600 мкл) 100% этилового спирта для осаждения ДНК, интенсивно перемешивают, после чего визуализировали шарик ДНК. В случае отсутствия шарика ДНК пробирки центрифугируют 2-3 мин при 15000 об/мин. После визуализации шарика надосадочную жидкость удаляют, добавляют 0.5-1.0 мл 70% этанола (охлажденного до -20°C) и инкубируют 5-10 мин при комнатной

температуре. После удаления спирта пробирки переворачивают и высушивают шарик в течение 20-30 мин при комнатной температуре. Содержимое пробирки ресуспенсируют в 50-100 мкл дистиллированной воды или буфера TE.

1.4. Метод солевой экстракции

Данный метод является модификацией метода, описанного Miller с соавторами (1988). Этот метод не требует экстракции фенолом, экстрагированная ДНК является высокомолекулярной (20-50 kb), степень очистки ДНК довольно высокая, что позволяет использовать ее в реакциях энзиматического расщепления рестрикционными энзимами.

Кусочек ткани (2-3 мм³) или осадок лейкоцитов помещают в 200 мкл гомогенизационного буфера с добавлением протеиназы K (20 мг/мл) (протеолитический фермент класса гидролаз, катализирует расщепление пептидных связей в белках и пептидах) до конечной концентрации 0,5-0,1 мг/мл и инкубируют при 60-65⁰C 8-12 часов. К клеточному лизату добавляют 0,75 объема (300 мкл) CIA (хлороформ, изоамиловый спирт) и после интенсивного смешивания (3-5 мин.) центрифицируют 5 мин при 15000 об/мин.

Верхнюю ДНК-содержащую фазу, переносят в чистую пробирку, добавляют 2,5 объема 100% этанола для осаждения ДНК и интенсивно перемешивают, после чего визуализируют шарик ДНК. В случае отсутствия шарика ДНК центрифицируют 2-3 мин. при 15000 мин. об/мин. После визуализации шарика удаляют надосадочную жидкость, добирают 0,5-1,0 мл. 70% этанола (охлажденного до -20⁰C) и инкубируют 5-10 мин при комнатной температуре. После удаления этанола шарик высушивают в течение 30-40 минут при комнатной температуре и ресуспенсируют в 50-100 мкл дистиллированной воды или буфера TE.

1.5. Метод Кавасаки

Данный метод позволяет исключить длительную процедуру фенольно-хлороформовой экстракции и использовать для последующего анализа непосредственно лизат клеток (Kawasaki, 1990). Метод может быть с успехом использован для выделения ДНК из проб тканей (Попов и др., 1995).

Пробы ткани (около 1 мм³) помещают в 200 мкл буфера Кавасаки с добавлением 5 мкл протеиназы К (20 мг/мл) до конечной концентрации 0.5 мг/мл и инкубируют 8-24 часа при 58°C.

По завершении лизиса для инактивации протеиназы К пробирки выдерживают при 95°C в течение 10-15 мин, затем охлаждают и центрифугируют 1-2 мин при 15000 об/мин для осаждения остатков клеток. Прозрачный лизат непосредственно используют для ПЦР-анализа. В случае необходимости проведения последующих анализов лизат может храниться при +4°C 2-3 недели или при -20°C в течение нескольких месяцев.

Использование лизатов тканей без дополнительной очистки и концентрации ДНК для ПЦР-анализа возможно вследствие замены ионного детергента SDS, присутствующего в протеиназа К-буфере, на ионный детергент Tween 20, который не нарушает протекание ПЦР. Однако выделение фрагментов ДНК длиной более 20 kb методом невозможно.

В 0,5 мл центрифужные пробирки, содержащие 10 мкл щелочного лизисного буфера ALL, добавляют 1 мкл спермы или суспензии ядроодержащих клеток крови. В случае использования проб молока буфер ALL (10 мкл) добавляют непосредственно к осадку соматических клеток молока. Пробы инкубируют при 60°C в течение 30-45 мин. Затем лизат охлаждают, центрифугируют в течение нескольких секунд для осаждения конденсата и добавляют равный объем (10 мкл) нейтрализационного раствора NL. Содержимое пробирок тщательно перемешивают путем

встряхивания или с помощью пипетки, после чего пробирки вновь центрифугируют при 15000 об/мин 1 мин для осаждения нелизированных остатков. Для ПЦР используют 1 мкл подготовленным таким образом лизата клеток.

1.6. Контрастно-температурный лизис

Для выделения ДНК из крови для ПЦР-анализа в случае отсутствия таких дефицитных реагентов, как Трис-НСІ, ЭДТА, ДТТ можно с успехом использовать данный метод.

250 мкл крови помещают в 1,5 мл пробирку и смешивают с 1 мл 10 mM раствора фосфата натрия. После короткого встряхивания пробирку центрифугируют в течение 1 мин при 10000 об/мин для осаждения лейкоцитарной фракции. После удаления надосадочной жидкости процедуру повторяют. Затем лейкоцитарный шарик суспензируют в 1 мл солевого буфера и центрифугируют при тех же условиях.

Супернатант сливают, осадок ресуспензируют в 50 мкл дистиллированной деионизированной воды. Далее пробирку выдерживают 3 мин при 100°C, затем -мин при 55°C и еще 2 раза при 100°C и при 55°C. Далее пробирку с содержимым охлаждают до комнатной температуры, центрифугируют при 10000 об/мин 1 мин охлаждают до 4°C. для проведения ПЦР берут 1 мкл надосадочной жидкости.

1.7. Фенольно-хлороформовая экстракция ДНК

Процесс выделения ДНК из лейкоцитов крови включает этапы:

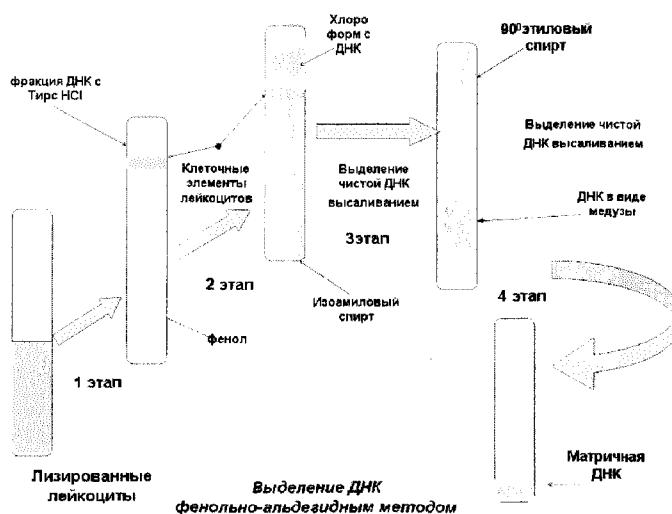
- лизис лейкоцитов

К лейкоцитам добавляют 10% раствор SDS (сульфацилдедоцил натрия) в соотношении 1:10, инкубируют при 37°C 12-18 ч.

- выделение фракции ДНК фенолом и очищение раствора ДНК хлороформизоамиловым спиртом (рис.1)

- дополнительная очистка 96° и 70° этиловым спиртом.

Рисунок 1



1. К лизату добавляют равный объем свежеприготовленного насыщенного буфером фенола, встряхивают, центрифугируют 6000 об/минуту 10 минут.

2. В чистые, аналогично подписанные, пробирки типа «Эплендорф» переносят фенольную массу ДНК (верхняя фракция).

К этой фенольной массе приливают хлороформоамиловый спирт (CIA) в соотношении 1:1, встряхивают, центрифугируют 6000 об/минуту 10-15 минут, отбирают верхнюю фракцию. В изоамиловом спирте отмывают 2 раза. Работу проводят под вытяжкой.

Фракцию ДНК в CIA (верхняя фракция) переносят в чистую одноразовую пробирку.

3. Высаливание ДНК из раствора проводят путем внесения 2,5 -3 объемов охлажденного до -20°C 95° этанола, дополнительную очистку проводят 70% этанолом.

К перенесенной верхней фракции, полученной после очищения СИА добавляют 96°C спирт, встряхивают, центрифугируют 1 минуту при 3000 об/мин. Спирт сливают, добавляют 70°C, инкубируют в морозильной камере 20-30 минут. Спирт сливают. Выделенную ДНК высушивают.

Хранят образец ДНК в буфере 1xTE. Срок хранения до пяти лет.

1.8. Постановка полимеразной цепной реакции

Проведение ПЦР включает этапы:

1. реакция амплификации
2. регистрация продуктов амплификации. Оценка результатов ПЦР - реакции методом электрофореза в агарозном геле.

Постановка реакции амплификации. ДНК генома животных исследовали по полиморфизму длин рестриктных фрагментов методом амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для проведения ПЦР - реакции используются самотестируемые программируемые термостаты типа Ampli 4 или Терцик.

Таблица 1
Схема внесения смеси для амплификации

Наименование	ДНК (мкл)	dNTP (мкл)	прай- мер (мкл)	Вода (мкл)	10 x буфер (мкл)	Tag поли- мераза (мкл)	Минераль- ное масло (мкл)
Кол-во реагента	2	2	1	17	2,5	0,5	25
Порядок внесения реагентов	индивиду- ально	2	4	1	3	индивиду- ально	индивиду- ально

Смесь амплификации, именуемая, в дальнейшем «МИКС» готовят в пробирке типа «Эппendorф» 1,5 мл путем четкой последовательности внесения реагентов (таблица 1). Общий объем «МИКСа» из расчета на одну пробу должен составлять 25 мкл. «МИКС» встряхивают 30 сек 3000 об/мин.

Минеральное масло вносят в конце, индивидуально в каждую пробу центрифугируют и помещают в амплификатор на программу соответствующую полимеризации.

Регистрация продуктов амплификации. Электрофорез в агарозных или полиакриламидных гелях позволяет разделить молекулы ДНК по их размерам. Этот метод основан на сравнительном анализе исследуемого и стандартного препаратов ДНК на фотографии геля, окрашенного бромистым этидием. Бромистый этидий является интеркалирующим красителем и связывается с ДНК. Электрофорез проводят в 1x буфере ТАЕ в электрофоретической камере. Гелевая полоска помещается, таким образом, чтобы гель находился полностью в буфере, а раствор был на 0,5-1,0 см над гелем. Для определения длины фрагментов амплификаторов дополнительно раскапывают соответствующий маркер (известной последовательности ДНК) в количестве 8-10 мкл.

Визуализацию и оценку амплификаторов в свете коротких УФ лучей изучают при помощи трансиллюминатора. Изображение выводится на экран компьютера и регистрируют с помощью программы гель - документирования.

Полученные ПЦР - продукты оценивают по характеру свечения и подвижности амплификата в агарозном геле, в контрастном свечении бромистого этидия.

Оценка результатов ПЦР - реакции проводят в сопоставлении длин амплификаторов с длинами маркера.

Рисунок 2

Результаты реакция амплификации



Рестрикция. После проведения амплификации для выявления вариантов генотипа проводят постановку рестрикции.

Для каждого гена используется определенные рестриктазы. Для генотипирования гена каппа-казеина используется Hind III, Apal, Tail, XbaI при сомнительных или не интерпретируемом результате рестрикцию проводят повторный анализ.

Постановку проводят в день проведения амплификации или наследующий. Приготовление «МИКСа» рестрикций проводят из расчета на одну пробу по схеме:

бидистиллированая вода, стерильная -7,0 мкл
буфер для рестриктазы-2,5 мкл
рестриктаза -0,5 мкл

Общий объем рестрикционной смеси должен быть 8-10 мкл. Эндо- нуклеазу можно вносить индивидуально в каждую пробу методом под- слаивания под минеральное масло.

Центрифицируют 1 минуту при 3000 об/минуту. Далее проводят инкубацию в термостате при 37 С° 3-18 ч. Регистрация и визуализация фрагментов рестрикции проводится после электрофореза.

1.9. Определение частоты аллелей и частоты генотипов при кодоминантном наследовании и двухаллельной системе локуса

У большинства полиморфных систем доминирования одного локуса над другим нет, а наблюдается кодоминирование, при котором в фенотипе проявляются оба аллеля. При этом среди гомозиготных генотипов легко можно выделить гетерозиготные генотипы.

При такой структуре локуса и кодоминантном наследовании величины частот p и q определяют по формулам:

$$pA = \frac{2n_1 + n_3}{2N}$$

при этом сумма $p_A + q_B = 1$.

Здесь, n_1 и n_2 – количество особей гомозиготного генотипа;

n_3 -количество гетерозиготных особей;

$2N$ - число аллелей в локусе диплоидного организма в популяции, насчитывающей N особей.

Концентрацию в данной популяции животных всех трех генотипов определяют подсчетом по каждому типу численности особей и отнесением этого показателя к общему количеству обследованных животных. В таком случае частота трех генотипов будет составлять:

$$pAA = \frac{n_1}{N};$$

$$qBB = \frac{n_2}{N};$$

$$zAB = \frac{n_3}{N};$$

Сумма частот должна составить единицу, т.е. $p+q+z=1$.

Статистическую ошибку для обеих частот определяют по формуле:

$$mp = mq = \sqrt{\frac{p \times q}{2N}};$$

С помощью метода хи-квадрат (χ^2) можно определить, достоверно или недостоверно отличаются частоты, полученные на фактическом материале, от частот, характеризующих данный признак на основании данной гипотезы.

Для этого используют формулу:

$$\chi^2 = \sum \frac{(P_{\text{эмп}} - P_{\text{теор}})^2}{P_{\text{теор}}};$$

где Р эмп-фактическое количество особей данного генотипа, полученное в опыте;

Р теор- теоретически ожидаемое особей данного генотипа, которое будет соответствовать выдвинутой гипотезе.

II. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМОРФИЗМА БЕЛКОВ И ГОРМОНОВ

2.1. Генотипирование по вариантам кальфа-казеина

Белки молока состоят из сывороточного белка и казеина. В молоке содержится в среднем 3,2% белка, колебания составляют от 2 до 5%. Если общее количество белков молока принять за 100%, то на долю казеина приходится 82%, сывороточных белков 18% .

По данным, Н.А. Зиновьевой, 2001 в настоящее время известно 10 аллелей кальфа-казеина - A, B, C, E, F, G, H, I, X, AJ.

В зависимости от степени электрофоретической подвижности белки располагаются в следующем порядке a_{s0} -Cn_{s0}, a_{s1} -Cn; a_{s2} -Cn, B-Cn, xCn, x-Cn, y-Cn (Б. Иличева, М. Еремина, 1996). Фракции a_{s1} -Cn (альфа), B-Cn (бета), x-Cn (кальфа), y-Cn (гамма) проявляют генетический полиморфизм и имеют от двух до одиннадцати вариантов, различающихся между собой аминокислотным составом.

В настоящее время в России практически отсутствуют характеристики генофонда различных пород крупного рогатого скота России по генотипам каппа-казеина. В то же время имеются указания на наличие значительного разнообразия по частоте встречаемости каппа-казеина у широко распространенных и локальных пород.

Качество молока и возможность его использования в сыроварении в значительной степени зависит от аллельных вариантов каппа-казеина (фосфогликопротеин, составляющий около 12% казеинового комплекса).

В настоящее время известно 7 аллелей каппа-казеинов крупного рогатого скота: A, B, C, E, F, G, H. У животных ярославской породы выделено 5 аллельных вариантов: A, B, C, F, G (Костюнина О.В., 2005). Изучение гена каппа-казеина показало существование нуклеотидных замен, которые характеризуют различные аллельные варианты. По данным, многих авторов, B-вариант каппа – казеина ассоциируется с более высоким содержанием белка в молоке, более высоким выходом творога и сыра, а также лучшими коагуляционными свойствами молока. Различия между вариантом AA и вариантом BB по степени использования сухого вещества при выработке творога составляет 5-9%. При производстве сыров из молока с генотипом BB выход сыра увеличивается до 10 % по сравнению с генотипом AA. Каппа-казеин играет роль защитного коллоида для всего казеинового комплекса.

Для амплификации (удвоения) фрагмента 4 экзона (кодирующая последовательность в структурных генах эукариот) гена каппа-казеина используют олигонуклеотидные праймеры (одноцепочечные последовательности ДНК, длиной около 20 оснований, которые комплементарны определенным участкам интересующей последовательности и тем самым фланкируют ее)

VAR5 (5'-АТАГЦДААА ТАТ АТЦЦДА АТТ ЦАГ Т-3')

VAR3 (3'-ТТТ ATT AAT AAГ ТЦД АТТ ААТ ЦПТ Г-3') (Зиновьева Н.А.).

Bocas A 5'-ATGTGCTGAGCAGGTATCCTAGTTATGG-3'

Bocas B 5'-CCAAAAGTAGAGTGCAACAAACACTGG-3' (С.Д. Кириленко, В.И. Глазко, 1995).

Аллельные варианты А и В белка каппа-казеина отличаются двумя аминокислотными заменами (Thr 136→Iso и Asp 148→Ala) и кодируются разными аллелями гена. Каждый аллель гена имеет нуклеотидные замены ДНК – точковые мутации, которые являются причиной синтеза в молоке каппа-казеинов разной структуры. Эти замены могут быть распознаны с помощью рестриктаз: Hind III, PstI, Apal, Tail, XbaI.

Вариант А содержит два сайта узнавания рестриктазой и в результате расщепления ферментом распадается на 3 фрагмента. Аллель В содержит один сайт узнавания рестриктазой и для него продуктами рестрикции являются 2 фрагмента (таблица 2).

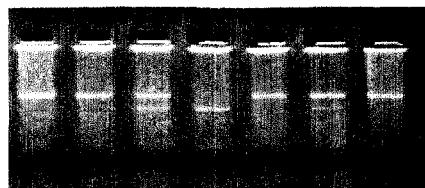
Таблица 2

Регистрация фрагментов каппа-казеина

Генотип	Длина фрагментов (пн)	
	Рестриктаза PstI	Рестриктаза Hind III
AA	106; 306; 471; 777	530
AB	106; 777	530; 400; 130
BB	106; 306; 471	400; 130

Рисунок 3

Рестрикция по каппа-казеину (эндонуклеаза рестрикции Hind III)



С помощью ПЦР из проб ДНК животных выявлены специфические фрагменты гена каппа-казеина. Определены два аллеля гена каппа-казеина А и В и три генотипа AA, AB, BB.

Полученные результаты свидетельствуют о сходстве распределения частот аллелей гена CASK у ярославских коров (рис. 4). Аллель А гена CASK встречается с частотой 0,5-0,55 (табл. 3). Надо отметить, что частота аллеля CASK^B, связанная с наибольшим содержанием белка в молоке и повышенным выходом сыра, сравнительно высокая и характерна для данной породы. Внутри популяции она варьирует в пределах 0,45-0,5.

Среди исследуемых коров СПК «Горшиха» и ОАО «Михайловское» чаще встречаются животные с генотипом CASK^{AB} (60% и 43,3%- внутри популяции; 51,7 % между популяциями). Животных с генотипом CASK^{AA} незначительно больше, чем с генотипом CASK^{BB}-26,6% и 21,7% соответственно (рис. 5).

Таблица 3
Полиморфизм животных по гену каппа-казеина

Наименование хозяйств	Частоты генотипов, %			Частота аллелей	
	AA	AB	BB	A	B
СПК «Горшиха»	20	60	20	0,5±0,04	0,5±0,04
ОАО «Михайловское»	33,3	43,3	23,4	0,55±0,04	0,45±0,04
По породе	26,6	51,7	21,7	0,53±0,03	0,47±0,03

Рис.4

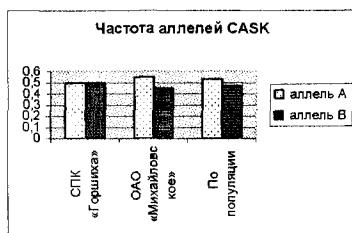
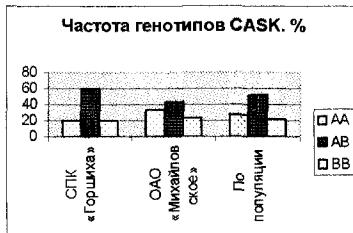


Рис. 5



Показатели гетерозиготности по гену CASK

Таблица 4

Наименование хо- зяйств	Ожидаемая гетерозигот- ность,% Не	χ^2	Коэффициент ва- риации (Сv), %
СПК «Горшиха»	50	2,0	53,61
ОАО «Михайловское»	49,5	0,88	57,7
По ярославскойпороде	49,9	0,065	39,24

Анализ генетической структуры стада показал, что в этих хозяйствах сохраняется генное равновесие по локусу каппа-казеина как на внутрипородном, так и на межпородном уровне, избыток гетерозигот не выявлен (табл. 4).

Для селекции животных первостепенное значение имеет генетическая вариабельность. Степень изменчивости генотипа по локусу каппа-казеина незначительно выше в хозяйстве ОАО «Михайловское» 57,7 %, чем в СПК «Горшиха» (53,61%). В целом по породе степень генетической вариабельности составила 39,24%.

Доля гомозиготных генотипов AB>AA (51,7%>26,6%) и AB>BB (51,7%>21,7%).

Для селекции животных первостепенное значение имеет генетическая вариабельность. Степень изменчивости генотипа по этому локусу составила 39,24%. Это говорит о том, что есть возможность работы с породой по этому локусу.

Необходимо привлекать современные методы селекции с использованием генетического маркера В-варианта каппа-казеина для сохранения и улучшения физико-химических и технологических свойств молока.

Результаты анализа молочной продуктивности в группах коров по популяциям показали наличие статистической достоверности разницы по содержанию белка в молоке BB>AB (3,46%>3,37%), BB>AA (3,46%>3,35%).

2.2. Определение вариантов гена альфа-лактальбумина

Альфа-лактальбумин является специфическим белком, необходимым для синтеза лактозы из УДФ-галактозы и глюкозы.

Для определения аллельного полиморфизма гена LALBA использован метод ПЦР-ПДРФ анализа, позволяющий диагностировать два наиболее часто встречающихся его варианта - А и В. Диагностика основана на определении точковой мутации в позиции 263 (-1689) 5'-фланкирующего региона. Исходя из наличия и локализации мутации, выбраны два олигонуклеотидных праймера, амплифицирующие фрагмент гена длиной 440 п.о., включающий данную точковую мутацию.

По завершению ПЦР проводили гидролиз продуктов ПЦР (10 МЛ) 1 Ед эндонуклеазы Mhl 1 с последовательностью узнавания GDGCH↓ С (D=A, G,T; а H=A,C,T).

После рестрикции в зависимости от генотипа животного образуются фрагменты (табл. 5).

Таблица 5

Длина фрагментов (п.о.)

Генотип	Эндонуклеаза Mhl 1
AA	328
AB	328; 211; 117
BB	211; 117

Фрагмент длиной 328 п.о. является общим для обоих аллелей и не зависит от генотипа животных. Наличие данного фрагмента можно рассматривать в качестве контроля активности рестрикционного фрагмента и

контроля степени рестрикции. Вследствие незначительных различий в длине фрагменты длиной 117 и 211 п.о. на электрофореграмме зачастую идентифицируются в виде одного общего фрагмента.

Дифференциация по генотипам LALBA в данных хозяйствах проявляется неоднозначно (табл. 6)

Таблица 6

Распределение генотипов и аллельных частот

Наименование хозяйств	Частоты генотипов LALBA, %			Частота аллелей	
	AA	AB	BB	A	B
СПК «Горшиха»	47	41,2	11,8	0,68±0,03	0,32±0,03
ОАО «Михайловское»	59,8	30,9	9,3	0,75±0,03	0,25±0,03
ОАО им. Дзержинского	18	64	18	0,5±0,06	0,5±0,06

Рис. 6

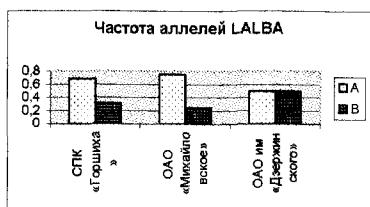
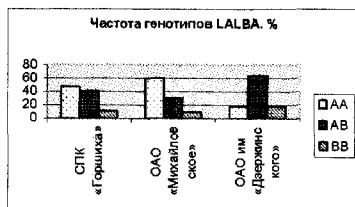


Рис. 7



Частоты встречаемости аллелей и генотипов в исследованных популяциях значительно различались (рис 6, 7). Наиболее высокая частота аллеля A отмечена в генотипах животных ОАО «Михайловское» (0,75), а частота аллеля LALBA^B составила 0,25. В популяции стада СПК «Горшиха» также отмечено преобладание аллеля A (0,68).

Таким образом, в хозяйствах ОАО «Михайловское» и СПК «Горшиха» преобладают животные с генотипом LALBA^{AA} (59,8 %-47%, соответственно). В ОАО им. Дзержинского наибольшее количество животных с генотипом LALBA^{AB} -64%.

Таблица 7

Показатели гетерозиготности по гену LALBA

Наименование хозяйств	Ожидаемая гетерозиготность, % Не	χ^2	Коэффициент вариации (Сv), %
СПК «Горшиха»	43,52	0,1	37,3
ОАО «Михайловское»	37,5	1,16	31,9
ОАО им. Дзержинского	50	3,92	73,2

В хозяйствах ОАО «Михайловское» и СПК «Горшиха» наблюдаемое расщепление соответствует ожидаемому (генное равновесие по локусу гена альфа-лактальбумина сохраняется) (табл. 7). Степень генетической вариабельности варьирует в пределах 31,9%- 37,3% соответственно. В популяции хозяйства ОАО им. Дзержинского наблюдается достоверное смещение генного равновесия в сторону генотипа AB ($P \leq 0,05$).

2.3. Полиморфизм животных по гену соматотропина

Ген гормона роста (GH) представляет собой ассоциацию белковых гормонов, участвующих в формировании признака молочной продуктивности у животных, таких как содержание жира и белка.

Он стимулирует поступление аминокислот в клетку, повышает скорость синтеза белка, оказывает влияние на обмен углеводов и жиров, обладает своего рода антиинсулиновым действием. Под влиянием гормона роста повышается концентрация глюкозы в крови (за счет торможения поступления в клетку и синтеза в печени), ускоряет липолиз, причем продуктами этого процесса являются свободные жирные кислоты, которые препятствуют действию свободных радикалов.

Исследован рестрикционный полиморфизм 5 экзона гена соматотропина (GH), обусловленный транзицией С/A, приводящей к аминокислотной замене в позиции 127 (Leu/Val) в белковом продукте и потере AluI – сайта в нуклеотидной последовательности гена.

При амплификации фрагмента локуса соматотропина для выявления L/V аллельных вариантов используют следующие пары олигонуклеотидных затравок:

GH1 5'-CCGTGTCTATGAGAAGC -3'

GH2 5'-GTTCTTGAGCAGCGCGT -3'

Условия амплификации для этой пары праймеров при концентрации хлорида магния 2,5 Мм: 94°C -30 сек-денатурация; 60°C- 1 мин - отжиг; 72°C-30 сек - синтез.

После обработки рестриктазой AluI выявлены три генотипа по гену GH: генотипу LL соответствует продукт 265, 96, 51 пн, генотипу LV – 265, 147, 96, 51 пн и генотипу VV – 265, 147 пн.

В выборке животных с генотипом GH^{LL} доля особей с более низким содержанием белка в молоке (3,2-3,4%) выше на 9-10%, чем у коров с генотипом GH^{VL} и GH^{VV}.

Среди животных с генотипом VL больше особей с жирностью молока выше 4,5%, чем в выборках с генотипом LL и VV (на 23% и 18% соответственно).

В выборке животных с генотипом GH^{VV} количество высокопродуктивных коров (более 6000 кг молока за лактацию) было в 1,75 раза выше, чем среди животных с генотипом GH^{LL}, и в 2,5 раза выше, чем в выборке с генотипом GH^{VL}.

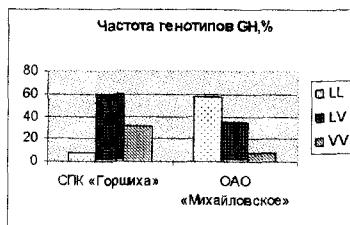
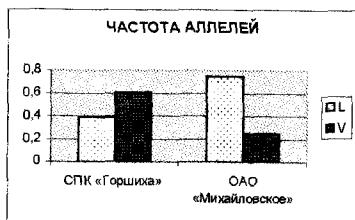
Исследованные животные разделились на две группы по сходному распределению аллелей и генотипов GH (табл. 8).

В популяции ОАО «Михайловское» наблюдается преобладание аллеля GH^L - 0,75 (рис. 8). Аллель GH^V выше у животных стада СПК «Горшиха» (0,61).

Таблица 8
Полиморфизм животных по гену соматотропина

Наименование хо- зяйств	Частоты генотипов GH , %			Частота аллелей	
	LL	LV	VV	L	V
СПК «Горшиха»	8	60	32	0,39±0,05	0,61±0,05
ОАО «Михайловское»	57	35	8	0,75±0,04	0,25±0,04

Рис. 8



Генотип GH^{LL} преобладает в стаде ОАО «Михайловское» (57%). У коров СПК «Горшиха» ген гормона роста представлен преимущественно гетерозиготным генотипом (60%) – GH^{LV} (рис. 9).

Таблица 9

Показатели гетерозиготности гормона роста

Наименование хо- зяйств	Ожидаемая гетеро- зиготность, % Не	χ^2	Коэффициент вариации (Cv), %
СПК «Горшиха»	47,58	3,24	65,4
ОАО «Михайловское»	37,5	0,16	40,9

В популяциях сохраняется генное равновесие по локусу гена гормона роста, т.к. наблюдаемое расщепление соответствует ожидаемому (табл. 9).

Сравнивая коэффициенты вариации генотипов по локусу гормона роста, можно сказать, что изменчивость генотипа выше в популяции хозяйства СПК «Горшиха».

2.4. Полиморфизм гена пролактина у ярославского скота

Пролактин (PRL) представляет собой семейство белковых гормонов, который принимает участие в инициации и поддержании лактации, рост органов и тканей у млекопитающих, и может рассматриваться как потенциальный генетический маркер продуктивности крупного рогатого скота.

Методом ПЦР-ПДРФ изучено распределение частот аллелей гена пролактина, обусловленных A-G транзицией, возникающей в 103 кодоне (экзон 3) и приводящей к появлению полиморфного RsaI -сайта (Lewin et al, 1992).

Амплификация проводится при помощи праймеров к наиболее консервативным участкам генов:

PRL1 5'-CGAGTCCTTATGAGCTTGATTCTT-3'

PRL2 5'-GCCTTCCAGAAGTC GTTTGTTTC-3'

После обработки амплификаторов рестриктазой RsaI выявлены три генотипа животных по гену пролактина: AA (156 пн), AB (156, 82, 74 пн) и BB (82 и 74 пн).

Исследования выявили отрицательную зависимость жирности молока от PRL^{BB} – генотипа: количество коров с жирностью молока менее 4,5% в выборке животных PRL^{BB} - генотипом на 17-18% выше, чем в выборках с генотипом PRL^{AA} и PRL^{AB}.

Частота аллеля А составила 0,65, аллеля В - 0,35 (табл. 10, рис. 10). Частоты генотипов по гену PRL^{AA} и PRL^{AB} имеют сходное значение- 43 % (рис. 11).

Таблица 10

Распределение частот генотипов и аллелей гена пролактина

Пролактин (PRL)					
Кол-во голов	Частоты генотипов, %			Частота аллелей	
	AA	AB	BB	A	B
120	43	43	13	0,65±0,043	0,35±0,043

Рис. 10

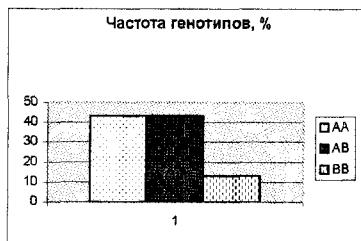


Рис. 11

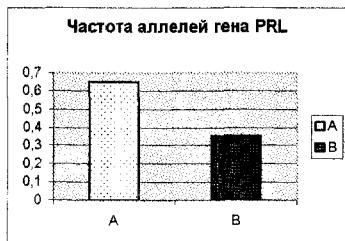


Таблица 11

Показатели гетерозиготности по гену PRL

Наименование анализа	Ожидаемая гетерозиготность, % Не	χ^2	Коэффициент вариации (Cv), %
ПЦР-ПДРФ	45,5	0,14	32,3

Наблюдаемое распределение частот генотипов (43%) в исследованных выборках для локуса пролактина соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга (45,5%). Коэффициент генетической изменчивости находится на высоком уровне (32,3%), поэтому имеются возможности для дальнейшей работы по этому локусу.

2.5. Характеристика быков ОАО «Ярославское» по локусам

Результаты генотипирования 128 быков по локусам каппа-казеина, бета-казеина, альфа-лактальбумина, бета-лактоглобулина, гормона роста обобщены в таблице 12.

Бета-казеин (CSN2) - присутствие В-аллеля бета - казеинов в генотипе коров, а также широкое использование гетерозиготных быков-производителей по этим локусам способствует повышению содержания белков и улучшению сыродельческих свойств молока

Полиморфизм отдельных вариантов CSN2 обусловлен единичными нуклеотидными заменами. Реакцию проводят в конечном объеме 20 мкл, используя стандартный состав реакционной смеси и 5 пмоль каждого из праймеров. Проводят 37 циклов ПЦР в стандартном температурно-временном режиме (температура отжига -63°C). По завершении ПЦР 5 мкл реакционной смеси наносят в агарозный гель с целью оценки амплификации, а также проверки контролей. В случае успешной амплификации проводят гидролиз оставшейся реакционной смеси (10 мкл) 1 ед. эндонуклеазы *HaeIII* в течении 12 часов при рекомендуемой производителем температуре. По окончании инкубации проводят электрофоретическое разделение фрагментов в 3% агарозном геле при 130 V в буфере ТАЕ с добавлением бромистого димидия до конечной концентрации 30 нг/мл и визуализации фрагментов под ультрафиолетовым светом.

Амплификация проводится при помощи праймеров:

CSN15'-TGAAAGCCAGAGC-3'

CSN25'-TGAAGGCCAGAGC-3'

После рестрикции, в зависимости от генотипа животного, образуются фрагменты 101, 76 и 25 п.о., при этом фрагменты длиной 76 и 25 п.о. соответствуют аллелю А, а 101 – аллелю В.

Бета-лактоглобулин-серосодержащий белок, который в отличие от казеина не осаждается сычужным ферментом. Биологическая функция его состоит в транспортировке витамина А.

Отличия аллеля А от В определяются в аминокислотной позиции 64 (Asp в А, Gly в В) и в позиции 118 (Val в А, Ala в В) и идентифицируется с помощью эндонуклеазы Hae III.

Используются праймеры:

B-Lg 2 5'-GCTCCCGGTATATGACCACCCCT-3'

B-Lg 1 5'-TGTGCTGGACACCGACTACAAAAAG-3'

Из полученных данных следует, что частота аллеля А выше по сравнению с аллелем В в локусах кальпа-казеина, бета-казеина, бета-лактоглобулина (0,61, 0,66 и 0,84 соответственно) (рис.12)

Рис. 12

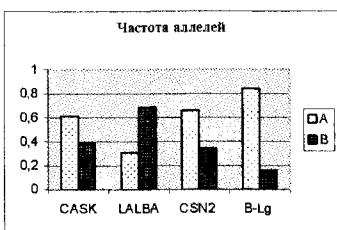
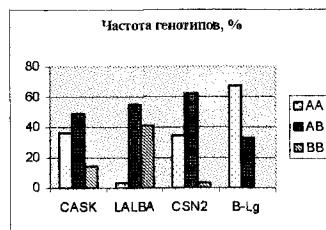


Рис.13



В большинстве рассмотренных локусов наблюдается значительное преобладание животных с генотипом АВ от 49,2 % до 62,3%. По гену B-Lg преимущество генотипа АВ мало выражено, его частота в исследуемой группе быков составляет 32,8% (рис.13).

Частоты аллелей и генотипа гена GH (гормон роста) у быков ярославской породы представлены в таблице 12. У исследованных животных наблюдается преобладание аллеля GH^L (0,74) и генотипа GH^{LL} (53,1%).

Избыток гетерозигот выявлен только по белку бета-казеина АВ ($P \leq 0,05$). В остальных локусах наблюдаемое расщепление соответствует ожидаемому.

Наивысшая степень генетической вариабельности наблюдается по локусу альфа-лактальбумина (44,9%), наименьшая изменчивость генотипа отмечена по белку B-Lg (5,5%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из основных направлений в этой работе является анализ генов, позволяющий маркировать локусы количественных признаков ивести селекцию с помощью маркеров.

Выявление уникальных по изученным показателям животных, дальнейшее использование их в воспроизводстве для генетических корректур специализированных пород, несомненно, актуально имеют большое научное и практическое значение.

Проведенные исследования выявили возможность совершенствования изучаемой породы крупного рогатого скота с использованием ДНК – маркеров по генам каппа-казеина, бета-казеин, альфа-лактальбумин, бета-лактоглобулина, пролактина и соматотропина. Накопление в стадах животных с желательными генотипами будет способствовать увеличению молочной продуктивности коров и улучшению качества молока.

На основе такой информации можно направленно формировать генофонды с необходимыми генными сочетаниями.

Таблица 12

Полиморфизм генов быкпроизводящей группы ОАО «Ярославское» по различным локусам

Наименование	Локусы										GH (гормон роста)	
	CASK (каппа-казеин)			LALBA (альфа-лактальбумин)			CSN2 (бета-казеин)			B-Lg (бета-лактоглобулин)		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	VV
Частота генотипа, %	36,3	49,2	14,5	3,3	55,3	41,4	34,4	62,3	3,3	67,2	32,8	-
Частота аллелей	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	L	V
Ожидаемая гетерозиготность (He), %	0,61±0,03	0,39±0,03	0,31±0,03	0,69±0,03	0,66±0,03	0,34±0,03	0,84±0,03	0,16±0,03	0,74±0,03	0,26±0,03		
(X ²)	0,054			3,65			6,75			1,29		0,22
Коэффициент вариации (CV), %	33,4			44,9			17			5,5		21,7

ЛИТЕРАТУРА

1. Айла Ф. Введение в популяционную генетику. М.: Мир, 1984.- 230 с.
2. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.:Наука, 1989. 431 с.
3. Зиновьева Н.А., Попов А.Н., Эрнст Л.К., Марзанов Н.С., Бочкарев В.В., Стрекозов Н.И., Брем Г Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве, Дубровицы, 1998.-47 с.
4. Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А., Фролкин Д.А., Арсиенко Р.Ю., Зыкунов Н., Шмаков Ю.И., Костюнина О.В., Карамчакова О.Н., Эрнст Л.К. Применение ДНК диагностики для анализа генов кандидатов локусов количественных признаков сельскохозяйственных животных //Животноводство – 21 век /Научные труды ВИЖа - Дубровицы, - 2001, выпуск 61, с.218-224
5. Иолчиев Б.С., Еремина М. Использование полиморфных систем белков молока в селекции//Молочное и мясное скотоводство. – 1996. - № 2.- с.20-23.
6. Калашникова Л.А. и др. ДНК-технология оценки сельскохозяйственных животных. Лесные поляны, 1999.-147 с.
7. Костюнина О.В. Молекулярная диагностика генетического полиморфизма основных молочных белков и их связь с технологическими свойствами молока. Автореферат дисс. к. наук. Дубровицы, 2005.-с.22.
8. Максименко В.Ф. Эффективные приемы и методы селекционно-племенной работы в молочном скотоводстве//Пути повышения

- шения продуктивности ярославского скота/ Сб.научн. трудов,
М., 1991, с. 5-10
9. Меркульева Е.К. Генетические основы селекции в скотоводст-
ве. М., «Колос», 1977.-239 с.
10. Lewin H.A., Schmitt K., Hubert R. et al. Close linkage between
bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes mapping in cattle by sing
sperm typing// Genomics. 1992. V. 13. P. 44-48.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Генотипы быков-производителей ОАО «Ярославское» по племенной работе

№ п/п	Кличка	Инд. №	Линия	Локусы				
				GH (гормон роста)	CASK (кацап- казеин)	LALBA (альфа- лакталь бумин)	CSN2 (бета- казеин)	B-Lg (бета- лакто- глобу- лин)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Анчар	759	Уес Идеал	LL	AA	AB	AA	
2	Азиат	282	Марса	LL	AB	AB	AA	AA
3	Активный	906	Марта	LV	AA	AB	AA	
4	Алмаз	615	Жилета	LL	AB	AB	AB	
5	Алый	251	Мурата	LL	AB	BB	AB	
6	Альбом	917	Мурата	LV	BB	BB	AB	AA
7	Амбар	291	Мурата	LV	AB	BB	AB	AB
8	Арал	636	Жилета	LV	AB	BB	AB	AA
9	Арбат	190	Вольного	LL	AA	AB	AB	AA
10	Аргон	1403	Марта	LL	BB	AB	AA	
11	Аромат	473	Вольного	LV	AB	BB	AA	AA
12	Багор	130	Мурата	LV	AB	AB	AA	
13	Базальт	310	Мурата	LL	AA	AB	AB	AA
14	Берег	451	Магната	LL	AA	AB	AB	
15	Берест	924	Марса	LL	AB		AB	AB
16	Берест	1210	Вольного	LL	AB	AA	AB	
17	Борщ	618	Марта	LV	AB	AB	AA	
18	Бояр	482	Вольного	LV	AA	AB	AB	
19	Буй	1208	Марта	LV	AA	BB	BB	AB
20	Букварь	233	Мурата	LV	BB	AB	AB	AA
21	Валок	1056	Мурата	LL	AA	AB	AB	
22	Валун	516	Мурата	LV				
23	Вальс	928	Доброго	LL	AA	BB	AA	AA
24	Василек	332	Марта	LL	AB	BB	AB	AB
25	Вектор	813	Жилета	LL	AA	AB	AB	
26	Вереск	682	P. Соверинг	LV	AA	AA	AB	AB
27	Вестник	768	Марта	LV	AB	AB	AB	
28	Вечер	1398	P. Соверинг	LL	AA	BB	AB	
29	Викинг	159	M. Чифтейн	LL	AB	AB	AA	
30	Витязь	853	Мурата	LL	AB	BB	AB	AA
31	Водолей	43	P. Соверинг	LL	AA	BB	AA	AA
32	Волшебник	31	M. Чифтейн	LL	AA	AB	AA	AA

1	2	3	4	5	6	7	8	9
33	Ворон	861	Доброго	LV	AA	BB	AB	AA
34	Восток	544	М. Чифтейн	LL	AA	BB	AA	AA
35	Вымпел	362	Мурата	LV	BB	AB	AB	
36	Гамбит	1042	Жилета	LV	AB	BB	AB	
37	Гарт	1190	М. Чифтейн	LL	AA	AB	AB	AA
38	Гарус	1554	Мурата	LV	BB	AB	AA	AB
39	Гвидон	592	Мурата	LV	AA	BB	AA	
40	Гепард	994	Мурата	LL	AB	AA	AA	AA
41	Герб	432	Вольного	LL	AA	AB	AB	AA
42	Гимн	1018	Доброго	LL	AA	AB	BB	
43	Гранат	170	Мурата	LV	AB	AB	AB	
44	Граф	975	Жилета	LV	AB	AB	AA	
45	Грач	44	У. Идеал	LV	AB	BB	AB	
46	Грим	347	Мурата	LV				
47	Грифель	1509	Мурата	LV	AB	AB	AB	
48	Дар	1381	Невода	LL	AA	BB	AB	
49	Дебют	8154	У. Идеал	LV	AB	AB	AA	AA
50	Доллар	1178	Доброго	LL	AB	BB	AB	AA
51	Дрозд	669	Марта	LV	AB	AB	AA	AA
52	Жасмин	6281	P. Соверинг	LV	AA	AB	AB	AB
53	Жук	137	Жилета	LL	AA	AB	AB	AA
54	Журик	820	Жилета	LL	AB	AB		
55	Забавник	917	Марта	LV	BB	AB	AB	
56	Забой	764	Марта	LL	BB	BB	AB	
57	Заветный	59	Марта	LV	AB	AB	AB	
58	Завиток	116	Марса	LL	AA	AB	AA	
59	Заказ	219	Марта	LL	AB	BB	AB	
60	Залив	897	Вольного	LL				
61	Заслон	383	Мурата	VV	AA	BB	AA	
62	Зверобой	33	Вольного	LL	AB	AB	AB	AB
63	Зевс	1155	У. Идеал	LL	AA	AB	AA	AA
64	Зенит	608	Мурата	LL	AB	BB	AA	AA
65	Зефир	658	М. Чифтейн	LL	AB	BB	BB	AA
66	Зир	1252	Жилета	VV	AB	AB	AB	
67	Злак	221	Мурата	LV	BB	BB	AB	AA
68	Зов	31	Мурата	LV	AB	AB	AB	
69	Золотой	859	Вольного	LL	BB	AB	AA	
70	Зоркий	153	Марта	LL	AB	AB	AB	AB
71	Кедр	82	Марта	LV	AA	AB	AA	
72	Кольт	999	У. Идеал	LL	AB	AB	AB	AA
73	Контур	1080	Вольного	LV	AA	AB	AB	AB
74	Корсар	751	Жилета	LL	AB	AB	AA	
75	Кремень	1315	Жилета	LV	AB	AB	AA	AA
76	Лавр	1301	Доброго	LL	AA	BB	AB	AB

1	2	3	4	5	6	7	8	9
77	Лазурит	6220	М. Чифтени	LL	AA	AB	AA	AA
78	Лель	1055	Чародея	LV	AA	BB	AA	AB
79	Ленок	747	Магната	LL	BB	BB	AB	AA
80	Лоск	1089	Марса	LL	AA	AB	AB	
81	Мазай	409	Марта	LV	BB	AB	AB	AA
82	Маис	821	М. Чифтейн	LL	AB	AB	AA	AA
83	Мак	195	У. Идеал	LL	AA	AB	AB	AA
84	Маркиз	190	Доброго	LL	AB	BB	AA	AA
85	Марсель	223	Вольного	VV	AB	AB	AA	
86	Маун	561	Жилета	LV	AB	BB	AB	AA
87	Медный	1090	Марса	LL	AA	BB	AA	
88	Медок	240	Невода	LV	AA	BB	AB	AB
89	Медяк	973	Доброго	LL	AB	AB	AA	
90	Меткий	492	Чародея	LL	AB	BB	AB	AA
91	Милок	235	Магната	LV	AB	AA	AA	
92	Милорд	51	М. Чифтеин	LL	AB	BB	AA	
93	Момент	528	Доброго	LV	AB	BB	AB	AB
94	Москвич	205	Мурата	VV	AB	AB	AB	AA
95	Мухомор	180	Невода	LV	AA	AB	AA	
96	Надменный	596	Марта	LV	BB	BB	AB	AB
97	Налет	1160	Вольного	VV	AB	AB	AB	AA
98	Напев	174	Мурата	LL	AA	AB	AB	
99	Наряд	226	Марса	LV	AB	AB	AB	AA
100	Наследник	307	Вольного	LV	AB	AB	AA	AB
101	Наст	611	Вольного	LV	AB	AB	AB	AA
102	Небосвод	1171	Мурата	LL	BB	AB	AB	AB
103	Нежник	1399	Марса	LL	BB	BB	AA	AA
104	Нептун	25	Мурата	LL	AA	BB	AA	AB
105	Нерест	605	Мурата	LL	AB	BB	AB	AB
106	Никель	146	Марта	LL	AB	AB	AB	
107	Нож	525	Доброго	LV	BB	BB	AB	AB
108	Номер	497	Жилета	LV	AA	BB	AB	AB
109	Нотник	1319	Вольного	LL	AB	AB	AA	AA
110	Ободок	1010	Марса	VV	AB	AB	AB	AA
111	Певец	609	Жилета	VV	AB	BB	AB	AB
112	Повар	1220	Жилета	LL	BB	AB	BB	AA
113	Разрыв	477	Вольного	LV	AB	AB	AA	
114	Реликт	7175	У. Идеал	LL	AA	AB	AB	AA
115	Родник	550	Мурата	LV	AB	BB	AB	AA
116	Рубин	7177	P.Соверинг	LL	AA	AB	AB	AA
117	Сазан	495	Марта	LV	AA	BB	AB	AB
118	Сапфир	440	Жилета	LV				
119	Секрет	61	Чародея	LL	AB	BB	AB	
120	Сенатор	434	Доброго	LV	AB	BB	AB	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
121	Славный	1366	Род. гр 838	LL	AA	BB	AA	AA
122	Смычок	249	Марта	LV	AB	BB	AB	
123	Снежный	85	Доброго	LL	BB	AB	AB	AA
124	Соловей	318	Жилета	LL	AA	AB	AB	AA
125	Старт	207	Марта	LL	BB	BB	AB	AB
126	Франк	3798	М. Чифтейн	LV	AA	BB	AB	AA
127	Ярославич	116	Марса	LL	AB	BB		
128	Ясень	240	Вольного	LL	AB	BB	AB	

ОБОРУДОВАНИЕ

1. Центрифуга с охлаждением (например, тип К23Д, К70Д).
2. Микроцентрифуга типа «Эплендорф» (MF-07).
3. Скоростная микроцентрифуга с охлаждением 15-20 тыс. об/мин.
4. Весы технические.
5. pH- метр 150-МА.
6. Амплификатор AMPLY-4.
7. Термостат.
8. Электрофорезная камера SE-2
9. Источник напряжения НИП 300.
10. Трансиллюминатор UVT-1.
11. Морозильная камера.
12. Электрическая плитка закрытая.
13. УФ-лампа.
14. Одноканальные микродозаторы на 1000-5000 мкл, 100-1000 мкл, 200 -50 мкл, 50-20 мкл, 0,5-10 мкл.
15. Пробирки типа «Эплендорф» 1,5 мл, 600 мкл.
16. Наконечники на 500 мкл, 1000 мкл, 5 мл.
17. Перчатки резиновые; перчатки одноразовые стерильные.

РАСТВОРЫ

В ходе анализа используют рабочие растворы реагентов, приготовленные из концентрированных (маточных) растворов.

Растворы для выделения лейкоцитов

0,5 М ЭДТА pH 8,0. Взвешиваем 186,1 г двухзамещенной соли ЭДТА 2 H₂O. Приливаем 800 мл дистиллированной воды. Интенсивно размешать на магнитной мешалке не более 15 минут, до однородного состояния. Довести pH раствора до 8,0 путем добавления NaOH (20-40 г), добавлять постепенно малыми порциями, щелочь нужно предварительно растворить в 100 мл дистиллированной воды (pH проверять лакмусовой бумажкой). Динатриевая соль не будет растворяться до тех пор, пока pH не будет равен 8,0. Полученный раствор разливают на порции и стерилизуют автоклавированием (режим физиологического раствора) хранят при 4°C.

1М Трис-HCl pH 7,6. Растворите 121,1 г триса в 800 мл дистиллированной воды. Доведите pH до необходимого значения добавлением концентрированной соляной кислоты (HCl). Для достижения pH 7,6, необходимо добавлять постепенно при перемешивании приблизительно 60 мл конц. HCl. Полученный раствор стерилизуют автоклавированием. Работать необходимо под вытяжкой. Хранить реагент при 4°C.

Рабочие растворы для выделения ДНК

Буфер 1x TE 1) 100 мл маточного раствора TE, развести в 900 мл дистиллированной воды.

2) растворяют 10 мл 1M Трис-HCl pH 7,6 2 мл 0,5M ЭДТА pH 8,0 в 988 мл дистиллированной воды.

0,1 мМ ЭДТА. Растворяют 200 мкл маточного раствора 0,5 М ЭДТА (рН 8,0) в 1л дистиллированной воды.

Фенол насыщенный готовят непосредственно перед проведением анализа на необходимый объем (например, на 10 проб) Разогретый фенол до полного растворения в объеме 10 мл смешивают с 10 мл (равным объемом) 0,1 м Трис HCl, выдерживая соотношение 1:1. Далее рН полученного раствора доводят 0,5 М раствором Na OH до значения рН 7,5-8,0. При насыщении раствора происходит разделение на 2 фракции: верхняя - Трис HCl, нижняя фракция - насыщенный фенол.

0,1M Трис HCl готовится путем разведения 1 мл 1M Трис HCl в 10 мл дистиллированной воды перед использованием.

1M Трис HCl навеска Трис HCl 1,21 г вносится в колбу на 50-100 мл.Добавляют 9 мл дистиллированной воды и аккуратно смешивается до полного растворения реактива. Далее рН раствора титруется соляной кислотой (HCl) до pH 7,5-8,0. Хранится в холодильнике.

Хлороформ : изоамиловый спирт (CIA) готовят путем смешивания равных объемов, соотношение 24:1 (хлороформ и изоамиловый спирт). Работают в вытяжном шкафу. Реагент хранят в холодильнике с притертой крышкой.

Этиловый спирт 70° 50 (мл) 36,45 мл 96° этилового спирта растворяют в 13,55 мл дистиллированной воды. Точность разведения проверяют по значению спиртометра.

Растворы для проведения электрофореза

Буфер 1xTAE: рабочий раствор 1xTAE (0,04 М трис-ацетат; 0,002 М ЭДТА) готовиться из маточного раствора путем разведения 20 мл маточного раствора в 900 мл дистиллированной воды.

Приготовление маточного раствора ТАЕ 50x: раствор получают путем растворения навески Трис-НСl количеством 242г. Навеску вносят в химически чистую колбу на 1000 мл круглодонную, туда же вносят 800 мл дистиллированной воды, размешивают. Вливают ледянную уксусную кислоту 57 мл, 0,5 ЭДТА с pH 8,0 100 мл, размешивают. Реагент хранят в холодильнике.

Примечание: Допускается хранение в темном стекле растворов 1xTAE или 1xTBE, 10% раствора этидиума бромида при комнатной температуре.

Бромистый этидий. 10 мг/мл. Добавьте 1 г бромистого этидия к 100 мл дистиллированной воды. Размешивайте на магнитной мешалке несколько часов, пока краситель не растворится. Заверните колбу в алюминиевую фольгу или перелейте в темную склянку и храните при 4°C. Бромистый этидий - мутаген. При взвешивании наденьте перчатки и маску.

Раствор бромфенолового синего (20 мл). 50 г бромфенолового синего разводят 14 мл дистиллированной воды, далее вносят глицерин 6 мл, или фикол.

Растворы для электрофореза

Для оценки качества ПЦР - реакции и результатов рестрикции методом электрофореза используют 1,5%, 2%, 4%, 5% агарозный гель.

2% агарозный гель. Растворяют 2,25 г агарозы в 125 мл 1x TAE. Нагревают до 100°C для растворения агарозы, при равномерном помешивании до однородного густого состояния на закрытой электроплитке. Охлаждается медленно до 40°C -50°C. Полученный гель окрашивается этидиум бромидом. Раствор красителя вносится в гель сразу же после охлаждения до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, перемешивается. Полу-

ченным раствором геля заливается специальная электрофоретическая кювета. На расстоянии 1 см от одного из концов кюветы устанавливается гребенка для формирования лунок. Камеру оставляют в строго горизонтальном положении до полного застывания геля при комнатной температуре (от 30-40 минут). Гелевые полоски готовы для проведения электрофореза.

Примечание: для приготовления 3%, 4%, 5% геля берут соответственно 3,7 г; 5 г; 6,2 г агарозы соответственно, необходимое количество растворяют в 125 мл 1x TAE. Далее приготовление проводят аналогично 2% геля. Гель можно хранить в 1x TAE при температуре 4°C не более 1 месяца.