

Продолжение таблицы 2

1	2
Виолетта дигаплоид №1	3,17
Виолетта дигаплоид №1а	1,86
Виолетта дигаплоид №2	3,64
Виолетта дигаплоид №2а	3,54
Виолетта дигаплоид №3	2,33
Виолетта дигаплоид №3а	2,24
Виолетта дигаплоид №4	5,32
Виолетта дигаплоид №4а	2,52
Виолетта дигаплоид №5	4,10
Виолетта дигаплоид №5а	2,80
Виолетта дигаплоид №6	2,52
Виолетта дигаплоид №6а	3,17
Виолетта дигаплоид №7	3,92
Виолетта дигаплоид №7а	4,5

Таким образом, в ходе проведенных работ по оптимизации получения глютинозных дигаплоидов в культуре пыльников впервые созданы перспективные линии с низким содержанием амилозы (от 1,86 до 3,17%), как исходного материала в селекции первого казахстанского глютинозного сорта.

Авторы выражают благодарность заведующему лаборатории исходного материала ВНИИ риса РАСХН, автору глютинозного сорта «Виолетта» доктору сельскохозяйственных наук, профессору Зеленскому Г.Л. за любезно предоставленный исходный материал.

#### Литература

- 1 Sano Y. Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm // Theor. Appl. Genet. -1984.-V68.-P.467-473.
- 2 Зеленский Г.Л., Туманьян Н.Г., Лоточникова Т.Н., Лоточников С.В., Ефименко С.Г. Эксклюзивные сорта в селекции ВНИИ риса. Рисоводство. - 2004.- №4. - С.20-23.
- 3 Научные основы и практика рисоводства в Казахстане / Сборник статей. Отв. редакторы: Л.К. Мамонов, Б.А. Сарсенбаев. Алматы: «Тоганай Т», 2012. - 320 с.
- 4 Silva and WJ Ratnayake. Anther culture potencial of indica rice varieties, Kurulu thuda and BG 250 TD // Tropical Agricultural Research & Extension 12(2): 2009. - P.53-56.
- 5 Рахимбаев И.Р., Тивари Ш., Кударов Б.Р. Экспериментальная гаплоидия в культуре пыльников и микроспор зерновых злаков // Сельскохозяйственная биотехнология. - 1990. - №3. - С.44-55.
- 6 Булатова К.М. Изучение компонентного состава глютеина пшеницы // Вестник с.-х. науки Казахстана. - 1985, №4. - С.37-39.
- 7 Гончарова Ю.К. Использование метода культуры пыльников в селекции риса. - Краснодар, 2012. - 91 с.

УДК 636.22/28.082.12

Е.С. Усенбеков\*<sup>1</sup>, О.О. Жансеркенова<sup>1</sup>, Ш.Н. Касымбекова<sup>1</sup>, М.Д. Кенешбаев<sup>1</sup>, А.А. Спанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казахский национальный аграрный университет, г. Алматы, Казахстан

<sup>2</sup>Казахский НИИ животноводства и кормопроизводства, г. Алматы, Казахстан

\*e-mail: [usen03@mail.ru](mailto:usen03@mail.ru)

### Использование пятна крови для проведения полимеразной цепной реакции и генотипирование предимплантационных эмбрионов

В данной статье рассматривается возможность применения метода полимеразной цепной реакции в сочетании с ПДРФ анализом для генотипирования предимплантационных эмбрионов коров на наличие таких генетических дефектов, как BLAD и Citrullinemia. В опытах в качестве источника ДНК, авторы использовали пятно крови, высушенное на фильтровальной бумаге для амплификации нужного фрагмента гена. Применение указанных методов позволяет в течение 4-5 часов провести тестирование эмбрионов и племенных животных методом ПЦР.

**Ключевые слова:** предимплантационные эмбрионы, летальная аутосомальная рецессивная мутация, BLAD, Citrullinemia, ПЦР, электрофорез, пятно крови.

E.S. Usenbekov, O.O. Zhanserkenova, Sh.N. Kasymbekova, M.D. Keneshbaev, A.A. Spanov

Вестник КазНУ. Серия биологическая. №3/1(59). 2013

### Using a stain of blood for polymerase chain reaction and genotyping of preimplantation embryos

This article discusses the possibility of using the polymerase chain reaction in combination with RFLP analysis for genotyping of preimplantation embryos of cows for the presence of such genetic defects as BLAD and Citrullinemia. In the experiments as a source of DNA, the authors used a stain of blood dried on filter paper for the amplification of the desired gene fragment. Application of these methods allows for 4-5 hours to test embryos and breeding animals by PCR.

**Keywords:** preimplantation embryos, letal autosomal recessive mutation, BLAD, Citrullinemia, PCR, electrophoresis, a stain of blood.

Е.С. Усенбеков, О.О. Жансеркенова, Ш.Н. Касымбекова, М.Д. Кенешбаев, А.А. Спанов

#### Полимеразды тізбекті реакцияны жүргізу үшін қан дағын пайдалану және имплантация алдындағы эмбриондарды генотиптеу

Мақалада имплантация алдындағы сиырдың эмбриондарын генетикалық кемтарлықтарға, BLAD және Citrullinemia ауруларына полимераздық тізбек реакциясы мен рестрикциялық фрагменттер ұзындықтарының полимерфизмін пайдалану мүмкіндігі қарастырылған. Сонымен қатар, қажетті геннің фрагментін амплификациялау үшін сүзгі қағазға кептірілген қан дағы пайдаланылған. Аталған әдістерді пайдалана отырып 4-5 сағат ішінде эмбриондар мен асыл тұқымды жануарларды генетикалық кемтарлықтарға тексеруге болады.

**Түйінк сөздер:** имплантация алдындағы эмбриондар, летальді аутосомдық рецессивті мутация, BLAD, Citrullinemia, ПТР, электрофорез, қан дағы.

Использование искусственного осеменения и трансплантации эмбрионов значительно повысило роль одного животного в распространении определенных полиморфных типов генов и генетических дефектов. Это приводит, с одной стороны, к снижению гетерозиготности стада, с другой - к насыщению популяций летальными мутациями. Поэтому возникла необходимость более широкого использования молекулярно-генетических маркеров как инструмента для решения некоторых селекционных задач [1, 2].

Определение носителей мутаций очень важно для племенных хозяйств. Продажи племенных бычков невозможны без тестирования на летальные мутации. Тестирование коров и телок также необходимо для снижения затрат на осеменение и выращивание молодняка. Все наследственные заболевания крупного рогатого скота в той или иной степени связаны с нарушением репродуктивной функции у коров, снижением резистентности организма телят, у носителей мутации генетического дефекта часто регистрируются эмбриональная смертность, повышение индекса осеменения в результате ранней смертности предимплантационных эмбрионов в период беременности.

Так, наследственное заболевание крупного рогатого скота, дефицит лейкоцитарной адгезии, BLAD (bovine leukocyte adhesion deficiency) сопровождается снижением иммунитета телят, предрасположенностью молодняка к бактериальным инфекциям. По данным различных авторов данный генетический дефект наносит большой экономический ущерб животноводству. Комплексное уродство позвоночника у крупного рогатого скота, CVM, (complex vertebral malformation) как летальная аутосомальная рецессивная наследственная болезнь впервые была описана в 2001 году американским ученым Agerholm J.S. [3].

Citrullinemia – это врожденное нарушение обмена веществ из-за дефицита фермента цикла мочевины, аргининсукцинат синтетазы (L-citrulline: L-aspartate ligase). Эта болезнь была впервые описана у людей, но относительно недавно установлена у молочного скота Австралии. Обычно больные гомозиготные по гену *citrullinemia* телята рождаются нормальными, но на второй и третий день они становятся вялыми, отмечают признаки депрессии и снижается аппетит. Такие животные погибают на 7-й день после рождения с клиническими признаками коллапс, слепота и резкое ухудшение состояние больного животного. Анализ последовательности гена **ASAS** показал, что нуклеотидная замена С на Т является причиной точечной мутации у крупного рогатого скота. Известно, что у животных носителей мутации Citrullinemia исчезает сайт рестрикции для эндонуклеазы Ava II и этот полиморфизм используется для ПЦР диагностики [4, 5].

Обычно ПЦР диагностика племенных животных осуществляется с помощью ПДРФ-ПЦР анализа, где предусмотрено выделение ДНК из различных биологических материалов с помощью набора. Нами, использовано для проведения полимеразной цепной реакции пятно крови для генотипирования по локусам летальных аутосомальных рецессивных мутации у племенных животных. Данный способ позволяет без выделения ДНК провести тестирование животных.

В настоящее время во всех развитых странах широко используются современные биотехнологические приемы воспроизводства животных, такие как, трансплантация эмбрионов, применение экстракорпорального оплодотворения ооцитов – *in vitro*, аспирация ооцитов у высокопродуктивных коров методом Ovum Pick Up – OPU. В связи этим, появляется необходимость генотипирования предимплантационных эмбрионов, ооцитов, наряду с племенными животными, с целью своевременного выявления носителей летальных генетических дефектов у эмбрионов.

Анализ зарубежной литературы показывает, что в настоящее время для определения пола эмбриона успешно используется метод полимеразной цепной реакции с полспецифическими праймерами. Также проводят генотипирование предимплантационных эмбрионов по типам белков молока, проверяют предимплантационных эмбрионов на наличие генетических дефектов методом ПЦР-ПДРФ анализа.

### Материалы и методы

Для исследования животных, обычно используют замороженные спермы быков-производителей или образцы крови. В наших экспериментах, мы в качестве источника ДНК использовали пятно крови, высушенное на фильтровальной бумаге. Брали соскоб из пятна крови и помещали в реакционную среду конечного объема 50 мкл, содержащую 5 мкл 10 X буфера для ПЦР, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 мкл 25 мкМ прямого и обратного праймеров, 4 мкл 0,2 mM концентрации каждого dNTP, 0,4 мкл фермента Taq Polymerase с активностью 5u/μl, 38,0 мкл дистиллированной воды. В качестве положительного контроля для амплификации использовали ДНК, выделенную из спермы того же животного. Условия проведения полимеразной цепной реакции: первый шаг – денатурация ДНК при температуре 97<sup>0</sup>C – 7 минут, второй шаг – денатурация при 94<sup>0</sup>C – 45 сек, отжиг праймеров – 62<sup>0</sup>C 45 сек и элонгация при температуре 72<sup>0</sup>C – 45 сек. Завершающий синтез при 72<sup>0</sup>C с продолжительностью 2 мин. Хранение при +4<sup>0</sup>C.

Замороженные эмбрионы для проведения эксперимента по определению генетических дефектов методом ПЦР-ПДРФ анализа были предоставлены КазНИИ животноводства и кормопроизводства.

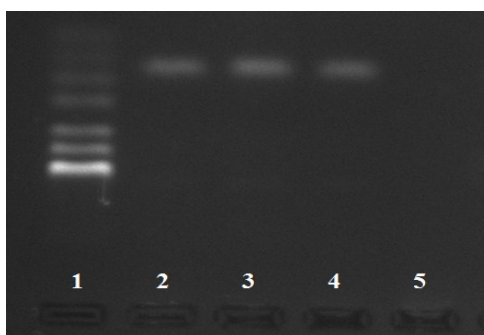
### Результаты и их обсуждение

Готовили лизирующий буфер следующего состава: 15 mM Tris HCl, pH 8,9, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1%. Triton x 100, 150 мг/мл протеиназы К. В первой серии опытов использовали для определения генотипа эмбрионов по локусу BLAD целые эмбрионы. Во второй серии опытов были использованы половинки эмбрионов - одна половина для определения точечной мутации гена CD 18 и вторая половина – для генотипирования по локусу Citrullinemia. В последующих опытах в качестве матрицы ДНК были использованы 3-4 бластомера, в качестве положительного контроля во всех опытах была использована ДНК, выделенная из спермы, а в качестве отрицательного контроля – дистиллированная вода. Определение генотипа предимплантационных эмбрионов методом полимеразной цепной реакции занимало не более 5-6 часов. С целью приготовления лизата, эмбрионы, полужембрионы или 3-4 бластомера помещали в пробирку, содержащую 50 мкл лизирующего буфера с составом: 15мМ Tris HCl, pH 8,9, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton x 100, 150 мг/мл протеиназы К и инкубировали в течение 30-60 минут при температуре 37<sup>0</sup>C. Бисекцию эмбриона проводили под микроскопом МСП 1 вариант 2. Денатурацию протеиназы К осуществляли при 99<sup>0</sup>C в течение 8 мин.

Полимеразную цепную реакцию проводили на термоциклере «Терцик» производства России, который имеет четыре блока по 10 ячеек в каждом блоке. Для выявления полиморфизма гена CD 18 мы использовали следующие праймеры: прямой праймер 5'- AGGCAGTTGCGTTCAATGTGA - 3' и обратный праймер 5'- CCGACTCGGTGATGCCATTGA- 3'. Специфические праймеры были синтезированы лабораторией Applied Biosystems. Использование данной пары праймеров позволяет амплифицировать 159 пар нуклеотидов фрагмента гена CD 18.

Объем реакционной смеси был 50 мкл, имеющий следующий состав: 5 мкл 10 X буфера для ПЦР, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мкл 25 мкМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл 0,2 mM концентрации каждого dNTP, 0,5 мкл фермента Taq Polymerase с активностью 5u/μl, 5 мкл ДНК и 26,5 мкл дистиллированной воды. Амплификацию проводили в режиме: денатурация 95<sup>0</sup>C 180", отжиг праймеров 55<sup>0</sup>C 300" и элонгация 73<sup>0</sup>C 300" и последующие 35 циклов 94<sup>0</sup>C-55<sup>0</sup>C-73<sup>0</sup>C, 45:50:60 сек. Наличие фрагментов длиной 159 п.о. и 180 пар нуклеотидов свидетельствовало об успешной амплификации.

Продолжительность амплификации составила 35-40 циклов, после окончания амплификации готовили 3% агарозу и заливали гель. В каждую лунку агарозного геля внесли по 7 мкл амплификата, а в первую лунку в качестве ДНК маркера, рUC19DNA рестрицированная рестриктазой MspI. Данный маркер имеет, фрагментов длиной 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34, 34 пар нуклеотидов. Продукт амплификации подвергали электрофорезу при режиме: напряжение 180 В, сила тока 150 мА, мощность 50 Вт и продолжительность 45-60 минут. В случае успешной амплификации, на электрофореграмме хорошо видно бэнд размером 159 п.н. (рисунок 1). В настоящее время существуют разные способы выделения ДНК из биологических материалов для амплификации. Самым простым, доступным способом выделения ДНК является метод выделения ДНК с помощью фенол-хлороформ-изоамилового спирта, но этот метод представляет определенную опасность для здоровья исследователя. Выделение ДНК из биологических материалов с помощью автоматических станции процедура дорогостоящая, требует использование расходных материалов. Применение пятна крови для проведения полимеразной цепной реакции является простым и доступным способом.



Лунки: 1 – маркер рUC19DNA/ MspI; 2,3,4 – амплификат, 5 – отрицательный контроль  
**Рисунок 1** – Электрофореграмма амплификата гена CD 18, длина амплификата 159 п.н.

Существующие молекулярно-генетические методы позволяют в течение 3-4 часов провести генотипирование эмбрионов при проведении работы по пересадке зародышей сельскохозяйственных животных. Нами для генотипирования предимплантационных эмбрионов коров на наличие генетических дефектов был использован метод полимеразной цепной реакции в сочетании с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов.

Применение пятна крови для амплификации нужного участка гена при генотипировании племенных животных является быстрым и доступным способом. С помощью полимеразной цепной реакции и ПДРФ анализа можно сертифицировать предимплантационные эмбрионы на наличие вредных летальных рецессивных мутации.

#### Литература

- 1 Яковлев А.Ф., Прохоренко П.Н. Современные тенденции использования генетики в животноводстве // Вестник РАСХН. – 1997. – № 2. – С. 56-59.
- 2 Марзанов Н.С., Ескин Г.В., Турбина И.С., Девришев Д.А., Тохов М.Х., Марзанова С.Н. Генодиагностика и распространение аллеля иммунодефицита, или BLAD синдрома, у черно-пестрой породы крупного рогатого скота. – Москва, 2013. – С. 12-15.
- 3 Agerholm J.S. Inherited disorders in Danish cattle // APMIS. – 2007. – V.122. – P.21-22.
- 4 Meydan H., Mehmet Y., Agerholm J. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey // Acta Veterinaria Scandinavica. – 2010. – P. 52-56.
- 5 Grupe S., Diet G., Schwerin M. Population survey of citrullinemia on German Holsteins // Livestock Prod. Sci. – 1996. – V. 45. – P. 35-38.