

СЕКЦИЯ 2

ГЕНЕТИКА И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ, ЖИВОТНЫХ И МИКРООРГАНИЗМОВ

Подсекция 2.2. Генетика и селекция животных

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАРКЕРНОГО ГЕНА RYR1 ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СТРЕССУСТОЙЧИВОСТИ У ЛОШАДЕЙ

В.П. Емельянова, Л.А. Баранова

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
r344@biobel.bas-net.by*

Воздействие различных стрессовых факторов на организм животных вызывает напряжение адаптационных механизмов, что приводит к понижению неспецифической резистентности организма, а также к угнетению функций, связанных с воспроизводительной и продуктивной способностями. При продолжительном стрессе в организме животного развиваются функциональные сдвиги, приводящие к глубоким дистрофическим нарушениям, необратимым изменениям процессов обмена веществ и, в конечном счете, гибели животного.

Активно развивающееся спортивное коневодство также столкнулось с проблемой стрессустойчивости лошадей. Для участия в соревнованиях высокого ранга лошадей интенсивно тренируют. Кроме того, участие в соревнованиях само по себе является сильнейшим стрессом для животных и в практике нередко случаи гибели лошадей не только во время соревнований, но и при транспортировке и ветеринарном осмотре.

Если проблеме стресса в свиноводстве посвящено большое количество исследований, то в коневодстве данная проблема практически не изучена. В первую очередь это указывает на отсутствие надежных способов диагностики наследственного заболевания злокачественной гипертермией, ассоциированного со стрессустойчивостью и являющегося следствием мутации в рианодин-рецепторном гене RYR1. Кроме того, высокая стоимость, длительный процесс исследования, слабая кооперация селекционеров, длительная беременность лошадей ограничивает во многих случаях изучение их наследственных заболеваний. Чтобы изучать наследственные изменения лошадей, было бы идеальным, идентифицировать стресс-чувствительных особей для исследования наследственности и скрининга их потомства. С развитием молекулярной генетики и ПЦР-ПДРФ анализа стало возможным идентификация мутации в гене RYR1 у различных сельскохозяйственных животных. Генетическая детерминированность злокачественной гипертермии, ассоциированной со стрессустойчивостью, подтверждена у человека, свиней и собак [4, 5, 6].

В настоящее время диагностика MHS у лошадей основана на характерных клинических проявлениях при использовании галатанового теста, либо специального теста на мышечную сократимость (IVCT) [7]. В биоптатах мышц определяют пороговую концентрацию кофеина и галотана, вызывающую сокращение мышцы и ее максимальное сокращение в ответ на действие вышеуказанных препаратов. При этом надо отметить, что большинство гистологических тестов не выявляют нарушений при данном заболевании [8]. Таким образом, для быстрого и эффективного тестирования лошадей на чувствительность к стрессу необходим метод молекулярно-генетической диагностики злокачественного синдрома (MHS).

В контексте вышесказанного, целью наших исследований является использование генетического маркера для диагностики лошадей на устойчивость к стрессу. Исследование галотанового локуса позволило выявить аналогичные участки кДНК гена RYR1 у лошадей, человека и некоторых млекопитающих и подобрать на их основе последовательность

специфических праймеров для ПЦР-анализа гена RYR1 в тканях лошадей. Оптимизирован и отработан метода ПДРФ для диагностирования точковой мутация по гену RYR1 у лошадей.

Для отработки метода ПЦР-ПДРФ по типированию аллелей гена RYR1 лошадей, ассоциированного со стрессчувствительностью, в качестве матрицы использовали геномную ДНК (гДНК), выделенную из ткани ушей. Для устранения неспецифической амплификации оптимизировали условия при различных концентрациях $MgCl_2$, при разных температурах отжига и различных буферных системах. Оптимальными концентрациями $MgCl_2$ для праймера на 46 экзон являются 2-2,5 мМ. Оптимальная $t_{отж} = 60^\circ C$ (рис. 1).

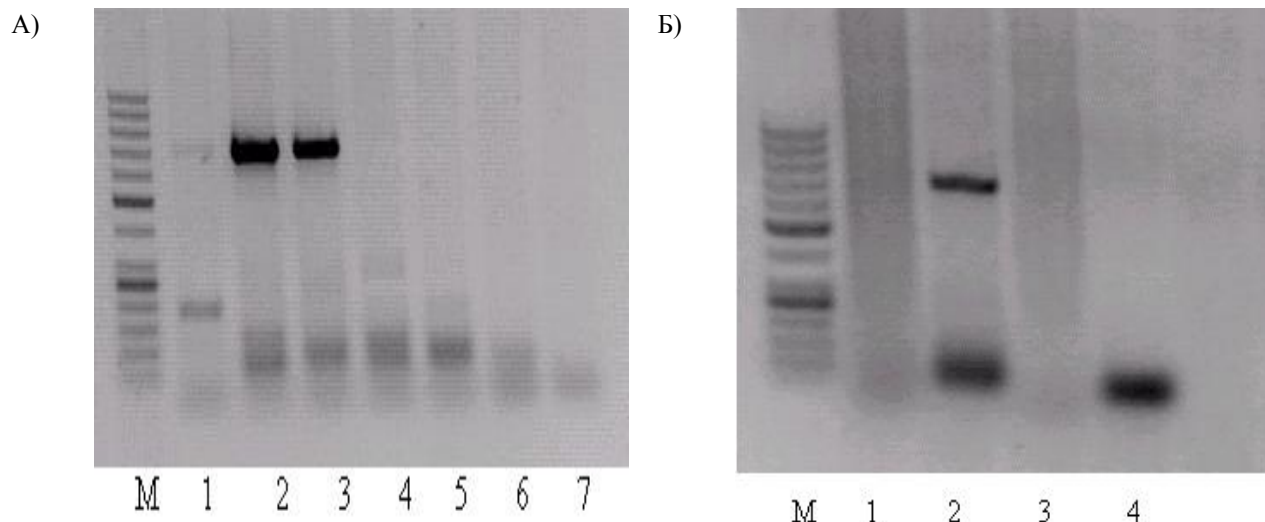


Рис. 1. Оптимизация ПЦР с парой праймеров на 46 экзон. А) Оптимизация ПЦР при различных концентрациях $MgCl_2$. Дорожки 1, 2, 3, 4, 5, 6, - 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ и 4 мМ $MgCl_2$, соответственно. Дорожка М – маркеры размеров линейных фрагментов ДНК. Дорожка 7 – контроль. Б) Оптимизация ПЦР при различных температура отжига. Дорожки 1, 2, 3, 4 – $55^\circ C$, $60^\circ C$, $65^\circ C$ и контроль без ДНК, соответственно. Дорожка М – маркеры размеров линейных фрагментов ДНК.

Точковая мутация в позиции 7360, заменяющая цитозин на гуанин ($C \rightarrow G$), приводит к изменению аминокислотной последовательности, а именно замены аргинина на глицин (R2454G) (рис. 2).

A)

	mPHK		<u>BamH I</u>	
Human	7324	CTAATCCAAGCCGGCAAGGGTGAGGCCCTGCGGATCCGCGCCATCCTCCGCTCCCTTGTGC		7384
Rabbit	7917	CTGATCCAAGCCGGCAAGGGTGAGGCCCTGCGAATCCGCGCCATCCTTCGCTCCCTCGTGC		7978
Pig	7456	CTGATCCAAGCCGGCAAGGGCGAGGCCCTGCGGATCCGTGCCATCCTGCGCTCCCTCGTGC		7517
Dog	1474	CTAATCCAAGCTGGCAAGGGAGAGGCACTGCGGATCCGCGCCATCCTGCGCTCCCTCGTGC		1535
Horse		CTAATCCAAGCCGGCAAAGGCGAAGCTCTGAGGATCCGCGCCATCCTGCGCTCCCGCGTGC		
MH Horse		CTAATCCAAGCCGGCAAAGGCGAAGCTCTGAGGATCGGCGCCATCCTGCGCTCCCGCGTGC		
			↑	

B)

	a. K.		
Human	2442	L I Q A G K G E A L R I R A I L R S L V P L E D L V G I I S L P L Q I P T L G K	
Rabbit	2442	L I Q A G K G E A L R I R A I L R S L V P L D D L V G I I S L P L Q I P T L G K	
Pig	2443	L I Q A G K G E A L R I R A I L R S L V P L D D L V G I I S L P L Q I P T L G K	
Dog	492	L I Q A G K G E A L R I R A I L R S L V P L D D L V G I I S L P L Q I P T L G K	
Horse		L I Q A G K G E A L R I R A I L R S L V P L D D L V G I I S L P L Q I P T L G K	
MH Horse		L I Q A G K G E A L R I G A I L R S L V P L D D L V G I I S L P L Q I P T L G K	
			↑

Рис. 2. Сравнение нуклеотидной (А) и аминокислотной (Б) последовательностей 46 экзона человека, кролика, свиньи, собаки и лошади. Стрелками указаны нуклеотидная (С7360G) и аминокислотная (R2454G) замены.

Мутация гена рианодиневого рецептора (RYR1) вызывает нарушения функции рианодин-чувствительного кальциевого канала саркоплазматического ретикулума

скелетных мышц, что приводит к чрезмерному выбросу кальция в миоплазму и гиперметаболическому состоянию, характеризующемуся повышением температуры, ацидозу, гиперкапнии и во многих случаях к смерти.

Нами проведено ДНК-тестирование по локусу гена RYR1 группы лошадей “Белорусской” упряжной и “Латвийской” верховой пород на стрессчувствительность в количестве 34 голов. Тестирование кобыл на носительство мутации в гене RYR1 выявило 2 особи “Латвийской” верховой, несущие мутантный аллель (генотип RYR1^{Nn}).

Нами отработан метод ПЦР-ПДРФ для оценки полиморфизма гена белка рианодинового рецептора RYR1 у лошадей. Использование данного метода тестирования лошадей на стрессустойчивость позволит при подборе родительских пар исключить возможность получения рецессивных (nn) гомозигот.

1. T. V. McCarthy, J. M. Healy, J. J. Heffron et al. Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2 // *Nature*. – 1990. – V. 343. – P. 562-564.
2. J. Fujii, K. Otsu, F. Zorzato et al. Identification of mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia // *Science*. – 1991. – V. 253. – P. 448-451.
3. M. C. Roberts, J. R. Mickelson, E. E. Patterson et al. Autosomal dominant canine malignant hyperthermia is caused by mutation in the gene encoding the skeletal muscle calcium release channel (RYR1) // *Anesthesiology*. – 2001. – V. 95. – P. 716-725.
4. P. M. Hopkins. Malignant hyperthermia: advances in clinical management and diagnosis // *Br. J. Anaesth.* – 2000. – V. 85. – P. 118-128.
5. D. G. Harriman. Malignant hyperthermia myopathy – a critical review // *Br. J. Anaesth.* – 1988. – V. 60. – P. 309-316.

ПОЛИГЕННЫЙ ХАРАКТЕР ДЕТЕРМИНАЦИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПРИЗНАКОВ СВИНОМАТОК И ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫХ ХРЯКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ БЕЛУРУССКОЙ МЯСНОЙ ПОРОДЫ

О.А. Епишко, Т.И. Епишко, Д.Е. Мостовой

*РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству», Жодино, Беларусь
DNAteh@mail.ru*

Изучена генетическая структура популяции свиноматок и хряков-производителей белорусской мясной породы по генам ESR, PRLR, FSH β и RYR1. Установлено позитивное влияние полиморфных вариантов данных генов на показатели воспроизводительной функции хряков-производителей и репродуктивной свиноматок.

В ходе интенсивного породообразовательного процесса, направленного на создание мясных генотипов свиней, наряду с высокими мясными качествами, животные должны обладать и высокой воспроизводительной функцией. Одним из подходов повышения эффективности селекционной работы является применение ДНК-маркеров, позволяющих вести отбор и подбор родительских форм на генном уровне. В соответствии с положениями популяционной генетики, количественные признаки, к которым относится размер гнезда, обуславливаются комплексом генов, каждый из которых, в большей или меньшей мере оказывает влияние на проявление данного признака. Согласно данным научной литературы такими генами являются: ген (ESR) эстрогенового рецептора, определяющий развитие вторичных половых признаков, ген (PRLR) пролактинового рецептора основанный на биологической способности свиней к многоплодию выкармливанию поросят и созреванию ооцитов, бета-субъединица фолликулостимулирующего гормона (FSH β) регулирующая фолликулогенез и рианодиновый рецептор (RYR1) – ген устойчивости к стрессу, косвенно влияющий на репродуктивные качества животных [1, 2, 3].

Проведение селекции, направленной на разведение животных с предпочтительными генотипами данных генов позволит до 18% увеличить многоплодие маток и до 16,8% воспроизводительную функцию хряков-производителей [4, 5]. В связи с чем, большой