

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«БРЯНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.Г. ПЕТРОВСКОГО»
(БГУ)

УДК 57.089

№ государственной регистрации 114122540042

Инв. № 215021170031



Программа по научно-исследовательской
работе в области ветеринарии и животноводства
Т.А. Стенченко
2014 г.

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по теме:

**РАЗРАБОТКА ИННОВАЦИОННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ В ГЕНЕТИКЕ, СЕЛЕКЦИИ И
СОХРАНЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ, ГЕНЕТИКЕ И РАЗВЕДЕНИИ
ЖИВОТНЫХ, В ПЛЕМЕННОЙ РАБОТЕ И ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЕ НА ОСНОВЕ
СОВРЕМЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ,
БИОИНЖЕНЕРНЫХ
ПОДХОДОВ И МЕТОДОВ**

(базовая часть государственного задания в сфере научной деятельности №41)
(промежуточный)

Этап 1: Разработка молекулярных ДНК-маркеров для направленной селекции люпина на
устойчивость к антракнозу. Разработка тест-системы экспресс-диагностики вируса
лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе ДНК-технологий

СОГЛАСОВАНО:

Директор НИИ фундаментальных
и прикладных исследований


С.И. Михальченко

Руководитель темы
директор ИННО-центра
биотехнологии и экологии БГУ
д.биол.н.


Н.Я. Нам

Брянск 2014

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель:

д. б. н., профессор,
директор ИННО-центра
биотехнологии и экологии

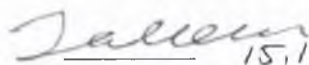


Нам

И.Я.(введение,
разделы 1,2,
заключение)

Исполнители:

проф. каф. биологии,
д.б.н., проф.



15.12.14 Заякин В.В.

(разделы 1,2)


мл.н.сотр., к.б.н.



15.12.14

Смазнова И.А.

аспирантка



15.12.14

Костюкова Е.Е.

аспирантка



15.12.14

Мытницкая Ю.Ф.

аспирантка



15.12.14

Лаукарт Г.Р.

аспирант



15.12.14

Ахмедов Р.Б.

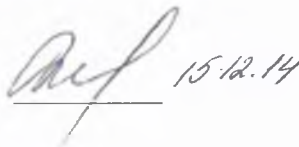
студентка



15.12.14

Кобозева М.С.

Нормоконтролер



15.12.14

О.В. Титова

РЕФЕРАТ

Отчет 45 с., 1 ч., 7 рис., 2 табл., 36 источников.

ЛЮПИН, АНТРАКНОЗ, *Colletotrichum*, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, КРУПНЫЙ РОГАТЫЙ СКОТ, ЛЕЙКОЗ, ВИРУС ЛЕЙКОЗА КРС, ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ К ЛЕЙКОЗУ

Объектами настоящего исследования являются люпин, крупный рогатый скот, вирус лейкоза крупного рогатого скота.

Цель работы на этапе 1:

1. Разработка молекулярных ДНК-маркеров для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу.
2. Разработка тест-системы экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе ДНК-технологий
3. Исследование генетического полиморфизма гена *BoLA-DRB3* в популяции быков-производителей Брянской и Ленинградской областей и Беларуси для выявления животных, генетически устойчивых к лейкозу КРС.
4. Разработка молекулярно-генетического метода анализа возбудителя антракноза люпина *Colletotrichum*.

При выполнении проекта были использованы современные биотехнологические методы и подходы: методы ISSR-PCR или ПЦР-ПДРФ, метод ПЦР в реальном времени, микробиологические и биохимические методы, микроскопия.

Были получены следующие результаты:

1. Разработаны молекулярные ДНК-маркеры для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу. Освоен метод ISSR-PCR для молекулярно-генетического анализа сортов и видов люпина для использования в селекции и семеноводстве. Полученные результаты используются для ускорения создания высокопродуктивных и устойчивых сортов люпина в лабораториях ВНИИ люпина РАСХН. Аспирантом Гришиным С.Ю. выполнена работа по гранту по ФЦП и опубликована статья в журнале «Сельскохозяйственная биология».
2. Разработана тест-система для экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) на основе ДНК-технологий. Аспирантом Ахмедовым Р.Б. получен грант от Фонда содействия развития предприятий малого бизнеса в научно-технической сфере. Подана заявка на получение патента на изобретение «Набор олигонуклеотидов-праймеров для определения провируса лейкоза крупного рогатого скота».

3. Проведены исследования генетического полиморфизма гена BOLA-DRB3 в популяции быков-производителей Брянской и Ленинградской областей и Беларуси для выявления животных, генетически устойчивых к лейкозу КРС. Полученные результаты позволили дать руководителям животноводческих хозяйств конкретные рекомендации по внедрению метода ПЦР-ПДРФ для анализа генетической устойчивости к лейкозу поголовья КРС, и формирования в Брянской области популяции, оздоровленной по лейкозу. Аспиранткой Смазновой И.А. защищена кандидатская диссертация на тему «Характеристика аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3, влияющего на устойчивость к лейкозу, и генов молочной продуктивности у быков-производителей Брянской области».

Студенткой Кобозевой М.С. получен грант от Фонда содействия развития предприятий малого бизнеса в научно-технической сфере.

4. Для анализа возбудителя антракноза люпина *Colletotrichum* методами молекулярно-генетической диагностики подобраны праймеры, метод позволяет обнаружить патоген в тканях растений люпина. Аспиранткой Зардиновой Г.Р. проводится работа по оптимизации метода, повышению чувствительности и специфичности.

В работе принимали участие молодые ученые, аспиранты и студенты естественно-географического факультета БГУ и других научных учреждений.

СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения	6
Введение	7
1 Обзор литературы	8
1.1. Использование молекулярных ДНК-маркеров для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу	8
1.2. Использование экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе ДНК-технологий	10
1.3. Ген BoLA-DRB3 как маркер генетической устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу	14
2 Основная часть	16
2.1 Объекты и методы исследования	16
2.1.1. Разработка молекулярных ДНК-маркеров для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу	16
2.1.2. Разработка тест-системы экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе ДНК-технологий	16
2.1.3. Полиморфизм гена BoLA-DRB3, влияющего на устойчивость крупного рогатого скота к лейкозу	26
2.2 Результаты исследований	27
2.2.1. Разработка молекулярных ДНК-маркеров для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу	27
2.2.2. Разработка тест-системы экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе ДНК-технологий	30
2.2.3. Определение генетической устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу и генетический полиморфизм гена BoLA-DRB3	35
Заключение	40
Список использованных источников	42

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВЛКРС - вирус лейкоза крупного рогатого скота

ДНК-маркеры – генетические маркеры по дезоксирибонуклеиновой кислоте

КРС – крупный рогатый скот

ПААГ - полиакриламидный гель

ПДРФ - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПЛ - персистентный лимфоцитоз

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

ГКГ – главный комплекс гистосовместимости

BoLA - Bovine Lymphocyte Antigen

МНС — Major Histocompatibilty Complex

ВВЕДЕНИЕ

На этапе 1 выполнения проекта были доработаны методики молекулярно-генетического анализа люпина для выявления ДНК-маркеров на устойчивость к антракнозу и отбора перспективных генотипов с потенциальной устойчивостью к грибу *Colletotrichum*. Проведен анализ сортов и сортообразцов люпина узколистного российской, белорусской, украинской, польской и австралийской селекции, сравнение их генетического полиморфизма и наличия маркеров устойчивости к антракнозу. На основе этих маркеров выделены формы люпина, имеющие генетическое сходство с устойчивыми к антракнозу австралийскими образцами.

Была разработана тест-система экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе ДНК-технологий с применением ПЦР в реальном времени. Эта система необходима для выявления вирусоносительства у телят в течение первых недель после отела для последующей выбраковки вирусоносителей и формирования ремонтного стада на основе здоровых животных. Ранняя диагностика вирусоносительства необходима для предотвращения горизонтальной передачи вируса лейкоза КРС, которая при совместном содержании вирусоносителей и здоровых животных может достигать 25% за 6 месяцев и до 100% - за 2-3 года при наличии в стаде больных коров.

На этапе 1 выполнения проекта были доработаны методики молекулярно-генетического анализа люпина для выявления ДНК-маркеров на устойчивость к антракнозу и отбора перспективных генотипов с потенциальной устойчивостью к грибу *Colletotrichum*. Проведен анализ сортов и сортообразцов люпина узколистного российской, белорусской, украинской, польской и австралийской селекции, сравнение их генетического полиморфизма и наличия маркеров устойчивости к антракнозу. На основе этих маркеров выделены формы люпина, имеющие генетическое сходство с устойчивыми к антракнозу австралийскими образцами.

1 Литературный обзор

1.1 Использование молекулярных ДНК-маркеров для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу

Люпин является важной зернобобовой культурой кормового и сидерального назначения. В семенах люпина содержатся 38-42% белка, сбалансированного по аминокислотному составу. Люпин накапливает в почве до 200 кг/га азота и является хорошим предшественником в севообороте для ряда культур.

Актуальность разработки ДНК-маркеров хозяйственно-ценных признаков люпина обусловлена потребностями селекции в выведении новых высокопродуктивных, устойчивых, низкоалкалоидных сортов. В современной селекции сельскохозяйственных культур широко используются достижения методов молекулярного анализа генетических ресурсов растений, в частности ДНК-маркерный отбор генотипов (Marker Assisted Selection – MAS). MAS позволяет расширить возможности традиционных методов отбора потомков, несущих те или иные аллели генов хозяйственно-ценных признаков родителей, и существенно ускорить селекционный процесс.

Наиболее важной задачей в селекции растений является правильный выбор генотипов, которые содержат ценные комбинации генов. Выявление аллелей генов, которые отвечают за устойчивость к абиотическим стрессам, вредителям, инфекционным заболеваниям позволит направленно использовать несущие их генотипы в селекции и существенно повысить урожайность культуры.

Актуальной проблемой является разработка и внедрение в селекционный процесс ДНК-маркеров хозяйственно-ценных признаков люпина. В связи с тем, что сорта различаются по генотипу, почвенно-климатическим условиям произрастания, важной задачей является оценка эффективности ДНК-маркеров, полученных австралийскими исследователями, в селекции российских и белорусских сортов и линий люпина. Для этого необходимо провести молекулярно-генетический анализ, а затем сравнить его результаты с фенотипическими данными о проявлении соответствующих признаков у изученных образцов. В то же время, для многих хозяйственно-ценных признаков люпина – содержание и качество белков, детерминированный рост, масса семени, высокая продуктивность и др. ДНК-маркеры еще не разработаны.

В настоящее время метод ДНК-маркеров для отбора в селекции люпина в Российской Федерации и в Белоруссии не используется.

При разработке молекулярных ДНК-маркеров для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу использованы методы, предложенные австралийскими учеными.

В Австралии разработаны 12 маркеров, сцепленных с генами: устойчивости к антракнозу, низкой алкалоидности люпина узколистного и белого, устойчивости к растрескиванию бобов, яровизации, фомопсису, ржавчине люпина узколистного. Ежегодно проводится анализ нескольких тысяч растений по разработанным ДНК-маркерам хозяйственно-ценных признаков люпина узколистного и белого. Проанализированные растения, содержащие нужные маркерные аллели, используются в дальнейшей селекции для выведения новых сортов и гибридов.

Для селекции российских и белорусских сортов наибольший интерес представляют маркеры, разработанные австралийскими учеными на устойчивость к антракнозу и низкую алкалоидность люпина узколистного и белого. Кроме того, важными признаками, для которых желательно осуществить поиск ДНК-маркеров, являются высокая продуктивность (семенная и зеленой массы), крупносемянность, раннеспелость, устойчивость к загущению, конкурентноспособность по отношению к сорнякам, засухо-, холодоустойчивость и другие.

Маркерный отбор наряду с генетической инженерией позволяет существенно сократить сроки селекции и повысить продуктивность сельскохозяйственных культур в короткие сроки. Так как выращивание генетически модифицированных растений в РФ законодательно ограничено, ДНК-маркерная селекция может быть основным подходом для ускорения селекции устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам высокопродуктивных низкоалкалоидных сортов и гибридов люпина.

Антракноз является инфекционным заболеванием многих сельскохозяйственных культур, в том числе и люпина узколистного. Болезнь растений *Lupinus angustifolius* L. вызывается грибами *Colletotrichum lupini* (Nirenberg et al., 2002). В годы развития эпифитотий антракноза происходит значительное снижение урожайности восприимчивых к патогену сортов. Посевы люпина, сильно пораженные заболеванием, не рекомендуются для использования на семенные цели, зернофураж и силосование (Купцов и др., 2010). По литературным данным, впервые в СССР антракноз был обнаружен на узколистном люпине, который поражался в наибольшей степени по сравнению с другими видами (Евсиков и др., 2007). Однако, благодаря многолетней селекции на устойчивость к антракнозу, некоторые современные сорта *Lupinus angustifolius* L. обладают толерантностью к болезни. В то же время необходимо отметить, что устойчивость носит не абсолютный, а относительный характер, потому что так называемые «высокоустойчивые» образцы могут поражаться инфекцией, но в меньшей степени, по сравнению с «неустойчивыми» растениями.

До сих пор нет единства среди исследователей по поводу общего количества генов, связанных с толерантностью к антракнозу (Купцов, Такунов, 2006). Американские сорта люпина узколистного Rancher и Frost, австралийские сорта Margi, Illyarrie, Yandee, Danja несут в своих генотипах доминантный ген устойчивости к антракнозу An (Cowling, 1999). Австралийский сорт Kalya обладает доминантным геном Lanr2, обуславливающим среднюю устойчивость к антракнозу (Buirchell, 2005). Высокая устойчивость к антракнозу австралийских сортов Wonga и Tanjil контролируется доминантным геном Lanr1 (Yang et al., 2004). По данным гибридологического анализа белорусские сорта Миртан и Першацвет, показывающие устойчивость к антракнозу на уровне Wonga и Tanjil, содержат в своих генотипах блоки из трех неаллельных доминантных генов: Rcl1 Rcl2 Rcl3.

Следует подчеркнуть, что в настоящее время селекционеры разных стран развернули исследования по созданию более устойчивых к антракнозу сортов путем объединения в одном генотипе неаллельных генов устойчивости к болезни (Купцов, Такунов, 2006). С целью быстрого и эффективного отбора устойчивых к антракнозу растений разрабатываются ДНК-маркеры, сцепленные с генами устойчивости к заболеванию. Так, австралийскими исследователями были разработаны ДНК-маркеры AntjM1 (Yang et al., 2004), AntjM2 (You et al., 2005), AnSeq3 и AnSeq4 (Yang et al., 2012), сцепленные с геном Lanr1. С помощью праймеров для соответствующих маркеров устойчивости к антракнозу люпина узколистного, в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего анализа ДНК-фрагментов, можно определить наличие гена Lanr1 в изучаемых образцах люпина узколистного.

1.2 Использование экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе ДНК-технологий

Лейкоз крупного рогатого скота (лейкоз КРС) – хроническая инфекционная болезнь опухолевой природы, основным признаком которой – злокачественное разрастание клеток кроветворных органов с нарушением их созревания, в результате чего происходит диффузная инфильтрация органов этими клетками или появляются опухоли (Сюрин и др., 2001).

Возбудитель инфекции – Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) (лат. Bovine Leukemia virus (BLV)) – РНК-содержащий вирус состоящий из 6 основных белков и геномной РНК длиной 8,7 тыс. нуклеотидов. Воспроизведение вируса происходит только на основе ДНК провируса, встроенной в геном хозяина (Рузина, 2012).

Лейкоз КРС – одно из основных заболеваний товарных и племенных хозяйств России широко распространение по территории страны (38% племенных хозяйств являются неблагополучными по лейкозу). В Брянской области, хотя она и входит в группу

относительно благополучных регионов, 6,3 % поголовья КРС является серопозитивным (РИД+, данные 2012 года).

Лейкоз КРС наносит серьезный экономический ущерб, заключающийся в снижении молочной и мясной продуктивности, а также качества молока и мяса, потери генофонда ценных продуктивных семей, снижении продуктивного долголетия коров. Немаловажным является и то, что молоко лейкозных коров не может использоваться для производства детского питания. Необходимо отметить, что ВЛКРС потенциально опасен для человека, так как во многом сходен с вирусом Т-клеточного лейкоза человека (Ахмедов и др., 2014).

В настоящее время для диагностики ВЛКРС используются иммунологические (серологические) и молекулярно-генетические методы.

Характерной особенностью ВЛКРС является пожизненная одновременная персистенция вируса и вирусспецифических антител. Поэтому серологические методы обнаружения противовирусных антител можно использовать для выявления больных животных. У зараженных животных в крови циркулируют антитела к некоторым из структурных белков вируса. Однако диагностическое значение имеют антитела против gp51 и p24. Количественное соотношение антител против p24 и gp51 связано со стадией инфекционного процесса. Многочисленные исследования показывают, что антитела к gp51 появляются раньше и в более высоком титре, чем антитела к p24 и, следовательно, серологические реакции, направленные на выявление антител против gp51, по своей чувствительности будут превосходить реакции, в которых используется в качестве антигена белок p24.

Для обнаружения специфических антител в лабораториях широко применяют реакцию иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментный анализ (ИФА), для постановки которых разработаны и выпускаются соответствующие коммерческие диагностические наборы (Джапаралиев, 2002).

Реакция иммунодиффузии (РИД). РИД является одним из широко применяемых методов серологического исследования животных в государственных программах по борьбе с ВЛКРС во многих странах.

Сущность метода заключается в том, что антиген и антитело, реагируя в плоском слое агара, образуют преципитат, который проявляется в виде четкой линии преципитации. Реакция иммунодиффузии проходит в 0,8-1,0% геле агара, который готовят на трис-НСI или боратном буферах в диапазоне рН 7,2-8,6, содержащем 8,0-8,5% NaCl. Методика постановки реакции одинакова для всех диагностикумов и предусматривает заполнение лунок антигеном, антисывороткой и испытуемыми

сыворотками по схеме 1:2:4 или 1:3:3. Число проявляющихся линий преципитации соответствует числу пар антиген-антитело в исследуемой системе.

Реакция иммунодиффузии в геле агара, направленная на выявление анти-gp51 антител, используется в качестве основного диагностического теста, регламентирующего международную и внутреннюю торговлю племенными животными, спермой и эмбрионами. При первичном обследовании сывороток крови, результаты РИД считают достаточными для объявления стада благополучным и свободным от ВЛКРС.

Этот метод по простоте постановки и относительной низкой стоимости не имеет себе равных среди других серологических реакций и широко применяется для поголового обследования.

Недостатком этого метода является то, что реакция не может выявить всех инфицированных животных, так как не у всех заболевших животных уровень антител в крови достигает того значения, которое может быть определено в РИД. Кроме того, этот метод предназначен для выявления антител в индивидуальных пробах сыворотки крови. Для обнаружения антител в низких титрах, например, в индивидуальных или в сборных пробах молока или сыворотки крови рядом авторов рекомендуется ИФА.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Разработанный в 1971 г. шведскими учёными Engvall и Perlmann, ИФА в настоящее время стал одним из самых распространенных методов исследования. В первую очередь, достоинствами ИФА являются высокая чувствительность, специфичность, воспроизводимость результатов, а также оперативность постановки анализа, небольшие объёмы исследуемых образцов (1-30 мкл), возможность автоматизации всех стадий выполнения реакции и учёта результатов. Так, чувствительность ИФА в 10-100 раз выше, чем чувствительность РИД, а использование в качестве твёрдого носителя для иммобилизации антител или антигенов 96- или 192- луночных полистироловых планшетов позволяет исследовать большое количество образцов.

В лунки с адсорбированным на их поверхности иммуноспецифическим компонентом вносят испытуемые сыворотки или пробы молока. Для обнаружения образовавшегося иммунного комплекса в качестве конъюгатов применяют поликлональные, а чаще моноклональные антивидовые бычьи IgG. В качестве ферментативной метки преимущественно используют пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу.

Серологические методы диагностики ВЛКРС имеют значительные недостатки. Важнейшим из них является невозможность выявления телят-вирусоносителей до 6 месяцев, когда в их крови существуют материнские антитела. При этом за 6 месяцев в

стаде уровень вирусносительства может увеличиться с 0-3% до 22-25%, а к 2 годам до 100%. Таким образом, использование лишь методов прямой диагностики лейкоза КРС (провиральной ДНК и вирусной РНК) позволяет с высокой точностью определять инфицированных животных.

Методы определения провируса лейкоза КРС

Определение провиральной ДНК является необходимым условием диагностирования любого заболевания вызванного ретровирусной инфекцией, так как для развития данного типа вирусов провиральная стадия является обязательной. Исходя из проанализированных литературных данных, существует два метода определения специфических последовательностей ДНК, применимых для обнаружения провиральной ДНК.

Метод флуоресцентной гибридизации *in situ*

Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) был создан для определения конкретных последовательностей ДНК непосредственно на цитологических и гистологических препаратах (Шилова, Золотухина, 2007).

ДНК-зонд – это главный элемент при постановке FISH, так как определение хромосомной аномалии возможно только при наличии соответствующего зонда. Впервые *in situ* гибридизация с радиоактивным зондом, меченым изотопом ^{32}P , была описана в 1969 году. В последствии были разработаны нерадиоактивные флуоресцентные метки, что сделало метод *in situ* гибридизации безопасным, простым в исполнении и менее трудоемким при обработке результатов. Развитие технологий цифровой записи и архивирования микроскопических изображений, а также компьютерных систем для их анализа позволили создать принципиально новые подходы к решению задач по визуализации и идентификации хромосомного материала.

Современный ДНК-зонд, представляет собой нуклеотидную последовательность ограниченного размера, которая комплементарна определенному участку ядерной ДНК исследуемого цитогенетического препарата. Зонд несет «метку», то есть содержит нуклеотиды, связанные с флуорофором (молекула, способная к флуоресценции). В последнее время большое распространение получили зонды, меченные напрямую, в которых молекула флуорофора присоединяется при помощи ковалентной связи непосредственно к нуклеотидам зонда. Как правило, к каждому зонду присоединяют сразу несколько молекул флуорофора, чтобы, в конечном счете, получить качественную флуоресценцию.

Существует несколько типов ДНК-зондов, принципиально отличающихся друг от друга. Для обнаружения уникальных (неповторяющихся) последовательностей ДНК используют ген-специфические зонды – LSI (Locus Specific Identifiers).

Проведенный литературный анализ показал, что данная методика не применяется для диагностики провируса лейкоза КРС и массового скрининга животных, хотя теоретически это возможно. Вероятно, это связано с использованием более сложного оборудования, чем в других методах.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК) в биологическом материале (пробе) (Херрингтон, Макги, 1999).

Для выявления провирусной ДНК ВЛКРС используется ПЦР с последующим анализом продукта с помощью электрофореза. Однако этот метод недостаточно надежен из-за высокой вероятности контаминации образцов и получения ложноположительных результатов, что будет приводить к выбраковке здоровых животных.

Поэтому разработка тест-системы экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе метода ПЦР в реальном времени имеет высокую актуальность и перспективность для использования в ветеринарной медицине (Ребриков и др, 2009).

1.3 Ген BoLA-DRB3 как маркер генетической устойчивости

крупного рогатого скота к лейкозу

В последние два десятилетия в развитых странах Евросоюза, США, Канаде бурно развивается геномная селекция крупного рогатого скота, основанная на применении ДНК-технологий. Разработка ДНК-маркеров хозяйственно – ценных признаков позволила проводить экспресс-оценку поголовья на устойчивость к инфекционным заболеваниям и стрессорным факторам внешней среды, выявлять племенных животных с высоким генетическим потенциалом молочной и мясной продуктивности, высоким качеством продукции. Молекулярно-генетическая оценка племенного поголовья коров и быков является важнейшим этапом селекционной работы и при разведении скота.

В России также проводились работы по применению метода ДНК-маркеров для генотипирования коров по генам хозяйственно-ценных признаков. Так, изучалась генетическая устойчивость к вирусу лейкоза КРС коров из разных регионов страны (Сулимова, 1993; Удина и др., 2009; Эрнст, 2003), был изучен аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB, связанного с генетической устойчивостью животных к вирусу лейкоза

крупного рогатого скота, у разных пород КРС (Шарифуллина, 2006; Быков, 2009; Рузина, 2012; Козлов и др., 2012). В проведенных ранее исследованиях аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* в некоторых племенных хозяйствах Брянской области было выявлено 6-15% коров, несущих аллели устойчивости в гомозиготном состоянии, и до 32% генетически устойчивых к вирусу лейкоза коров, имеющих генотипы У/Н и У/С (Кожевина и др., 2009; Смазнова и др., 2010; Козлов и др., 2011), что объясняет сравнительное благополучие этих хозяйств относительно распространенности лейкоза.

Особое значение для разведения крупного рогатого скота имеет генетическая оценка быков-производителей, используемых для производства семени на государственных племенных предприятиях (станциях). В настоящее время в литературе найдено немного работ по применению ДНК-маркеров для генетического анализа быков-производителей по устойчивости к лейкозу и генам молочной продуктивности.

Исследования по аллельному полиморфизму гена *BoLA-DRB3* быков-производителей разных пород из государственных племенных станций Краснодарского края, Московской, Ленинградской и Ростовской областей, Карелии, Финляндии, Норвегии были проведены в работах Ковалюк (2008), Сацука (2009), Мачульской (2009). В этих работах было показано существенное преобладание у племенных быков – производителей аллелей чувствительности к ВЛКРС, практически полное отсутствие быков, несущих аллели устойчивости в гомозиготном состоянии, и незначительное количество быков с аллелями У в гетерозиготном состоянии - 11-14%.

2 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объекты и методы исследования

Объекты исследований.

Материалом для исследования Молекулярные ДНК-маркеры для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу служили 50 сортов и образцов люпина узколистного российской, белорусской, польской и австралийской селекции

2.1.1 Разработка молекулярных молекулярных ДНК-маркеров для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу

Разработка молекулярных ДНК-маркеров для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу» использовали ряд методик.

ДНК выделяли из отдельных семян в трехкратной повторности по методике, использованной ранее.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия).

Состав реакционной смеси объемом 10 мкл.: 10-20 нг геномной ДНК, 0,3 мкМ прямого и обратного праймера, 0,25 ед. Таq-полимеразы E 338, 1,5 мМ MgCl₂, 0,15 мМ dNTPs, 1 мкл B321 AS буфера. Использовали ферменты и реактивы фирмы «СибЭнзим» (Россия).

Условия амплификации: начальная денатурация при 95 °С – 1 минута; 30 циклов: денатурация при 95 °С – 30 сек., отжиг (51 °С для праймеров на маркер AnSeq3 и 53°С для праймеров на маркер AnSeq4) – 20 сек., элонгация при 72 °С – 10 сек. Заключительная элонгация при 72 °С – 2 минуты. Применяли сайт-специфичные праймеры на маркеры AnSeq3 и AnSeq4, разработанные авторами (Yang et al., 2012). Праймеры синтезировались фирмой «Синтол» (Россия).

Разделение фрагментов ДНК проводили в 11-13% полиакриламидных гелях с использованием камеры для вертикального электрофореза «VE-20» (Хеликон, Россия). Продукты ПЦР разделяли в течение 5-6 часов при напряжении 270-300 вольт. Гель помещали в раствор бромистого этидия (концентрация 0,5 мг/л) на 20-30 минут. После окрашивания визуализировали на сканере гелей GelDocXR (BioRad, США).

В качестве контролей для определения длины маркерных аллелей использовали продукты ПЦР с ДНК сортов австралийской селекции - Tanjil, Wonga, Kalya.

2.1.2 Разработка тест-системы экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе ДНК-технологий

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов.

Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы и должны отвечать ряду критериев:

1) Быть специфичными. Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, так как именно с них Taq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. Если их специфичность недостаточна, то высока вероятность, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить процессы неспецифического связывания, и синтеза фрагментов различной длины, отличных от искомым. Часть праймеров и дНТФ расходуется на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности.

2) Не должны образовывать димеры и петли, то есть не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига (комплементарного присоединения) праймеров самих на себя или друг с другом.

3) Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной специфичности, взятой в качестве критерия при выборе праймеров. При попадании на такую зону, отжиг праймеров не происходит, и, как следствие, возникает ложноотрицательный результат.

Taq-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – смесь дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение рН.

Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

Для удобства детекции в состав реакционной смеси могут быть включены ДНК-зонды – искусственно синтезированные олигонуклеотиды небольшого размера (около 30 нуклеотидов), комплементарные специфическим ампликонам (продуктам реакции).

Благодаря прикрепленным к ним изотопным или флуоресцентным меткам ДНК-зонды могут использоваться для детекции продуктов реакции.

Циклический температурный режим ПЦР

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, которые обеспечиваются определенными температурными циклами.

Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов:

1. Денатурация – это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур.

2. Отжиг – это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры подбирают так, что они ограничивают искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

3. Элонгация (синтез). После отжига праймеров Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера. Температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Таq-полимеразы, которая с максимальной эффективностью начинает синтез второй цепи ДНК от 3'-конца праймера, связанного с матрицей, и движется в направлении от 3' к 5' концу.

Иногда в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапный ПЦР, совместив отжиг и элонгацию.

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается.

Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой:

$$A = M \cdot (2^n - 1) \sim 2^n, \text{ где}$$

A – количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации;

M – начальное количество ДНК-мишеней;

n – число циклов амплификации.

Реальное значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет по некоторым данным 78-97%. Если в пробе присутствуют ингибиторы реакции это значение

может быть намного меньше, поэтому фактическое количество специфических продуктов амплификации лучше описывает формула:

$$A = M*(I + E)^n, \text{ где}$$

E – значение эффективности реакции.

Следует заметить, что в процессе амплификации на исходной цепи синтезируются и длинные фрагменты, однако их накопление происходит лишь в арифметической прогрессии по формуле:

$$K = M*n, \text{ где}$$

K – количество длинных продуктов амплификации.

Таким образом, специфические фрагменты, ограниченные на концах праймерами, впервые появляются в конце второго цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.

Следует заметить, что процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает – «эффект плато». Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации, когда количество ампликонов достигает 0,3-1 пмолей. В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации, на момент достижения «эффекта плато» влияют:

1. Утилизация субстратов (дНТФ и праймеров).
2. Стабильность реагентов (дНТФ и фермента).
3. Количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы.
4. Неспецифические продукты и праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу.
5. Концентрация специфического продукта за счет неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов.

Часто в диагностических целях используется ПЦР с «горячим» стартом (*hot-start PCR*) – модификацию, суть которой состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров. Для этого полимеразная активность фермента в момент постановки ПЦР блокируется антителами или имитирующими антитела небольшими молекулами типа Affibody до наступления первой денатурации (проводится при 95 °C в течение 10 минут).

Кроме того, для предотвращения преждевременного взаимодействия фермента с компонентами реакционной смеси и, как следствие, образования неспецифических

продуктов реакции до момента полного прогрева, используется легкоплавкий парафин или специальные масла, отделяющие полимеразу от реакционной смеси.

В зависимости от ГЦ-состава и размера, праймеры имеют определенную температуру плавления (T_m), при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает T_m , праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При соблюдении оптимальных условий, то есть температуры отжига, близкой к температуре плавления, праймер образует двуцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и таким образом обеспечивает специфичность реакции.

Даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, в отсутствие фермента элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации.

Таким образом, ПЦР с «горячим» стартом позволяет минимизировать вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР и возможность получения ложноположительных результатов анализа.

Детекция результатов ПЦР

Часто для детекции результатов ПЦР используют электрофоретическое исследование. При этом для диагностирования различных заболеваний (например, лейкоза КРС) метод ПЦР-анализа с проведением электрофореза имеет огромный недостаток – возможность контаминации. Поэтому современные методы детекции ПЦР-продуктов направлены на исключение данного недостатка.

Метод гибридизации после амплификации

Другой способ детекции продуктов амплификации основан на гибридизации олигонуклеотидных зондов с продуктами амплификации. Зонды представляют собой искусственно синтезированные участки ДНК, содержащие ту или иную метку, детектируемую специальными приборами.

Для детекции продуктов ПЦР после окончания реакции амплификации необходимо специальное оборудование – детектор флуоресценции (например, приборы «Джин» или «Джин-4» производства НПФ «ДНК-Технология»).

В процессе своей работы прибор регистрирует флуоресцентное излучение, возникающее в реакционной смеси при освещении образца источником возбуждающего света. Регистрация производится последовательно для каждой из пробирок при её позиционировании относительно оптического блока с помощью шагового двигателя.

Флуорофоры для каждой из мишеней (например, для специфического искомого участка ДНК и внутреннего контроля) имеют свою длину волны, это позволяет регистрировать одновременно несколько сигналов по соответствующим каналам, что повышает производительность метода.

Такой подход позволяет свести к минимуму риск контаминации продуктами амплификации. Детекция результатов проводится в закрытых пробирках, что позволяет осуществлять ПЦР-исследования в одной комнате и обходиться меньшим количеством персонала. Кроме того, регистрация, интерпретация и хранение полученных результатов проводятся автоматически.

В результате указанный способ детекции существенно сокращает время проведения анализа и исключает возможность субъективной оценки полученных результатов, что повышает качество работы лаборатории. Тем не менее необходимо помнить, что реализация данного подхода позволяет проводить только качественный анализ.

Различные варианты детекции по конечной точке позволяют оценить количество исходной ДНК методом серийных разведений, определяя количество работающих разведений и сравнивая их с контрольными образцами с известной концентрацией ДНК. Однако данный подход является слишком трудоемким и практически не применяется в условиях диагностических лабораторий.

Метод гибридизации в процессе амплификации

Данный метод, как упоминалось ранее, позволяет учитывать результаты реакции, не открывая пробирки. Регистрация результатов по уровню флуоресценции происходит с помощью специального оборудования.

Ключевым элементом метода является использование гибридизационных олигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора и «темнового» гасителя. Наиболее часто применяется флуоресцентный краситель 6-FAM (6-карбоксифлуоресцеин), с длинной волны возбуждения 488 нм, который легко связывается с олигонуклеотидами и обеспечивает высокую интенсивность сигнала. Поэтому под анализ с его использованием адаптированы многие приборы.

Также активно применяют SYBR Green I, который при связывании с двухцепочечной ДНК вызывает увеличение флуоресценции. В качестве референсного красителя широко используется ROX.

Для выявления продуктов амплификации применяют следующие наиболее распространенные подходы:

Выщепление 5' концевой метки – метод основан на использовании 5'-экзонуклеазной активности полимеразы. В реакционную смесь добавляют ДНК-зонды, в состав которых входят флуоресцентная метка в 5'-положении, гаситель флуоресценции в 3'-положении, а также фосфатная группа в 3'-положении. Эти зонды имеют места посадки внутри амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу. В ходе ПЦР во время стадии отжига праймеров происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК, причем, чем больше продуктов амплификации образуется в ходе ПЦР, тем больше молекул зондов свяжется с соответствующими ампликонами. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и при достижении зонда начинает его расщеплять благодаря наличию 5'-экзонуклеазной активности.

Таким образом происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к увеличению детектируемого свечения. Очевидно, что чем больше ампликонов было наработано в ходе ПЦР на данный момент времени, тем интенсивнее будет свечение.

Использование зондов с комплементарными концевыми последовательностями – методика отличается от описанной выше тем, что концевые последовательности зонда представляют собой взаимно комплементарные области, а флуорофор и гаситель присоединяют к концевым нуклеотидам. При температуре отжига свободные зонды образуют шпильки за счет наличия комплементарных участков. При этом флуорофор и гаситель оказываются в непосредственной близости, что приводит к тушению флуоресценции.

При отжиге праймеров зонды комплементарно присоединяются к амплифицируемому участку ДНК, гаситель оказывается пространственно отделен от флуорофора и наблюдается рост флуоресцентного сигнала. Такие зонды часто называют «молекулярными беконами» (molecular beacons).

Таким образом, количество присоединившихся зондов и, соответственно, уровень флуоресценции оказываются пропорциональными количеству образовавшихся специфических продуктов ПЦР.

Применение 2-х зондов с резонансным переносом энергии – данный способ детекции отличается повышенной специфичностью, так как увеличение флуоресценции происходит при комплементарном связывании с ампликонами сразу 2-х ДНК-зондов. Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3' конце первого зонда, ко второму флуорофору, который находится на 5' конце второго

зонда, причем расстояние между флуорофорами составляет 1-3 нуклеотида. При одновременном связывании обоих зондов с ДНК матрицей излучение, испускаемое первым флуорофором передается на второй флуорофор, а его излучение детектируется прибором.

Использование интеркалирующих красителей – этот способ детекции основан на том, что флуоресценция интеркалирующих красителей значительно возрастает при их внедрении в двухцепочечные молекулы ДНК. Таким образом, можно наблюдать за накоплением продуктов амплификации.

Для анализа в режиме «реального времени» используют специальные ДНК-амплификаторы с оптическим блоком, позволяющие детектировать флуоресценцию внутри реакционной пробирки в ходе реакции.

Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастает пропорционально количеству продукта амплификации. Мониторинг сигнала позволяет построить кинетическую кривую реакции, при этом, момент заметного увеличения сигнала и отрыва его от фонового (так называемый пороговый цикл) зависит от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл.

Главным преимуществом детекции результатов ПЦР в режиме «реального времени» является возможность проведения количественного анализа.

При количественном исследовании образцов каждая серия экспериментов сопровождается постановкой амплификации с контрольными образцами, в которых заведомо известно количество копий ДНК (калибровочные образцы). Сравнение кинетики накопления продуктов амплификации в экспериментальных и контрольных образцах позволяет оценить концентрацию ДНК в диапазоне разведений контрольных препаратов ДНК.

Следует отметить, что для выполнения количественного ПЦР-анализа рекомендуется использование препаратов ДНК с высокой степенью очистки, так как присутствие нежелательных примесей (ингибиторов) снижает эффективность амплификации исследуемой и контрольной ДНК.

Для контроля точности количественного анализа используют калиброванные внутренние контроли. В некоторых случаях возможны потери ДНК на стадии выделения, приводящие к существенному искажению значения реального количества ДНК в образце. Для контроля за такими потерями в образец перед пробоподготовкой вносят внутренний контроль, количество которого определяют вместе с количеством ДНК инфекционного агента.

Кроме того, появляется возможность реализовать анализ кривых плавления, когда после окончания ПЦР реакцию смесь нагревают и непрерывно измеряют флуоресценцию. По достижении температуры плавления продукта амплификации флуоресценция резко снижается. Каждое резкое уменьшение флуоресценции на графике соответствует числу полосок, получаемых на электрофорезе, то есть числу разных типов ампликонов.

Применение кривых плавления не ограничивается только детекцией продуктов амплификации с помощью интеркалирующих флуорофоров. При использовании кривых плавления в системах с ДНК-зондами возможно различать точечные мутации, расположенные внутри областей связывания ДНК-матрицы и зонда.

Наличие таких мутаций способно привести к изменению температуры плавления зонда и изменениям в графике кривой плавления. Использование кривых плавления не требует от оператора амплификатора никаких дополнительных манипуляций с пробирками, а интерпретация полученных данных автоматизирована и формализована.

Таким образом, данный подход имеет ряд преимуществ по сравнению с методами анализа по конечной точке:

- 1) количественный анализ специфической ДНК в широком диапазоне концентраций;
- 2) сравнительный количественный анализ нескольких типов ДНК в одной пробирке;
- 3) обнаружение и определение процентного содержания ДНК с измененной последовательностью;
- 4) автоматизация и стандартизация ПЦР-анализа.

ПЦР-анализ проводят по следующей схеме: выделение ДНК → электрофорез геномной ДНК → ПЦР → электрофорез продуктов ПЦР. Для проведения амплификации готовят ПЦР-смесь следующего состава:

- 1) буфер для проведения ПЦР;
- 2) $MgCl_2$;
- 3) dNTP;
- 4) праймеры;
- 5) геномная ДНК;
- 6) термостабильная ДНК-полимераза.

Праймеры – синтетические олигонуклеотиды, комплементарные ДНК матрице, служащие затравкой для многократного клонирования определенного участка ДНК в ходе ПЦР. Для проведения ПЦР-РВ необходимо использовать два (прямой и обратный)

специфичных праймера, ограничивающих короткую область изучаемого локуса (150 – 300 п.н.).

При выборе праймеров придерживались следующих критериев:

1. длина праймера 18 – 30 п.н.
2. содержание суммы гуанина и цитозина (GC-состав) не менее 40 %;
4. температуры плавления (T_m) каждого праймера не менее 50 °С;
3. близкие T_m двух праймеров (отличия не более чем на 5 °С);
5. отсутствие неспецифических вторичных структур – шпилек и димеров, наличие которых затрудняет гибридизацию праймеров;
6. желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

С определенной точностью температуру плавления праймера можно определять по формуле:

$$T_m = (A+T)*2 + (G+C)*4, \text{ где}$$

($A+T$) – сумма аденина и тимина; ($G+C$) – сумма гуанина и цитозина.

Для более точного определения температуры плавления, а так же для анализа олигонуклеотидных последовательностей на возможность образования вторичных структур используют специализированное программное обеспечение (например Vector NTI Advance).

ПЦР проводят в программируемом термостате (амплификаторе) по определенной температурной схеме:

- 1) первичная денатурация – 94-95 °С – 3-5 минут;
- 2) денатурация – 94-95 °С – 30-60 сек – 25-50 циклов;
- 3) отжиг праймеров – 50-70 °С – 30-60 сек – 25-50 циклов;
- 4) элонгация – 70-72 °С – 30-300 сек – 25-50 циклов;
- 5) финальный синтез – 70-72 °С – 3-10 минут.

После амплификации проводится электрофорез для визуализации продукта реакции и постановки диагноза.

Для обнаружения провирусной ДНК метод стандартного ПЦР-анализа имеет два основных недостатка: неспецифическая амплификация, проявляющаяся на электрофореграмме в виде шмера или набора полос и возможность контаминации.

Поэтому современные методы ПЦР-диагностики провируса лейкоза КРС направлены на исключение данных недостатков.

2.1.3 Полиморфизм гена BoLA-DRB3, влияющего на устойчивость крупного рогатого скота к лейкозу

В работе были исследованы образцы спермы быков ОАО «Брянское» разных пород: черно-пестрой (29 голов), швицкой (10 голов), симментальской (9 голов), красно-пестрой (4 голов) и абердин-ангусской (4 голов), быков ОАО «Невское» черно-пестрой и голштинской пород (29 голов) и быков-производителей голштинской породы дочернего предприятия «ЖодиноАгроПлемЭлита» НПЦ НАН Беларуси по животноводству (12 голов) (г. Жодино Минской области).

Выделение ДНК из спермы проводили с помощью набора реактивов «Extra Gene™ DNA Prep100» (ООО «Лаборатория Изоген», Москва) с модификацией метода.

Изучение генетической устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу методом ПЦР-ПДРФ основано на определении генетического полиморфизма гена BoLA-DRB3 и выявлении аллелей, ассоциированных с устойчивостью или чувствительностью к лейкозу и ответственных за формирование иммунной реакции к вирусу.

Метод ПЦР-ПДРФ для анализа аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 животных включает несколько этапов работы:

1. Выделение ДНК из крови или спермы животных.
2. Проведение ПЦР с праймерами к гену BoLA-DRB3 для получения фрагмента длиной 284 п.о.
3. Электрофорез продукта амплификации.
4. Рестрикция фрагмента 284 п.о. ферментами RsaI, HaeIII, BstIY.
5. Электрофорез продуктов рестрикции в полиакриламидном геле (ПААГ).

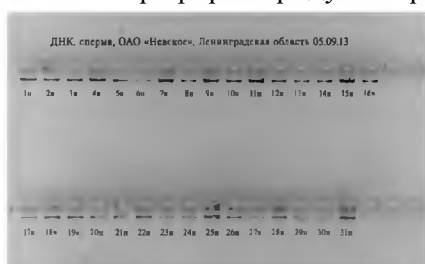


Рис.1 - Электрофорез геномной ДНК из образцов спермы в 1% агарозном геле

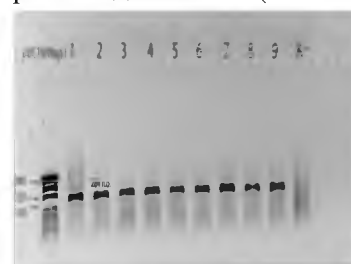


Рис.2 - Электрофорез продуктов ПЦР экзона 2 гена BoLA DRB3
1 – маркер молекулярных масс pUC19/Msp, 10 – отрицательный контроль, 2-9 – исследуемые образцы

Образцы ДНК, выделенной из спермы, проверяются с помощью электрофореза в 1% агарозном геле (рис.1). На рис. 2 видно, что полимеразная цепная реакция с геномной ДНК из образцов спермы прошла хорошо, в геле видна полоса ДНК с ожидаемым размером 284 п.о., что свидетельствует о достаточном количестве в пробе

дезоксинуклеозидтрифосфатов, Taq-ДНК-полимеразы, правильном составе буфера для полимеразной реакции.

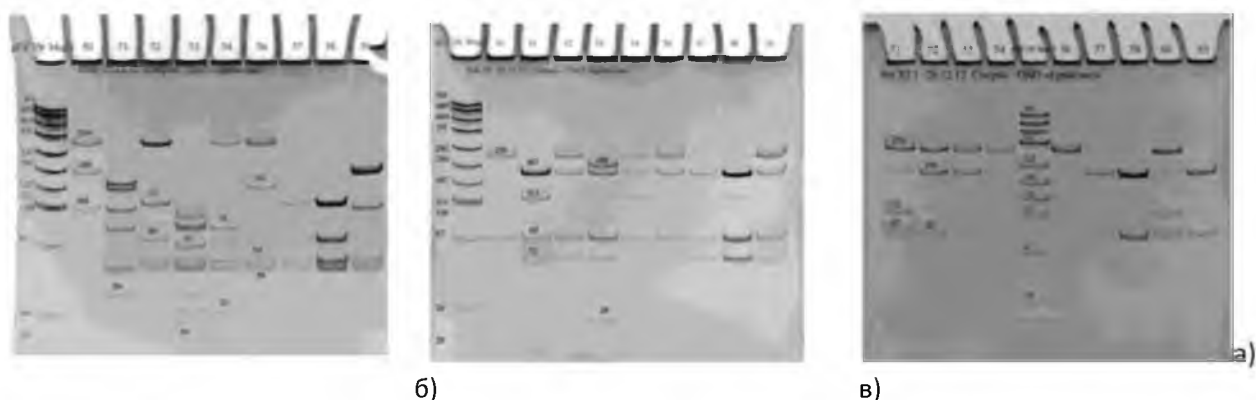


Рис. 3 - Электрофорез продуктов рестрикции
а) эндонуклеаза Rsa I; б) эндонуклеаза Hae III в) эндонуклеаза Bst X2
pUC19/Msp I – маркер молекулярных масс; 50-61 – исследуемые образцы

Фрагмент 284 п.о. далее расщепляли рестрицирующими эндонуклеазами RsaI, BstIY и/или HaeIII, с последующим разделением полученной смеси фрагментов ДНК с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и определением длин рестрикционных фрагментов (рис. 3).

Различия в нуклеотидной последовательности различных аллелей гена BoLA-DRB3 (т. е. полиморфизм на уровне ДНК) лежат в основе различного распределения сайтов рестрикции фрагмента 284 п.о., поэтому аллельный полиморфизм ДНК будет проявляться как полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Аллельные варианты гена определяли по наличию или отсутствию указанных сайтов рестрикции согласно ранее полученным таблицам Сулимовой (1993). Для выявления генетической устойчивости КРС к лейкозу необходимо выявить наличие аллелей гена BoLA-DRB3, ответственных за формирование иммунной реакции к вирусу.

2.2 Результаты исследований

2.2.1 Разработка молекулярных ДНК-маркеров для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу

Для проведения исследований селекционерами ВНИИ люпина РАСХН, а также РУП «Научно-практический центр по земледелию НАН Беларуси» предоставлены образцы трех видов люпина – узколистного (*Lupinus angustifolius* (L.)), желтого (*Lupinus luteus* (L)) и белого (*Lupinus albus* (L.)). Данный изучаемый материал имеет различное селекционное происхождение. Среди полученного селекционного материала люпина выделяются контрастные по происхождению и проявлению хозяйственно-ценных

признаков образцы, что позволяет проводить поиск «кандидатных» ДНК-маркеров, сцепленных с соответствующими генами.

Результаты. ДНК-фрагменты длиной 92 и 87 пар нуклеотидов, соответствующие маркерам AnSeq3 и AnSeq4, были получены для всех 50 селекционных образцов, включенных в исследование. В ходе сопоставления маркерных аллелей, выявленных для австралийских контрольных сортов и для других селекционных образцов, определили аллели восприимчивости (S) и устойчивости (R) к антракнозу. Аллели AnSeq3 и AnSeq4 представляют собой однонуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphism – SNP), имеющие одинаковую длину для каждого маркера. В ходе электрофоретического разделения в полиакриламидном геле устойчивые аллели маркера AnSeq3 из-за наличия замены одного нуклеотида С на Т располагались ниже восприимчивых аллелей, тогда как для AnSeq4 наблюдалась противоположная картина, обусловленная единичной заменой G на A в нуклеотидной последовательности (7). Так, для сортов Tanjil и Wonga (положительные контроли устойчивости по гену *Lanr1*) аллели AnSeq3 и AnSeq4 расположены соответственно ДНК-маркеру ниже и выше аллелей, полученных для сорта Kalya (отрицательный контроль устойчивости по гену *Lanr1*). Продукты ПЦР, полученные для ДНК каждого из сортообразцов люпина узколистного, включенных в исследование, воспроизводились во всех трех повторностях эксперимента. Маркерные аллели AnSeq3, AnSeq4 для различных сортов и образцов российской, белорусской и австралийской селекции представлены на рисунке 4.

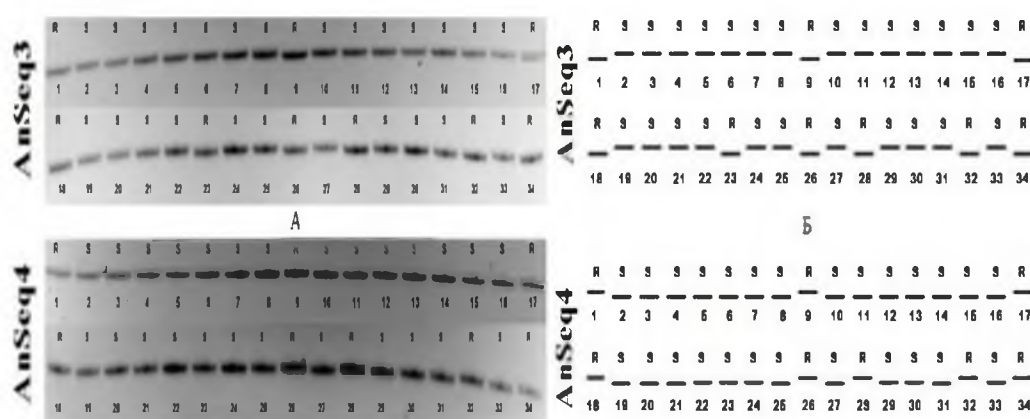


Рисунок 4. Аллели ДНК-маркеров AnSeq3, AnSeq4, амплифицированные в ходе ПЦР с ДНК образцов: 1, 17, 18, 34 – Tanjil, 2 – Радужный, 3 – Сндерат 38, 4 – Кристалл, 5 – Снежить, 6 – Белозерный 110, 7 – Смена, 8 – Надежда, 9, 26 – Wonga, 10, 27 – Kalya, 11 – Брянский 123, 12 – Витязь, 13 – Узколистный 53-02, 14 – Вектор, 15 – Белозерный 121, 16 – СН 78-07, 19 – Привабны, 20 – Першацвет, 21 – Митан, 22 – Гелена, 23 – Миртан, 24 – Хвалько, 25 – Ян, 28 – БГБ-6, 29 – Геркулес, 30 – Жодинский, 31 – Ранний, 32 – W 2248, 33 – БГБ-3.

S и R обозначены соответственно маркерные аллели восприимчивости и устойчивости к антракнозу.

В ходе анализа результатов, полученных для образцов российской селекции, не выявлены аллели, сцепленные с устойчивостью к антракнозу, обусловленной геном *Lanr1*. Информация о том, что современные, внесенные в Государственный реестр селекционных достижений РФ сорта ВНИИ люпина не содержат ген *Lanr1*, нами была получена ранее с помощью маркеров AntjM1, AntjM2. То есть, несмотря на то, что изученные сорта проявляют в той или иной степени устойчивость к заболеванию в онтогенезе, генетический материал, который находится в основе устойчивости к антракнозу австралийских сортов Wonga и Tanjil, до настоящего времени в селекционной работе ВНИИ люпина не имел существенного значения, что подтверждается результатами молекулярно-генетического анализа аллелей ДНК-маркеров гена *Lanr1*.

Сортам польской селекции, также как и российским образцам, соответствовали маркерные аллели восприимчивости к антракнозу по гену *Lanr1*. Результаты, полученные в ходе анализа фенотипа, показывают для сортов польской селекции, включенных в настоящее исследование, отсутствие выраженной устойчивости к антракнозу на уровне австралийских сортов Tanjil и Wonga, что согласуется с данными по маркерам AnSeq3, AnSeq4.

Для большинства белорусских образцов были характерны аллели восприимчивости к антракнозу. Аллели устойчивости по двум маркерам AnSeq3, AnSeq4 были обнаружены только для компонента биологического банка генов узколистного люпина БГБ-6. Данный селекционный образец имеет близкородственные связи с сортами Wonga и Tanjil и также проявляет высокую устойчивость к антракнозу в полевых и лабораторных испытаниях.

Для сорта Миртан были выявлены маркерные аллели устойчивости только по AnSeq3. В предыдущей работе с маркерами AntjM1, AntjM2 для Миртана получены восприимчивые аллели, причем с помощью праймеров на маркер AntjM2 был амплифицирован аллель, который не идентифицирован у других образцов, что характеризует генетическое своеобразие этого сорта. Вариацию аллелей устойчивости/восприимчивости к антракнозу по маркерам AnSeq3 и AnSeq4 можно объяснить различной генетической основой белорусского сорта Миртан и австралийского Tanjil. Несмотря на то, что Миртан характеризуется относительно высокой степенью устойчивости к антракнозу, его происхождение не связано с австралийским устойчивым к заболеванию материалом. Таким образом, представляется вероятным то, что маркер AnSeq3 дает «ложноположительные» результаты по сравнению с маркером AnSeq4 для сорта Миртан и выявление устойчивой аллели не связано с геном *Lanr1*.

Кроме образцов Миртан и БГБ-6, относительно высокой устойчивостью к антракнозу, обусловленной наличием в генотипах растений блока из нескольких

неаллельных генов *Rcl*, обладает сорт Першацвет. Гены устойчивости к антракнозу, характерные для Першацвета, по всей видимости, неаллельны *Lanr1*, что согласуется с результатами настоящих исследований, в ходе которых для этого сорта не выявлена устойчивость к антракнозу по маркерным аллелям, сцепленным с геном *Lanr1*. Следует отметить, что восприимчивые аллели были обнаружены для остальных белорусских образцов люпина узколистного, которые не имели близкородственные связи с австралийскими сортами Wonga и Tanjil.

Кроме австралийских источников устойчивости к антракнозу, устойчивые аллели маркеров AnSeq3 и AnSeq4 были получены для австралийской селекционной линии Walaп 2248. Данный факт отражает результаты, проводимой в Австралии программы селекции на устойчивость к антракнозу при создании новых сортов узколистного люпина.

В целом, ДНК-маркеры AnSeq3 и AnSeq4 позволяют достаточно эффективно выявлять устойчивые и восприимчивые к антракнозу генотипы по гену *Lanr1*. Так, для 50 сортов и селекционных образцов люпина узколистного неоднозначная информация по аллелям этих маркеров была получена только для сорта Миртан. Данные результаты подтверждают необходимость предварительного анализа применимости ДНК-маркеров для широкого диапазона скрещиваний, так как «ложноположительные» маркерные аллели могут негативно сказаться на выборе устойчивых к антракнозу растений.

Стабильно высокая устойчивость сортов Tanjil, Wonga, несущих ген *Lanr1*, была подтверждена в различных условиях испытаний (4,5,13). Поэтому включение гена *Lanr1* в генотипы новых сортов, полученных после скрещивания исходного белорусского или российского селекционного материала с устойчивыми к антракнозу австралийскими образцами, может повысить общую устойчивость к заболеванию. Для целей высокоточного, быстрого отбора генотипов, содержащих ген *Lanr1*, могут быть применены соответствующие ДНК-маркеры. Исследователь, анализируя полученный для ДНК селекционного образца люпина узколистного маркерный аллель, может определить, будет ли именно это растение обладать геном устойчивости к антракнозу.

Таким образом, использование ДНК-маркеров AnSeq3 и AnSeq4, сцепленных с геном *Lanr1*, может быть полезно в селекции российских и белорусских сортов.

2.2.2 Разработка тест-системы экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе ДНК-технологий

На этапе 1 была разработана тест-система экспресс-диагностики провируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС с применением ПЦР в реальном времени. Для этого был осуществлен выбор праймеров и разрушаемых проб для проведения ПЦР-РВ. В результате анализа были выбраны праймеры: env_5400_F, env_5442_F, env_5620_R и

линейные разрушаемые пробы: env_5441, env_5549 для ПЦР-РВ. Данный выбор был теоретически обоснован.

Так же в ходе исследования были теоретически определены и экспериментально подтверждены оптимальные температурные условия проведения ПЦР-РВ и Nested-PCR диагностики ВЛКРС. Разработанный метод был апробирован для выявления вирусносительства у телят в течение первых недель после отела для последующей выбраковки вирусносителей и формирования ремонтного стада на основе здоровых животных. Ранняя диагностика вирусносительства необходима для предотвращения горизонтальной передачи вируса лейкоза КРС, которая при совместном содержании вирусносителей и здоровых животных может достигать 25% за 6 месяцев и до 100% - за 2-3 года при наличии в стаде больных коров.

2. Разработка тест-системы экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе ДНК-технологий.

Разработанная тест-система была апробирована в практических исследованиях, которые проводились на образцах крови животных двух хозяйств: ОАО «Железнодорожник» Карачевского района и ОАО «Агрогородок Гетманобудский» Новозыбковского района. Анализ включал этапы: выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови, электрофоретическое и спектроскопическое изучение выделенной ДНК и постановку ПЦР. В результате проведенного исследования лейкоз был диагностирован у 11 животных изученной выборки.

Подана заявка на получение патента на изобретение «Набор олигонуклеотидов-праймеров для определения провируса лейкоза крупного рогатого скота».

Данная разработка относится к сельскому хозяйству, к ветеринарной медицине, к способу определения провируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) в образцах крови и спермы КРС, а именно, к разработке олигонуклеотидов-праймеров для молекулярно-генетического анализа провируса лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, и может быть использовано для выявления животных – вирусносителей, в том числе среди новорожденных телят сразу после отела, с целью формирования безвирусного ремонтного поголовья крупного рогатого скота от лейкоза и выращивания ремонтного молодняка, свободного от ВЛКРС.

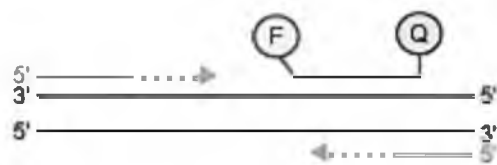
В настоящее время чаще всего для выявления вирусносителей используют иммунологические методы РИД (радиальной иммунодиффузии) и ИФА (иммуноферментный анализ), для которых выпускаются соответствующие коммерческие диагностические наборы. У зараженных животных в крови циркулируют антитела против gp51 (белки оболочки) и p24(к белкам gag). Антитела к gp51 появляются раньше и в более

высоком титре, чем антитела к р24 и, серологические реакции, направленные на выявление антител против gp51, по своей чувствительности превосходят реакции, в которых используется в качестве антигена белок р24. В целом, чувствительность метода достаточно низкая. Так же существенным недостатком иммунологических способов выявления вирусносительства является и то, что их использование возможно при достижении телятами возраста 6 месяцев, когда из крови исчезают колостральные антитела.

Метод ПЦР (полимеразной цепной реакции) разработан для диагностики провируса лейкоза КРС и применяется в нескольких регионах России для массового скрининга животных. Этот метод требует проведения анализа амплифицированного фрагмента с помощью электрофореза в агарозном геле, при этом возможна контаминация проб, что приводит к ложноположительным реакциям и к последующей ошибочной выбраковке животных.

ПЦР-РВ (ПЦР в реальном времени) основана на количественной детекции флуоресцентного сигнала, который увеличивается пропорционально количеству ПЦР-продукта. Следовательно, результат ПЦР в реальном времени можно регистрировать в процессе реакции, в каждый момент времени. Современная тест-система ПЦР в реальном времени содержит пару праймеров и дополнительный *TagMan* зонд, комплементарный внутреннему участку фрагмента. К зонду ковалентно пришиты две молекулы: на 5'-конце флуоресцентная метка («*reporter*»), она испускает флуоресценцию, на 3'-конце гаситель флуоресценции («*quencher*»), который гасит флуоресценцию флуоресцирующей молекулы. В ходе реакции *Taq*-полимераза, продвигаясь по матрице, достигает зонда и расщепляет его. При этом расстояние между флуоресцентной меткой и гасителем флуоресценции увеличивается, флуоресценция больше не гасится (Рисунок 5).

Важно отметить, что способ ПЦР-РВ лишен основных недостатков классического ПЦР-анализа.



1. Зонд отжигается на одной из цепей ДНК между прямым и обратным праймерами. Флуоресценция флуорофора потушена.



2. *Taq* ДНК полимеразы расщепляет зонд. Отщепленный флуорофор испускает свет с характерной для него длиной волны.

Рисунок 5 - Схема расщепления линейной разрушаемой пробы
в ходе ПЦР-РВ

Прототипом изобретения является патент №2521330 (автор Косовский Г.Ю. и соавт.), которые предложили «Способ выявления вируса лейкоза КРС по нуклеотидным последовательностям консервативных областей вирусного генома». Их изобретение обеспечивает детектирование провируса ВЛКРС за счет генов группоспецифического антигена (gag) для ядра и структурных белков вируса и полимеразы для обратной транскриптазы pol. Недостатками метода является невысокая чувствительность - при низком уровне матрицы после 30-35 циклов реакции появляются неспецифические продукты реакции, в том числе в отрицательном контроле, что недопустимо.

Задачей изобретения является разработка набора олигонуклеотидов-праймеров и подхода, являющегося основой для способа выявления провируса лейкоза крупного рогатого скота методом ПЦР-РВ, имеющего следующие преимущества по сравнению с прототипом:

1) повышенная специфичность детекции ВЛКРС, что стало возможным благодаря двум флуоресцентным меткам TagMan;

2) возможность увеличения количества циклов ПЦР для повышения чувствительности метода;

3) возможность проводить генотипирование местных изолятов вируса лейкоза, используя аллель-специфичные праймеры для гена env в реакции ПЦР в реальном времени.

Задача решается тем, что выявление провируса ВЛКРС с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени проводится на основе последовательности гена белка оболочки вируса env. Консенсусная последовательность использованного в работе фрагмента получена путем сравнения (выравнивания) 18 последовательностей разных изолятов, имеющих в настоящий момент в банках генов (Рисунок 6).

GCCATTGACCAAATACTAGAGGCTCATAATCAATCACSTTTCTGTGCCAGGTC
TCCCAGATACACSTTGGACTTTGTAAATGGTTATCCTAAGATCTACTGGCCCCCCC
ACAAGGGCGGCGCCGGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGCGAGCCCC
GATGCCCYTATGTGGGGGCAGATCRYTTCGACTGCCCCCACTGGGACAATGCCTCCC
AGGCCGATCAAGGATCSTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTGCATCTCAAAC
AATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAAATATGGGGATATGAYCCCSTGATCA
CYTTTTCTTTACATRRRATYCCTGATCCYCCTCAACCCGACTTYCCYCAGYTGAACA
GTGACTGGRTTCCCTCTGTCAGATCATGGGTCYCTGCTTTTAAATCAAACRGCACGGG
CCTTCCCAGAYTGTGCTATATGTTGGRAACSTTCYCCTCCCTGGGTCYCCYGARATAT
TAGTATRYAACAARACCATCTCCAGCTCYGGACCCGGYCTCGCCCTCCCGGACGCCC
AAATYTTCTYTGGGTCAAYACGTCCTYRTTYAACRCCACCCAAGGATGGCACCACCT

TCCCAGARGTTGTTTRTTCAAYGTTTCTCAAGGCAACGCCYTRTTATTRCCYCSTATCT
CCCTGGT

Рисунок 6. Фрагмент гена env.
Выделены консервативные участки не короче 15 нуклеотидов.

Представленная область генома ВЛКРС содержит консервативные участки, чередующиеся с переменными. Консервативные участки позволили подобрать олигонуклеотиды для анализа провируса лейкоза, независимо от распространенного изолята вируса. Переменные участки определяют антигенные свойства вируса, что является основанием для генотипирования вируса. В таблице показан набор праймеров, включающий три прямых, один обратный и две флуоресцентных пробы типа TagMan.

Название	5'-3' последовательность	Кол-во нкд	Длина ампликона
Праймер прямой env 5400 F	ttc-cct-ctg-tca-gat-cat-gg	20	220
Праймер обратный env 5620 R	gga-agg-gtg-gtg-cca-tc	17	
Флуоресцентная разрушаемая проба env 5441	(ROX)ct-acg-ggc-ctt-ccc-ag (RTQ2)	16	
Праймер прямой env 5442 F	cac-ggg-cct-tcc-cag-a	16	178
Праймер обратный env 5620 R	gga-agg-gtg-gtg-cca-tc	17	
Флуоресцентная разрушаемая проба env 5549	(FAM)ct-ccc-gga-cgc-cca-aa (RTQ1)	16	
Праймер прямой env F	aag-ggc-ggc-gcc-ggt-tt	17	

Для генотипирования в указанной области выбираются сайт-специфические праймеры (по 3'-концу), соответствующие участку gp51 внутри env-гена. Температура плавления линейной разрушаемой пробы TagMan должна быть на 3 – 5 °C выше чем у пары используемых праймеров. Несколько повышенная температура плавления пробы необходима для более прочной гибридизации данного олигонуклеотида с участком провирусной ДНК, так как только в этом случае проба удержится на матрице до начала ее 5'-экзонуклеазного разрушения *Taq*-полимеразой.

Рекомендуемые условия проведения реакции ПЦР-РВ.

№ п/п	Этап	Температура, °C	Время, сек	Количество циклов
1	Первичная денатурация	94	240	40
2	Денатурация	94	35	
3	Отжиг	68	30	
4	Элонгация	72	10	

При необходимости количество циклов увеличивается.

Результат применения подобранных праймеров при определении провируса ВЛКРС в образцах крови телят показан на Рисунке 7.

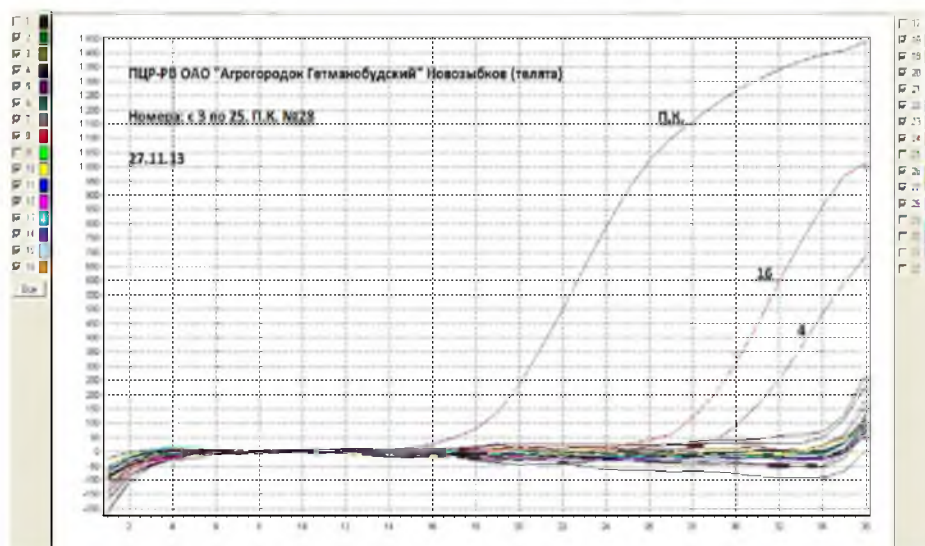


Рисунок 7 - Определение провируса ВЛКРС в образцах крови телят

Особенностью предлагаемого способа выявления провируса ВЛКРС с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени является наличие в наборе трех прямых, одного обратного праймеров и двух флуоресцентных разрушаемых проб внутри одной последовательности внутри гена *env*, что позволяет существенно повысить специфичность и точность реакции, а также чувствительность при определении малых доз провируса в образце.

2.2.3 Аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3* у быков-производителей черно-пестрой и голштинской пород из разных регионов

Основная разводимая в Брянской области порода КРС – черно-пестрая голштинизированная, сильно подвержена инфицированию вирусом лейкоза КРС. Изучение аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* быков-производителей черно-пестрой и голштинской пород имеет важнейшее значение для развития молочного животноводства.

Распределение частот аллелей *BoLA-DRB3*, ассоциированных с устойчивостью и восприимчивостью к лейкозу у изученных пород КРС, представлено в таблице 1: быки из 3 разных регионов имеют в совокупности 17 разных аллелей из 54 возможных. При этом наблюдается значительное преобладание в этих популяциях быков-производителей, несущих аллели восприимчивости к вирусу лейкоза. Наибольшее количество животных

несет аллели восприимчивости к вирусу лейкоза КРС *22, *24 и в меньшее количество быков - *8. Общее количество аллелей восприимчивости к лейкозу изменяется от 60,3% в Брянском стаде до 67,2% в Ленинградской области и до 70,8% у белорусских быков.

Таблица 1 - Частота встречаемости аллелей BoLA-DBD3 у быков черно-пестрой и голштинской пород

№ аллеля	Частота аллелей					
	ОАО «Брянское», (n = 29)		ОАО «Невское» (n=29)		«ЖодиноАгро ПлемЭлита» (n = 12)	
Аллели, определяющие чувствительность к лейкозу						
8	6,9	60,3	1,7	67,2	12,5	70,8
16	12		25,9		16,7	
22	19		13,7		8,3	
24	22,4		25,9		33,3	
Аллели, определяющие устойчивость к лейкозу						
11	8,6	19,1	1,7	12,1	4,2	8,4
23	8,6		6,9			
28	1,7		3,5		4,2	
Аллели, нейтральные по отношению к лейкозу						
3	1,7	20,6	12,1	20,7	12,4	20,8
7	6,9		0		0	
9	1,7		0		0	
10	1,7		6,9		0	
14	0		0		4,2	
18	1,7		0		0	
20	1,7		0		0	
27	0		0		4,2	
32	1,7		0		0	
37	3,5		1,7		0	
Все аллели			100			
H _o		0,897		0,793		0,917
H _e		0,872		0,821		0,816
D		0,028		-0,034		0,123
χ ²		0,000705		0,000935		0,012390

Анализ полученных данных приводит к выводу, что у быков-производителей черно-пестрой голштинизированной и голштино-фризской пород, принадлежащих госплемстанциям Брянской и Ленинградской областей и Беларуси, наблюдается резкий сдвиг в сторону аллелей чувствительности: 60,3%, 67,2% и 70,8% соответственно. Поскольку степень голштинизации самая низкая у брянских быков и самая высокая у белорусских быков, то можно сделать вывод о корреляции между уровнем голштинизации стада и количеством аллелей чувствительности.

Брянские и ленинградские быки имеют по 3 аллеля устойчивости к ВЛКРС, их количество невелико у брянских быков (19,1%), оно снижается почти в полтора раза у

ленинградских животных (12,1%). У быков из Беларуси выявлено 2 аллеля устойчивости к лейкозу, общее их количество составляет 8,4%.

Важное значение имеют данные по полиморфизму нейтральных аллелей – генотипирование животных показало, что при повышении степени голштинизации происходит не только уменьшение доли нейтральных и устойчивых аллелей, но и резкое сокращение их разнообразия. Общее количество нейтральных по отношению к вирусу лейкоза аллелей практически одинаково во всех 3 группах (20,6% – 20,8%), но важно отметить резкое уменьшение числа аллелей – так называемое «аллельное сужение»: от 8 в ОАО «Брянское» до 3 в остальных популяциях. Это очень опасная тенденция, поскольку ген *BoLA-DRB3* входит в главный комплекс гистосовместимости и определяет формирование гуморального и клеточного иммунитета не только на вирус лейкоза КРС, но и в ответ на другие патогенные микроорганизмы, в том числе вызывающие опасные заболевания – туберкулез, бруцеллез, мастит и др. Сужение аллельного спектра означает снижение защитной реакции организма на проникновение разных инфекционных микроорганизмов, что может привести к массовому распространению заболеваний, вызываемых этими патогенами.

Полученные результаты хорошо согласуются с результатами генетических исследований быков – производителей из племенных предприятий Ленинградской, Московской и Ростовской областей, Краснодарского края, Карелии и Финляндии (Ковалюк, 2008; Сацук, 2009; Мачульская, 2009).

В работе Сацука В.Ф. (2009) в группе из 293 голштинских быков из госплемстанций Краснодарского края, Ростовской и Ленинградской областей и Карелии было выявлено всего 25 аллелей гена *BoLA-DRB3*. При этом аллели, определяющие восприимчивость к вирусу лейкоза, имеют высокую частоту встречаемости, что говорит об их селекционной предпочтительности. В то же время значительная часть аллелей, связанных с устойчивостью или нейтральностью к ВЛКРС, находятся в процессе элиминации. По мнению автора, такая аллельная «узость» при высоком потенциале молочной продуктивности может привести к ограничению пределов компетентности иммунной системы у отдельных животных и стад в целом, и как следствие, сделать их уязвимыми перед внешними неблагоприятными воздействиями.

Масленников М.Г. (2005) также отмечает, что в изучаемых популяциях животных черно-пестрой породы наблюдается низкий уровень гетерогенности. По его мнению, чем выше степень «голштинизации» скота в хозяйстве, тем меньше вариантов аллелей гена *BoLA-DRB3*, и больше частота встречаемости аллелей чувствительности к лейкозу. Этот вывод подтверждается полученными нами результатами.

Быки-производители, несущие преимущественно аллели восприимчивости к лейкозу, не представляют угрозу для здоровья поголовья КРС в Ленинградской области и в Беларуси в связи с отсутствием возбудителя заболевания – в этих регионах добились полного оздоровления хозяйств от вируса лейкоза. В племенных хозяйствах Брянской области, в которых нет РИД-положительных животных, сперма быков, несущих аллели восприимчивости к вирусу, также не приведет к поражению стада лейкозом. Однако использование спермы изученных быков-производителей в племенных и товарных хозяйствах, где есть вирусоносители и больные животные, будет способствовать дальнейшему распространению болезни.

Для Брянской области, как и для подавляющего большинства регионов России, чрезвычайно опасно использование быков-производителей с генами восприимчивости к лейкозу, так как это приводит к накоплению в популяции КРС аллелей, подавляющих формирование защитных реакций и определяющих восприимчивость к вирусу лейкоза. При наличии ВЛКРС на фермах увеличение доли животных с аллелями чувствительности к вирусу приведет к постоянному росту вирусоносительства и появлению больных животных, что и наблюдается на животноводческих фермах в большинстве регионов страны. Поэтому для оздоровления от лейкоза поголовья КРС племенных и товарных хозяйств, разводящих черно-пеструю и голштинскую породу, необходима разработка системы мероприятий, учитывающих передачу от быков-производителей потомству преимущественно аллелей чувствительности к вирусу.

Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у быков-производителей разных пород Брянской области

В настоящее время в хозяйствах Брянской области разводят крупный рогатый скот следующих молочных пород: черно-пестрая, голштинская, швицкая, симментальская, красно-пестрая, и в 2010 году в регионе был начат масштабный проект по развитию мясного животноводства на основе коров абердин-ангусской породы. Основное количество животноводческих хозяйств молочного направления разводит коров черно-пестрой породы, животных остальных пород в области немного, поэтому ОАО «Брянское» имеет всего от 4 до 10 быков-производителей этих пород для получения спермы.

В таблице 3 представлены характер распределения и частота встречаемости аллелей гена BoLA-DRB3 у быков швицкой, симментальской, красно-пестрой и абердин-ангусской породы.

Частота встречаемости разных аллелей гена BoLA-DRB3
у быков разных пород Госплемстанции ОАО «Брянское»

Отношение к лейкозу	№ аллеля	Частота встречаемости разных аллелей BoLA-DRB3							
		Швицкая (n=10)		Симментальская (n=9)		Красно-пестрая (n=4)		Абердин-ангусская (n=4)	
		%	Всего, %	%	Всего, %	%	Всего, %	%	Всего, %
Чувствительность	8	-	5	5,5	33,3	-	12,5	-	12,5
	16	-		16,8		-			
	22	5		5,5		-			
	24			5,5		12,5			
Устойчивость	11	-	25	16,8	22,3	25	25	-	0
	23	20		-		-			
	28	5		5,5		-			
Нейтральные	1	-	70	5,5	44,4	12,5	62,5	12,5	87,5
	3	-							
	6	-		5,5		-			
	7	25		11,2		12,5			
	10	20		-		-			
	12					12,5			
	15	-		11,2		-			
	18	-		5,5		-			
	20	10		-		-			
	27	5		-		-			
	35	-		-		12,5			
	37	5		-		-			
	44	-		5,5		-			
49	5	-	-						

Небольшое количество быков – производителей этих пород не позволяет сделать достоверный вывод о характерном для этих пород распределении аллелей гена BoLA-DRB3, на основании проведенных исследований можно говорить только об некоторых особенностях генетической структуры брянского стада быков-производителей. Так, достоверным является преобладание нейтральных аллелей по сравнению с черно-пестрой породой: у быков швицкой породы нейтральные аллели составляют 70%, симментальской – 44,4%, красно-пестрой 62,5%, абердин-ангусской – 87,5%, в то время как в трех группах быков черно-пестрой породы было 20,6% - 20,8% нейтральных аллелей. Примерно четверть аллелей составляют аллели устойчивости, кроме абердин-ангусской породы, у которой такие аллели не обнаружены. Интересно отметить также очень низкий уровень аллелей чувствительности (5%) у быков швицкой породы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана методика молекулярно-генетического анализа люпина для выявления у растений разных сортов и видов люпина ДНК-маркеров на устойчивость к антракнозу, что позволит проводить отбор перспективных генотипов с потенциальной устойчивостью к грибу *Colletotrichum*. Использование ДНК-маркеров на устойчивость к антракнозу позволило провести анализ 50 сортов и сортообразцов люпина узколистного российской, белорусской, украинской, польской и австралийской селекции, сравнение их генетического полиморфизма и наличия маркеров устойчивости к антракнозу. На основе этих маркеров селекционерами будут выделены формы люпина, имеющие генетическое сходство с устойчивыми к антракнозу австралийскими образцами. Молекулярные ДНК-маркеры будут использованы в совместной работе с селекционерами ВНИИ люпина и НПЦ по земледелию НАН Беларуси для направленной селекции люпина на устойчивость к антракнозу и создания на этой основе новых, высокопродуктивных и устойчивых сортов люпина.

Разработана тест-система экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС на основе ДНК-технологий. Подана заявка на получение патента на изобретение «Набор олигонуклеотидов-праймеров для определения провируса лейкоза крупного рогатого скота». Разработанная тест-система экспресс-диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС будет использована для раннего выявления животных – вирусоносителей, в том числе у новорожденных телят сразу после отела (обычно их не более 1-5%), последующего формирования безвирусного ремонтного поголовья крупного рогатого скота от лейкоза, и выращивания ремонтного молодняка, свободного от ВЛКРС. Тест-система для диагностики ВЛКРС будет использована в животноводческих хозяйствах Брянской и соседних областей ЦФО.

Результаты анализа аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* у быков-производителей Брянской области являются основой для планирования племенной работы по обогащению поголовья КРС Брянской области аллелями устойчивости к ВЛКРС и повышению генетической устойчивости стад КРС к вирусу лейкоза. Оценка потенциала быков - производителей из разных племпредприятий как доноров генетической устойчивости к ВЛКРС позволяет направленно использовать быков при разведении скота, устойчивого к лейкозу.

Результаты проекта используются в учебном процессе. Методы ДНК-маркирования устойчивости к антракнозу у разных сортов люпина с использованием ПЦР, а также метод ПЦР-РВ для выявления вирусоносительства у коров использованы на лабораторно-

практических занятиях по дисциплинам «Биотехнология растений», «Биотехнология животных», «Генетика», «Ветеринарная биотехнология» по бакалавриату «Биотехнология». Выполнены курсовые и дипломные работы на базе ВНИИ люпина и племенных и товарных хозяйств области.

Полученные результаты представлены в статьях в российских изданиях, в том числе в журналах из списка ВАК, в статьях в зарубежных изданиях, в том числе СКОПУС и Web of Science, в диссертационных работах аспирантов, в научно-технических отчетах, в докладах на всероссийских и международных конференциях, на выставках и конкурсах работ, в том числе конкурсах молодых ученых, в патентах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ахмедов Р.Б., Нам И.Я., Заякин В.В. Молекулярно-генетические подходы к решению проблемы оздоровления поголовья крупного рогатого скота от персистентного лимфоцитоза вызванного Bovine leukemia virus (Retroviridae). Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы химии и биологии». – Пушкино, FixPrint, 2014. С. 6
2. Гришин С.Ю., Заякин В.В., Нам И.Я. Аллельный полиморфизм ДНК-маркеров устойчивости к антракнозу AntjM1, AntjM2, у российских и белорусских сортов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* (L.)). Достижения і проблеми генетики, селекції, та біотехнології: зб. наук. пр. НАН України, НААН України, НАМН України, Укр. т-во генетиків и селекціонерів ім. М.І. Вавилова. Київ, 2012, 4: 291-295.
3. Джапаралиев Н.Т. Молекулярно-биологические методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота. дис. ... к. б. н. / Н.Т. Джапаралиев ; ФГУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных – Владимир, 2002. - 113 с.
4. Евсиков Д.О., Иванюк В.Г. Антракноз люпина и меры борьбы с ним. Весці Акадэміі аграрных навук Рэспублікі Беларусь, 2001, 4: 57-64.
5. Ковалюк Н. В. Молекулярно-генетические аспекты в селекции и ранней диагностике лейкоза крупного рогатого скота: дис. ... докт. биол. наук. Краснодар, 2008. 174 с.
6. Краевская В.А. Особенности развития антракноза на узколистном люпине. Биология и совершенствование агротехники сельскохозяйственных культур, 2010, 11: 70-72.
7. Купцов Н.С., Такунов И.П. Люпин. Генетика, селекция, гетерогенные посевы. Клинцы, 2006.
8. Купцов Н. С., Шор В. Ч., Ю. К. Шашко. Антракноз люпина и как с ним бороться. Белорусское сельское хозяйство, 2010, 7: 20-23
9. Масленников М.Г. Использование генотипирования по локусу BoLa DRB3 в селекции крупного рогатого скота на устойчивость к персистентному лимфоцитозу: дис. ... канд. биол. наук. Краснодар, 2005. 91 с.
10. Мачульская Е.В. Уровень молочной продуктивности коров голштинской породы черно-пестрой масти различных генотипов по локусам BoLA DRB3 и каппа-казеина: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь, 2009. 23 с.
11. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. / Под. ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с., ил.

12. Нам И.Я., Смазнова И.А., Кожевина О.А., Козлов А.Л., Заякин В.В., Изучение генетической устойчивости к лейкозу крупного рогатого скота методом ПЦР-ПДРФ: на примере популяции КРС Брянской области // Сборник трудов первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». Санкт-Петербург. 2010. С.249-251.
13. Нам И.Я., Козлов А.Л., Смазнова И.А., Заякин В.В. Анализ полиморфизма гена VOLA-DRB3 у симментальской породы крупного рогатого скота // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. т. 13, №5(3) С. 248-250.
14. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР в реальном времени. – М., Издательство: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009, - 223 с. ил.
15. Рузина М.Н. Анализ полиморфизма гена VOLA-DRB3 в связи с генетической устойчивостью крупного рогатого скота к лейкозу и вирусоносительством. дис. ... к. б. н. / М.Н. Рузина ; ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук – М., 2012. - 142 с.
16. Сацук В.Ф. Использование маркера VoLA-DRB3 в селекционно-племенной работе с крупным рогатым скотом: дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь, 2009. 118 с.
17. Смазнова И.А., Козлов А.Л., Заякин В.В., Нам И.Я. Аллельный анализ гена VOLA-DRB3 в стадах крупного рогатого скота Брянской области // Вестник Брянского государственного университета. 2010. № 4: Точные и естественные науки. Брянск: РИО БГУ. С. 227-232.
18. Смазнова И.А., Аксенова Е.Н., Козлов А.Л. Анализ генетического разнообразия крупного рогатого скота разных пород Брянской области и Беларуси по гену VOLA-DRB3, кодирующему устойчивость КРС к лейкозу // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Трансфер инновационных биотехнологий в растениеводстве, животноводстве, медицине, экологии». Брянск 2012 г., изд. БГУ.
19. Смазнова И.А., Немцова К.Н., Заякин В.В., Нам И.Я. Анализ генетического потенциала племенных быков Брянской области по гену VoLA-DRB 3 // Факторы экспериментальной эволюции организмов. Сборник научных трудов. Киев: Логос. 2013. т.13 С. 99-105.
20. Смазнова И.А., Нам И.Я., Заякин В.В., Козлов А.Л. Полиморфизм гена VoLA-DRB3 у коров разных пород Брянской области // Научное обеспечение инновационного развития животноводства. Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции. 24-25 октября. 2013 Жодино с. 144-146

21. Сулимова Г.Е. (1993) Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ДНК сельскохозяйственных животных: методология, результаты и перспективы. Успехи соврем. генетики. Вып.18:3-35.
22. Сулимова Г.Е., Удина И.Г., Шайхаев Г.О., Захаров И.А. ДНК-полиморфизм гена BoLA-DRB3 у крупного рогатого скота в связи с устойчивостью и восприимчивостью к лейкозу // Генетика. - 1995. - Т. 31. - №9. - С. 1294 — 1299
23. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. – М., ВНИТИБП, 2001. - 928 с., ил.
24. Удина И.Г., Карамышева Е.Е., Сулимова Г.Е., Павленко С.П., Туркова С.О., Орлова А.Р., Эрнст Л.К. Сравнительный анализ айширской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота по маркерам гитсосовместимости // Генетика. - 1998. - Т.34. - №12. - С. 1668-1674.
25. Удина И.Г., Карамышева Е.Е., Туркова С.О., Орлова А.Р., Сулимова Г.Е. Генетические механизмы устойчивости и чувствительности к лейкозу у айширской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота, установленные на основе распределения аллелей гена BoLA-DRB3 // Генетика. - 2003. - Т. 39. - №3. - С. 383-396.
26. Шилова Н.В., Золотухина Т.В. Интерфазная флуоресцентная гибридизация *in situ* в диагностике числовых хромосомных aberrаций// Медицинская генетика - 2007 . - Т.6, В.10. - С.53-58
27. Buirchell B.J., Yang H. Breeding Narrow-leafed Lupins in Western Australia for Yield, Disease Resistance and Quality Using Recurrent Selection and Molecular Markers. Mexico, Where Old and New World Lupins Meet. Proceedings of the 11th International Lupin Conference, Guadalajara, Jalisco, Mexico. May 4 - 9, 2005. ILA, Canterbury, New Zealand. : 10 - 13.
28. Cowling W.A. Pedigrees and characteristics of narrow-leafed lupin cultivars released in Australia from 1967 to 1998. Bulletin 4365, Agriculture Western Australia, 1999.
29. Yang H., Boersma J.G., You M. e.a. Development and implementation of a sequence-specific PCR marker linked to a gene conferring resistance to anthracnose disease in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Molecular Breeding, 2004, 14: 145-151.
30. You M., Boersma J. G., Buirchell B.J. e.a. A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding. Cellular and molecular biology letters, 2005, 10: 123–134.
31. Yang H., Tao Y., Zheng Z. e.a. Application of next-generation sequencing for rapid marker development in molecular plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance

in *Lupinus angustifolius* L. BMC Genomics, 2012, 13:318.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/318>

32. Yang H., Renshaw D., Thomas G. e.a. A strategy to develop molecular markers applicable to a wide range of crosses for marker assisted selection in plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Molecular Breeding, 2008, 21: 473-483.

33. M L Mirsky, C Olmstead, Y Da, H A Lewin. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle // Animal Genetics. - 1998. - V.29 - P.245-252.

34. Nam I.Ya., Zayakin V.V., Smaznova I.A., Egiazaryan A.V., Sulimova G.E., Sheiko I.P., Budevich A.I. High Genetic Susceptibility to Leukemia in Breeding Black Pied and Holstein Cattle // Middle-East Journal of Scientific Research. 2014. V.20 (10). P. 1297-1301

35. Nirenberg H.I., Feiler U., Hagedorn G. Description of *Colletotrichum lupini* comb. Nov. in modern terms. Mycologia, 2002, 94: 307-320.

36. Ruge-Wehling B., Dieterich R., Thiele C. e.a. Resistance to anthracnose in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.): sources of resistance and development of molecular markers. Journal für Kulturpflanzen, 2009, 61: 62-65.