

PRODUCTION TECHNOLOGY OF BALANCING FEED SUPPLEMENTS*Kosov M., Institute of animal science NAAS*

The feed supplements production technology at the proposed organizational and technological scheme of feed production was proved. The results of the technical means design based on convenient, easy to manage feed production line were described. The results of the development of technical means based on the creation of a convenient, easy to operate and service technological line of animal feed and protein-vitamin-mineral supplements production were described.

Key words: agriculture, few components feed, balancing supplements, protein-vitamin-mineral supplements production line.

УДК 636.52/. 58:575

УТВОРЕННЯ ГЕТЕРОДУПЛЕКСНОЇ ДНК ПРИ АМПЛІФІКАЦІЇ ФРАГМЕНТІВ ГЕНІВ *TGF-β2* ТА *CHD* У ПТАХІВ**Кулібаба Р. О., к. с.-г. н.**

Державна дослідна станція птахівництва НААН

*Розглянуто питання про утворення гетеродуплексної ДНК в процесі ПЛР. З'ясовано, що при ампліфікації фрагментів різних алелів генів *CHD* (генотип *CHD-Z/CHD-W*) та *TGF-β2* (генотип *BL*) утворюється гетеродуплексна ДНК, у той час як при ампліфікації гомозиготних зразків утворення гетеродуплексів не відбувається. Показана можливість використання гетеродуплексів як додаткового маркера, який вказує на генотип *CHD-Z/CHD-W* при визначенні статі птиці за допомогою праймерів *P2P8*, що істотно збільшує ефективність сексування. На основі гетеродуплексного аналізу запропоновано альтернативний ПЛР-ПДРФ метод генотипування особин курей за локусом *TGF-β2*, який дозволяє успішно визначати гомозиготні (*BB*, *LL*) та гетерозиготні (*BL*) генотипи.*

Ключові слова: артефакти, полімеразна ланцюгова реакція, гетеродуплекси, рестрикція, поліморфізм.

Питання про утворення артефактів у процесі полімеразної ланцюгової реакції відноситься до числа найбільш актуальних у практиці молекулярної генетики, яка активно використовує різноманітні варіації ПЛР для вирішення широкого кола задач [1, 2]. Недостатня увага до цього питання може призводити до помилок в інтерпретації результатів досліджень, а також до хибного розуміння загальної картини в цілому [3]. Артефакти, що утворюються, як правило, визначаються властивостями самих нуклеїнових кислот, особливостями їх складу, конформації, концентрації тощо. Для пояснення причин утворення артефактів слід розуміти відмінності між процесами реплікації *in vivo* та ампліфікацією *in vitro*, які, незважаючи на всю свою схожість, досить відрізняються один від одного [4]. Так, на наш погляд, основна фундаментальна відмінність – це відсутність систем репарації ДНК при ампліфікації *in vitro*. Саме відсутність систем репарації й призводить до виникнення різних варіацій якісного складу та конформаційних взаємодій ампліфікованих фрагментів. Як правило, артефакти ПЛР ускладнюють проведення аналізу, однак, у деяких випадках даний феномен може бути використаний на користь. Саме розгляду питання про використання артефактів ампліфікації у якості додаткового інструменту ефективного генотипування при вирішенні питання визначення статі птиці з неви-



раженим статевим диморфізмом та визначенні поліморфізму гену *TGF-β2* в популяціях курей і присвячена дана робота.

Ефективний метод визначення статі птиці з використанням полімеразної ланцюгової реакції було запропоновано у середині 90-х років Грифітсом зі співавторами [5]. Метод оснований на поліморфізмі гену *CHD* (*Chromo-Helicase DNA*), алельні варіанти якого різняться у Z та W хромосомах [6]. Відмінності у довжині ампліфікованих фрагментів *CHD-Z* та *CHD-W* варіюють у межах різних видів птиць та визначаються з використанням агарозних та поліакриламідних гелів різних концентрацій [7, 8]. Метод достатньо універсальний та підходить для переважної більшості різних видів птахів (виняток складають переважно безкілеві) [9]. У лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики ДДСП НААН даний метод успішно застосовується в першу чергу для сексування птиць ряду *Psittaciformes* [10].

Однак, незважаючи на усі переваги, даний метод має певні недоліки. У деяких видів птиць різниця у розмірі ампліконів *CHD-Z/CHD-W* настільки мала, що навіть використання поліакриламідних гелів часто не дозволяє впевнено інтерпретувати результати [6]. На практиці це виражатиметься у недостатньому розходженні ампліфікованих фрагментів *CHD-Z* та *CHD-W*, що призводить до хибних (помилкових) результатів сексування. Так як даним методом сексують у першу чергу декоративну птицю, то ціна помилки може бути дуже висока у зв'язку з високою вартістю особин. Тому пошук різних можливостей, що дозволяють збільшити ефективність сексування, дуже актуальний.

До одного з найбільш широко розповсюджених методів визначення одонуклеотидного поліморфізму в сайтах рестрикції як цільових генів, так і практично будь-яких фрагментів геному (що утримують поліморфний сайт рестрикції), відноситься ПЛР-ПДРФ. Однак, незважаючи на всю простоту використання, даний метод має певні недоліки, один із яких – висока вартість ендонуклеаз рестрикції. Тому, при проведенні масштабних генотипувань, використання альтернативних підходів, які б істотно зменшували матеріальні затрати, відноситься до першочергових задач. Виходячи з цього, друга задача запропонованого дослідження пов'язана з пошуком альтернативного ПЛР-ПДРФ методу генотипування особин курей на прикладі локусу *TGF-β2*.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили в лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Державної дослідної станції птахівництва Національної академії аграрних наук України. Для проведення досліджень використовували курей вітчизняної селекції породи бірквіська барвистая (n=100), а також представників видів *Psittacus erithacus* (n=28), *Cacatua moluccensis* (n=14), *Ara macao* (n=18), *Ara chloroptera* (n=11) та *Ara nobilis* (n=17).

В якості джерела біологічного матеріалу використовували пир'я. Виділення ДНК із дослідних зразків проводили за допомогою комерційного набору реагентів «ДНК-сорб-В» («Амплиценс», РФ).

Ампліфікацію проводили з використанням реагентів DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific) на програмованому термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», РФ) за відповідними програмами: 1 цикл – денатурація 94°C 3 хв.; 35 циклів – денатурація 94°C 1 хв., віджиг 1 хв. (48°C для *CHD*; 52°C для *TGF-β2*), елонгація 72°C 1 хв.; 1 цикл – фінальна елонгація 72°C 10 хв. Об'єм кінцевої суміші становив 20 μL, концентрація праймерів – 0,2 μM у кожному випадку.

Ампліфікацію проводили з використанням наступних праймерів:



CHD – P2 F:5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3' та P8 R:5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3' [5]; *TGF-β2* – F:5'-GCCATAGGTTCAGTGCAAG-3' та R:5'-TGACAGAAGCTCTCAAGCC-3' [11].

Обробку ампліфікованих фрагментів гену *TGF-β2* проводили ендонуклеазою рестрикції *RsaI* згідно зі стандартними методиками виробника (Thermo Scientific). Продукти рестрикції розділяли у 1,5 % агарозному гелі за напруги 150 V протягом 40 хв. та в 6 % поліакриламідному гелі за напруги 250 V протягом 180 хв. Візуалізацію проводили з використанням бромистого етидію в ультрафіолетовому спектрі. При використанні поліакриламідного гелю також проводили фарбування сріблом. Розмір рестрикційних фрагментів визначали з використанням маркеру молекулярних мас М-50 (Ізоген, РФ).

Генотипування за кожним із локусів проводили за допомогою аналізу отриманих електрофореграм. У випадку з геном *CHD* порівнювали загальне положення ампліконів один відносно одного. Генотип *CHD-Z/CHD-Z* представлений на електрофореграмі у вигляді одного фрагменту; генотип *CHD-Z/CHD-W* – у вигляді двох. Розміри фрагментів варіюють у залежності від виду птиці.

Ген *TGF-β2* (транзиція Т/С в положенні -640) – розмір ампліфікованого фрагменту 284 п.н. Алель В представлений на електрофореграмі у вигляді фрагментів ДНК розміром 100 та 184 п.н.; алель L – 284 п.н.; гетерозиготи В/L – 100, 184 та 284 п.н.

Результати досліджень. Визначення статі птиці з невираженим статевим диморфізмом із використанням методу полімеразної ланцюгової реакції – задача досить нетривіальна, однак, незважаючи на всі складності, не має альтернативних варіантів. До однієї з основних проблем відноситься варіативний розмір інсерції в гені *CHD* у різних видів птиці. Так, наприклад, різниця у довжині ампліконів *CHD-Z* та *CHD-W* у представників виду *Psittacus erithacus* досить виражена, що дозволяє безпомилково сексувати особин із використанням 1,5 % агарозних гелів (рис. 1).

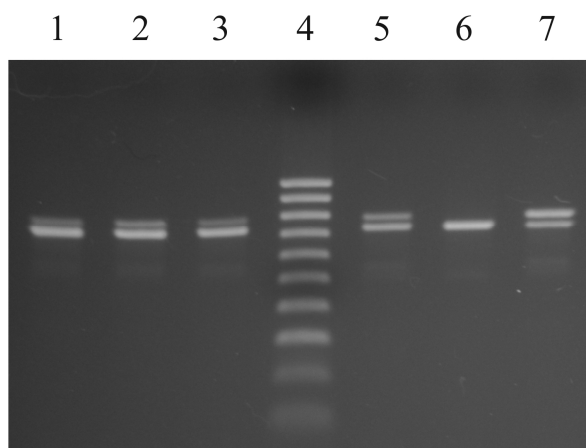


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагменту гену *CHD* у представників виду *Psittacus erithacus*. 1-3, 5, 7 – *CHD-Z/CHD-W*; 6 – *CHD-Z/CHD-Z*; 4 – маркер молекулярних мас.

Однак розбіжності між ампліконами у представників родини *Musophagidae* менш виражені, що призводить до необхідності використання концентрованих до 4 – 5 % агарозних гелів. Також представників виду *Cacatua galerita* можливо успішно сексувати тільки при використанні поліакриламідних гелів (ПААГ). Таким чином, успішне сексування особин різних видів можливо при використанні достатньо широкого арсеналу методів електрофорезу в гелі. Однак, незважаючи на високу



роздільну здатність ПААГ у деяких випадках, за наявності мінімальної різниці між ампліконами, інтерпретація результатів електрофорезу декілька ускладнена, внаслідок «злиття» близьких за розміром фрагментів ДНК один із одним. У результаті з'являється достатньо висока вірогідність невірної сексування, так як відрізнити фрагменти CHD-Z та CHD-W у цьому випадку не є можливим. Виходом із цієї ситуації може бути аналіз гетеродуплексної ДНК, що утворюється в процесі ампліфікації.

У результаті проведених досліджень з'ясовано, що при ампліфікації CHD-Z та CHD-W (генотип самки) одночасно з цільовими фрагментами (безпосередньо CHD-Z та CHD-W) утворюється гетеродуплексна ДНК, у той час як при ампліфікації CHD-Z (генотип самця) утворення гетеродуплексів не відбувається. Генотип CHD-Z/CHD-W функціонально можна представити як гетерозиготу, тому гетеродуплекси містять ланцюги CHD-Z та CHD-W. Причому гетеродуплекси утворюються двох типів – у першому випадку смисловий ланцюг гетеродуплексу – CHD-Z; антисмисловий – CHD-W. У другому випадку смисловий ланцюг гетеродуплексу – CHD-W, антисмисловий – CHD-Z. Відмінності в електрофоретичній рухливості гетеродуплексів та цільових фрагментів дозволяють достатньо просто їх розрізнити (рис. 2).

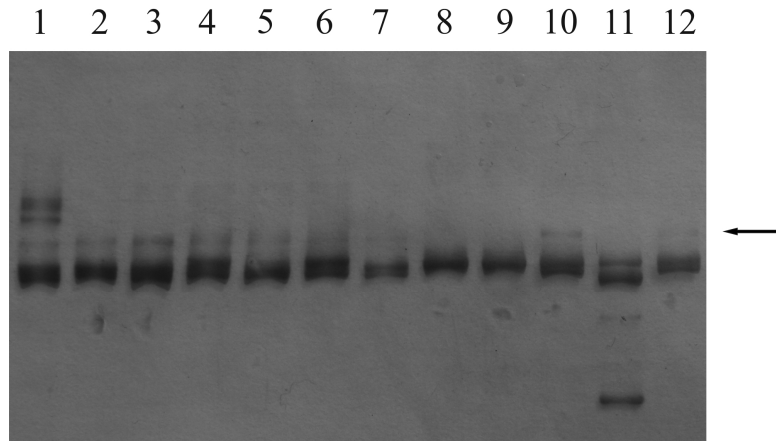


Рис 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагменту гену *CHD* у представників різних видів птахів у ПААГ (стрілочкою вказано гетеродуплекси). 1 – 7, 10 – 12 – CHD-Z/CHD-W; 8, 9 – CHD-Z/CHD-Z.

Для підтвердження природи гетеродуплексів як гібридних молекул, які складаються з ланцюгів CHD-Z та CHD-W, провели вирізання з гелю даних фрагментів із їх подальшою ампліфікацією. У результаті були отримані цільові фрагменти та гетеродуплекси, що однозначно підтверджує наведене вище припущення. Наявність гетеродуплексів на електрофореграмі можна використовувати як додаткове підтвердження генотипу CHD-Z/CHD-W (самка), що особливо актуально у випадку «злиття» ампліфікованих фрагментів.

Гетеродуплексна ДНК утворюється в процесі ампліфікації внаслідок багатьох циклів денатурації/ренатурації. Вірогідність формування гетеродуплексів зростає зі збільшенням кількості циклів, при цьому візуалізація цих продуктів можлива тільки при певних умовах (нативний ПААГ, концентрація гелю, метод фарбування тощо). Однак наявність гетеродуплексної ДНК завжди вказує на гетерозиготний зразок (наявність декількох алелів у одній пробі).

Перейдемо тепер до другої задачі нашого дослідження.

Як вже було зазначено, гетеродуплексна ДНК утворюється в результаті ампліфікації тільки гетерозиготних зразків, що дає додаткові можливості для проведення ефективного генотипування. Так, наприклад, актуальним є використання гете-



родуплексного аналізу в якості альтернативи рестрикційному. Застосування даного підходу дозволяє істотно знизити витрати на проведення аналізу за рахунок економії коштів на придбання ендонуклеаз рестрикції, а також зменшити витрати часу.

Загальний принцип методу, який пропонується, наступний. При змішуванні еталонного зразку (ампліфікований зразок ДНК, що утримує певну мутацію) з дослідним зразком та наступною денатурацією (94°C) з подальшою ренатурацією при кімнатній температурі, при наявності відмінностей у нуклеотидних послідовностях еталонного та дослідного фрагментів, утворюються гетеродуплексні молекули. При повному збігу нуклеотидних послідовностей зразків, які порівнюються, утворення гетеродуплексів не відбувається. В якості еталонного зразку доцільно використовувати ампліфікований фрагмент гомозиготної за цільовим геном особи. Для *TGF-β2* це буде генотип ВВ. Кожну пробу розділяють на дві рівні частини, при цьому одну змішують із еталонним зразком ВВ з подальшим термостатуванням (як описано вище), другу – безпосередньо переносять на електрофорез. Утворення гетеродуплексів тільки у змішаній пробі вказує на генотип дослідної проби – LL; утворення гетеродуплексів як в змішаній, так і в вихідній пробі – генотип ВL; відсутність гетеродуплексів – ВВ (рис. 3).

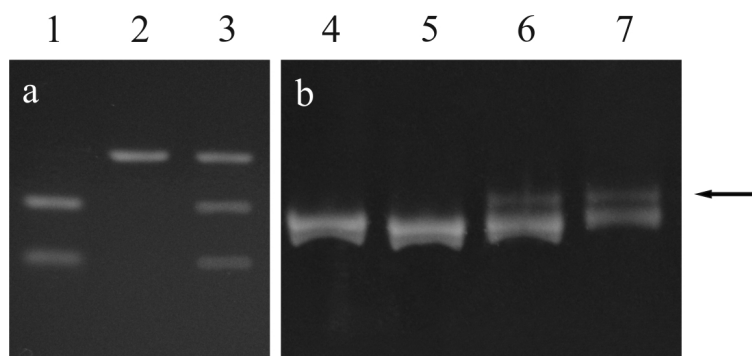


Рис. 3. Порівняння результатів рестрикційного (а) та гетеродуплексного (б) аналізів (стрілочкою вказано гетеродуплекси). 1, 4 – генотип ВВ; 2, 5 – LL; 3, 6 – ВL; 7 – ВВ + LL (термостатування)

Відповідність результатів гетеродуплексного аналізу рестрикційному при генотипуванні становило сто відсотків, що безпосередньо дозволяє використовувати цей метод для проведення подальшої роботи.

Враховуючи зазначене, перспективним напрямком подальших досліджень має бути підбір умов для проведення гетеродуплексного аналізу як альтернативного варіанту ПЛР-ПДРФ для інших локусів в умовах достатньо великих об'ємів роботи (генотипування декількох сотень зразків).

Висновки:

1. Утворення гетеродуплексів у процесі ампліфікації можна використовувати як додатковий маркер, що вказує на наявність двох різних алелів у пробі при визначенні статі птиці з використанням праймерів P2P8.

2. Запропонований метод гетеродуплексного аналізу при генотипуванні особин курей за локусом *TGF-β2* є ефективною альтернативою ПЛР-ПДРФ та дозволяє визначати гомозиготні (ВВ, LL) та гетерозиготні (ВL) генотипи особин.

3. Перспективним напрямком подальших досліджень є підбір умов для проведення гетеродуплексного аналізу як альтернативного варіанту ПЛР-ПДРФ для низки інших локусів.



Бібліографічний список

1. Омашева М. Е. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования / М. Е. Омашева, К. П. Аубакирова, Н. А. Рябушкина // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – № 4. – С. 20 – 28.
2. Heteroduplex formation: a potential source of genotyping error from PCR products / S. L. S. Hatcher, Q. T. Lambert, R. L. Teplitz [et al.] // Prenatal diagnostic. – 1993. – Vol. 13. – P. 171 – 177.
3. Nagamine C. M. A PCR artifact: generation of Heteroduplexes / C. M. Nagamine, K. Chan, Y.C. Lau // Am. J. Hum. Genet. – 1989. – Vol. 45. – P. 337 – 339.
4. Elizabeth van Pelt-Verkuil. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification / Elizabeth van Pelt-Verkuil, Alex van Belkum, John P. Hays // Springer Science. – 2007. – 329 p.
5. A DNA test to sex most birds / R. Griffiths, M. C. Double, K. Orr [et al.] // Molecular Ecology. – 1998. – V. 7. – P. 1071 – 1075.
6. Kahn N. W. Chromosome-specific Intron Size Differences in the Avian CHD Gene Provide an Efficient Method for Sex Identification in Birds / N. W. Kahn, J. ST. John, T. W. Quinn // The Auk. – 1998. – V. 115 (4). – P. 1074 – 1078.
7. Cerit H. Sex identification in avian species using DNA typing methods / H. Cerit, K. Avanus // World's Poultry Science Journal. – 2007. – V. 63. – P. 91 – 99.
8. Dubiec A. Molecular techniques for sex identification in birds / A. Dubiec, M. Zagalska-Neubauer // Biological lett – 2006. – V. 43 (1). – P. 3 – 12.
9. Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: perspectives for wild and captive population studies / C. Y. Miyaki, R. Griffiths, K. Orr [et al.] // Zoo Biology. – 1998. – V. 17. – P. 415 – 423.
10. Кулибаба Р. А. Определение пола птиц отряда *Psittaciformes* с использованием полимеразной цепной реакции / Р. А. Кулибаба, Ю. В. Ляшенко // Молекулярная диагностика 2014. Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2014. – Том 2. – С. 517 – 518.
11. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with transforming growth factor- β genes / H. Li, N. Deeb, H. Zhou [et al.] // Poultry science. – 2003. – Vol. 82. – P. 347 – 356.

ОБРАЗОВАНИЕ ГЕТЕРОДУПЛЕКСНОЙ ДНК ПРИ АМПЛИФИКАЦИИ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ *TGF- β 2* И *CHD* У ПТИЦ

Кулибаба Р. А., Государственная опытная станция птицеводства НААН

Рассмотрен вопрос об образовании гетеродуплексной ДНК в процессе ПЦР. Выяснено, что при амплификации фрагментов разных аллелей генов *CHD* (генотип *CHD-Z/CHD-W*) и *TGF- β 2* (генотип *BL*) образуется гетеродуплексная ДНК, в то время как при амплификации гомозиготных образцов образования гетеродуплексов не происходит. Показана возможность использования гетеродуплексов как дополнительного маркера, указывающего на генотип *CHD-Z/CHD-W* при определении пола птиц с помощью праймеров *P2P8*, что существенно увеличивает эффективность сексирования. На основе гетеродуплексного анализа предложен альтернативный ПЦР-ПДРФ метод генотипирования особей кур по локусу *TGF- β 2*, который позволяет успешно определить гомозиготные (*BB*, *LL*) и гетерозиготные (*BL*) генотипы.

Ключевые слова: артефакты, полимеразная цепная реакция, гетеродуплексы, рестрикция, полиморфизм.



THE HETERODUPLEXES DNA FORMATION IN THE TGF- β 2 AND CHD GENE FRAGMENTS AMPLIFICATION IN BIRDS

Kulibaba R. O., State Poultry Research Station of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

The process of heteroduplex DNA formation during the PCR was examined. In the amplification of fragments of different alleles of CHD (genotype CHD-Z/CHD-W), and TGF- β 2 (genotype BL) genes the heteroduplex DNA were formed, whilst during the homozygous samples amplification the heteroduplex were not formed. The possibility of using of heteroduplexes as an additional CHD-Z/CHD-W genotype indicated marker for sex of birds determination by the P2P8 primers was shown, which significantly increases the sexing efficiency. On the basis of heteroduplex analysis an alternative method for PCR-RFLP genotyping of chicken by TGF- β 2 locus was proposed, which allows to successfully identify homozygous (BB, LL) and heterozygous (BL) genotypes.

Key words: artifacts, polymerase chain reaction, heteroduplexes, restriction, polymorphism.

УДК 636.52/. 58:575:636.592.082

МЕТОДИЧНІ АСПЕКТИ ВИКОРИСТАННЯ RAPD-ТЕХНОЛОГІЇ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГУСЕЙ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Ляшенко Ю. В., к. с.-г. н.

Державна дослідна станція птахівництва НААН

Показана ефективність використання агарозного гель-електрофорезу в якості експрес-методу оцінки поліморфізму в RAPD-спектрах ампліфікації фрагментів геному гусей. Виявлено високий рівень поліморфізму RAPD-локусів (81-93 %) у племінних стадах Великих сірих і Великих білих гусей української селекції. Використані в дослідженнях 7 довільних праймерів (OPA-01, OPC-05, OPC-07, OPC-09, OPC-19, OPF-01, OPG-03) є ефективними для генетичної диференціації гусей як на породному, так і видовому рівнях. Аналіз RAPD-профілів обох популяцій гусей виявив 58 % спільних локусів, що підтверджує спорідненість їх походження.

Ключові слова: породи гусей, RAPD-локуси, генетична мінливість, поліморфізм, полімеразна ланцюгова реакція, агарозний гель.

Вважається, що першими одомашненими сільськогосподарськими тваринами були представники ряду гусеподібних (*Anseriformes*) родини качкових (*Anatidae*) – гуси, які за сучасною систематикою відносяться до роду *Anser* і нараховують декілька видів. Предками переважної більшості свійських порід гусей були два основних види – дика сіра гуска (*Anser anser*), що мешкає в Євразії, та гуска-сухоніс (*Anser cygnoides*), ареал якої знаходиться в східній частині Сибіру, в північному Китаї та Монголії. За даними FAO (Продовольча й сільськогосподарська організація Об'єднаних Націй) генетичні ресурси гусей нараховують близько ста порід та генетичних груп [1]. Найбільша кількість порід гусей виведена в Китаї на основі *Anser cygnoides* (24). В Європейських країнах породи створювались переважно з використанням *Anser anser*. До бази даних FAO занесено 13 порід російського походження, 11 – польського, по 7 французького й німецького, 5 – українського, по 1 – італійського, данського, угорського, чехословацького, англійського. Проте лише незначна кількість порід має комерційну привабливість. Всесвітньо відомими стали такі породи: