

УДК 619:618.1–074:616.711:636.2

ВОЛКОВ С.С., ЛОТОЦЬКИЙ В.В., кандидати вет. наук
Білоцерківський національний аграрний університет

ПЛР-ДІАГНОСТИКА *BLAD* ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ТА ОСОБЛИВОСТІ ПОДВІЙНОГО НОСІЙСТВА СПАДКОВИХ ХВОРОБ

У статті наведено методику та результати апробації лабораторної діагностики синдрому дефіциту адгезійності лейкоцитів великої рогатої худоби (*BLAD*) методом полімеразної ланцюгової реакції. З 57 бугаїв-плідників, що підлягали дослідженню, три виявилися гетерозиготними носіями цієї хвороби. Разом з тим, ці тварини були носіями комплексного пороку хребта (*СVM*). Окреслено напрями і перспективи подальших досліджень та актуальність впровадження ПЛР-діагностики спадкових хвороб в андрологічну диспансеризацію та практику ветеринарної медицини.

Ключові слова: бугаї, синдром дефіциту адгезійності лейкоцитів, діагностика, полімеразна ланцюгова реакція.

Постановка проблеми. Вивчення досвіду скотарства у ряді країн світу показало надзвичайну актуальність проблеми носіїв спадкових хвороб. Широке застосування біотехнологічних методів відтворення, особливо штучного осіменіння і трансплантації ембріонів, дозволяє прискорити темпи ведення селекційно-племінної роботи та поширення господарсько-корисних ознак тварин. Але не тільки господарсько-корисних. Адже за умови виникнення серед племінних тварин носіїв спадкових хвороб біотехнологічні методи можуть забезпечити таке ж інтенсивне поширення останніх.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Наразі відомо понад 120 спадкових хвороб великої рогатої худоби молочного напрямку продуктивності, їх носії та системи діагностичних і профілактичних заходів [1–3].

Натомість в Україні скринінгових досліджень бугаїв та наявної сперми з використанням полімеразної ланцюгової реакції щодо спадкових хвороб не проводилося. Відомі лише нечисленні результати досліджень з діагностики окремих спадкових хвороб великої рогатої худоби у кількох господарствах [4–8].

BLAD – це летальна автосомальна рецесивна генетична хвороба, що характеризується зменшенням рівня утворення інтенгринів, які забезпечують захоплення (адгезію) лейкоцитами патогенів і проявляються порушенням імунітету слизових оболонок. Клінічно у телят-гомозигот реєструють супутні хвороби – пневмонію, ентерит, діарею, виразковий і грануломатозний стоматит і загибель у 2–4-місячному віці.

Тому питання розробки діагностики і контролю спадкових хвороб та убезпечення поголів'я великої рогатої худоби від їх поширення мають надзвичайну актуальність для скотарства України.

Мета досліджень полягала в апробації і впровадженні діагностики синдрому дефіциту адгезійності лейкоцитів великої рогатої худоби (*BLAD*) методом полімеразної ланцюгової реакції та з'ясування поширеності цієї хвороби серед бугаїв-плідників.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили на 57 бугаях-плідниках української чорно- і червоно-рябої молочних та голштинської порід п'яти обласних племпідприємств Національного підприємства з племінної справи у тваринництві „Укрплемпідприємство“. Кров для дослідження відбирали з яремної вени у пробірки з лимоннокислим натрієм. ДНК виділяли з лімфоцитів з використанням комплексу реагентів „ДНК-сорб-В“.

Для ДНК-ампліфікації застосували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням ампліфікатора (термоциклера, що програмується для проведення ампліфікації).

Суть методу полягала у багаторазовому спрямованому синтезі ДНК з дезоксирибонуклеотидтрифосфатів *in vitro* за допомогою термостабільної *Taq-F* ДНК-полімерази. Специфічність синтезу (ампліфікації) обраної ділянки ДНК визначали синтетичними праймерами-затравками:

F – 5' – TGAGACCAGGTCAGGCATTGCGTTCA – 3';

R – 5' – CCCCCAGCTTCTTGACGTTGACGAGGTC – 3'

Пробірки із сумішшю вносили в ампліфікатор та запускали наступну температурну програму:

- 1-й етап – +94 °C – 3 хв;
- 2-й етап – +94 °C – 30 с, +65 °C – 40 с, +72 °C – 40 с (35 циклів).
- 3-й етап – +72 °C – 5 хв.

Рестриктазний гідроліз проводили інкубуванням ампліфікованої ДНК із рестриктазою *Hae* III (0,5 мкл) в буфері, склад якого спеціально оптимізований для конкретного ферменту рестрикції, впродовж 1,5 год за температури +65 °С.

Горизонтальний електрофорез виконували у 5 % агарозному гелі протягом 20 хв. Після електрофорезу гель фарбували розчином бромистого етидію (0,5 мкг/мл) упродовж 4–6 хв, відми-вали, переносили у транслюмінатор, проводили фотодокументацію результатів. Для оцінки електрофореграми використовували комп'ютерну програму *Gel Explorer*.

Результати досліджень та їх обговорення. Після гідролізу ампліфікату та електрофоретичного розподілу фрагментів рестрикції спостерігали аналогічну картину у більшості тварин. Проте у трьох бугаїв розподіл фрагментів рестрикції був іншим, оскільки вони були носіями хвороби.

Комп'ютерна програма *Gel Explorer* дозволяє будувати профілограми електрофоретичного розподілу фрагментів рестрикції в агарозному гелі. Отримані графіки супроводжуються індикацією поточного вимірювання: I – інтенсивністю світіння (від 0 до 255 од.) та L – молекулярною масою в умовних одиницях (рис. 1).

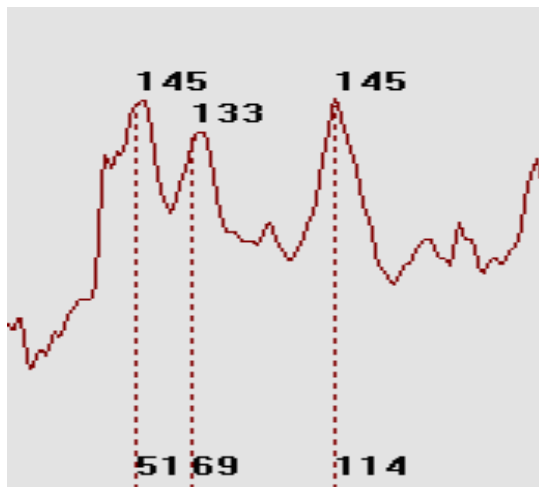


Рисунок 1. Профілограма бугая-носія *BLAD*

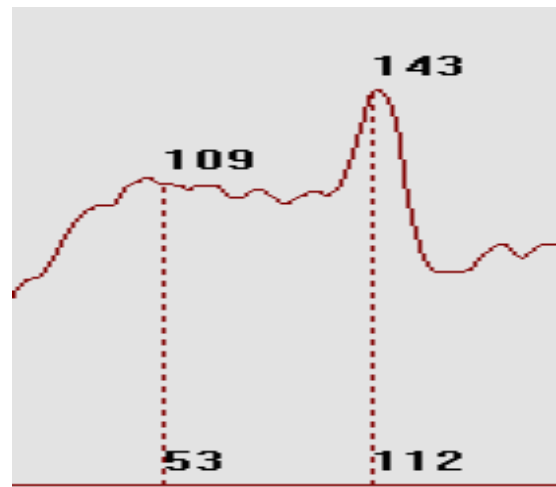


Рисунок 2. Профілограма бугая, вільного від *BLAD*

На рисунку 1 зображено профілограму розподілу фрагментів рестрикції гетерозиготного носія *BLAD* після електрофоретичного розділення, рисунку 2 –фрагментів рестрикції здорового бугая. Для профілограми останнього характерними були два піки з інтенсивністю світіння 109 і 143 одиниць та молекулярними масами 53 і 112 умовних одиниць відповідно. Для профілограми гетерозиготного носія характерні три піки з інтенсивністю світіння 145, 133 та 145 одиниць. Перший і третій піки мали молекулярні маси 51 та 114 умовних одиниць, що вказує на подібне до першого випадку розділення продуктів рестрикції, але наявність третього піку з молекулярною масою 69 у.о. між ними свідчить про відмінності структури ділянок рестрикції у першого бугая, характерних для носія синдрому дефіциту адгезійності лейкоцитів великої рогатої худоби (*BLAD*). Результати аналізу профілограм збігаються з даними візуального контролю результатів електрофорезу, коли у здорових тварин візуалізуються два фрагменти ДНК (45, 87 п.н.), у хворих – три (45, 68, 87 п.н.) (рис. 3).

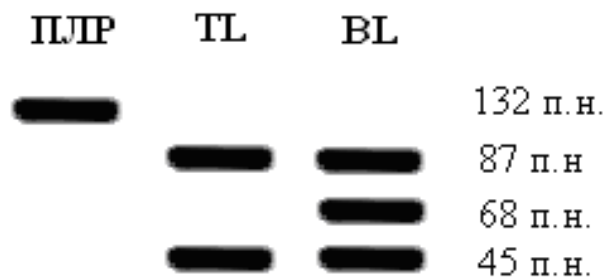


Рисунок 3. Схема електрофоретичного розподілу фрагментів гена *CD 18* за використання рестриктази *Hae* III

З 57 досліджуваних бугаїв подібний до першого випадку розподіл фрагментів рестрикції спостерігали у трьох. Слід зазначити, що ці тварини були одночасно і гетерозиготними носіями комплексного пороку хребта (*CVM*). На момент дослідження такий результат був неочікуваним та вимагав пояснення подвійного носійства спадкових хвороб. Однак в результаті аналізу джерел літератури виявилось, що широке поширення *CVM* серед голштинів відбулося через видатного бугая-плідника К.М. Белла 1667366, який одночасно був носієм іншого спадкового пороку – дефіциту лейкоцитарної адгезії (*BLAD*). Наразі відомо, що від К.М. Белла тільки в США було отримано більше 79 тисяч дочок, оцінених за продуктивністю та понад 1200 синів, оцінених за дочками [9].

Основним джерелом поширення летального гена в Україні є нащадки К.М. Белла *BL* 1667366 та П.С. Шейка *BL* 1617421. Носіїв мутантного гена та їх нетестованих синів виявлено у лініях Елевейшна 1491007–Х.Х., Старбака 352790, П.Ф.А. Чіфа 1427381. Ці бугаї отримали мутантний алель за материнською стороною родоvodu [10]. За аналізом родоводів виявлені носії (*BLAD*) увійшли в групу тварин з високою вірогідністю наявності дефектного алелю (“група ризику”). Таким чином, із 57 бугаїв три виявилися гетерозиготними носіями синдрому дефіциту адгезійності лейкоцитів великої рогатої худоби (*BLAD*) та комплексного пороку хребта (*CVM*).

Висновки: 1. Апробований метод дозволяє точно діагностувати синдром дефіциту адгезійності лейкоцитів великої рогатої худоби (*BLAD*) у гетерозиготних носіїв.

2. За діагностики синдрому дефіциту адгезійності лейкоцитів великої рогатої худоби (*BLAD*) у гетерозиготних носіїв необхідно враховувати можливе одночасне носійство комплексного пороку хребта (*CVM*).

3. Із 57 бугаїв три виявилися одночасно гетерозиготними носіями синдрому дефіциту адгезійності лейкоцитів великої рогатої худоби (*BLAD*) та комплексного пороку хребта (*CVM*).

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи наведені результати, вважаємо доцільною розробку системи контролю спадкових хвороб великої рогатої худоби молочного напрямку з використанням апробованих методів та дослідженням бугаїв і замороженої сперми бугаїв, яка використовується для штучного осіменіння.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ribeiro L.A. PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil / L.A. Ribeiro, E.E. Baron, M.L. Martinez // Genet. Mol. Boil. – 2000. – № 23. – P. 831–834.
2. Distl O. The use of molecular genetics in eliminating of inherited anomalies in cattle / O. Distl // Arch. Tierz., Dummerstorf. – 2005. – № 48. – P. 209–218.
3. Complex vertebral malformation in Holstein calves / [J.S. Agerholm, C. Bendixen, O. Andersen, J. Arnbjerg] // J. Vet. Diagn. Invest. – 2001. – № 13. – P. 283–289.
4. Гиль М.І. Виявлення тварин-носіїв мутації *BLAD* у молочних порід худоби України / М.І. Гиль, А.Е. Луньова // Наукові доповіді Нац. аграр. ун-ту. – К., 2008. – №1 (9) <http://www.nbu.gov.ua/e-Journals/nd/2008-1/08gmiciu.pdf>.
5. Бірюкова О.Д. Генетологічний аналіз поширеності гена *BLAD* у популяції / О.Д. Бірюкова // Вісник аграрної науки. – 2003. – № 8. – С. 68–70.
6. Винничук Д.Т. Ген *DUMPS* в молочном скотоводстве / Д.Т. Винничук // Молекулярно-генетические маркеры животных: Тез. док. III Междунар. конф. – К., 1999. – С. 47–48.
7. Внутривидовая генетическая дифференциация и наличие мутации *BLAD* у крупного рогатого скота голштинской породы / В.И. Глазко, В.В. Лавровский, А.Н. Филенко, А.Э. Мариуца // Сельскохозяйственная биология. – 2000. – № 4. – С. 45–48.
8. Власенко С.А. Распространённость ортопедической и акушерской патологии у коров-носителей *BLAD* / С.А. Власенко, С.С. Волков // Современные технологии с.-х. производства: Материалы X Междунар. науч.-практ. конф. – Гродно, 2007. – С. 185.
9. Эрнст Л. Комплексный порок позвоночника у голштинов / Л. Эрнст, Н. Зиновьева, Е. Гладырь // Животноводство России. – 2007, декабрь. – С. 51–53.
10. Бірюкова О.Д. Наявність гену *BLAD* у бугаїв, що використовуються в селекційному процесі в Україні / О.Д. Бірюкова // Матеріали конф. молодих вчених та аспірантів. – Чубинське: Ін-т розведення і генетики тварин, 2003. – С. 5–6.

ПЦР-діагностика *BLAD* крупного рогатого скота и особенности двойного носительства наследственных болезней

С.С. Волков, В.В. Лотоцкий

В статье приведена методика и результаты апробации лабораторной диагностики синдрома дефицита адгезивности лейкоцитов крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции. Из 57 быков-производителей, подлежащих исследованию, три оказались гетерозиготными носителями данной болезни. Вместе с тем, эти же животные были носителями комплексного порока позвоночника (*CVM*). Намечены перспективы дальнейших исследований и актуальность внедрения ПЦР-диагностики наследственных болезней в андрологическую диспансеризацию и практику ветеринарной медицины.

Ключевые слова: быки, синдром дефицита адгезивности лейкоцитов, диагностика, полимеразная цепная реакция.