

**МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА І ПЕРЕРОБКИ ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА

Збірник наукових праць

Випуск 1 (67)

Біла Церква
2009

Затверджено вченою
радою університету
(Протокол № 3 від 22.12.2008р.)

Редакційна колегія:

Даниленко А.С., д-р екон. наук, професор
(головний редактор);

Харута Г.Г., д-р вет. наук, професор
(заступник головного редактора);

Дяченко Л.С., д-р с.-г. наук (відповідальний за випуск);

Розпутній О.І., д-р с.-г. наук;

Рудик І.А., д-р с.-г. наук;

Лясота В.П., д-р вет. наук;

Цехмістренко С.І., д-р с.-г. наук;

Семілетко В.І., канд. пед. наук;

Сокольська М.О., зав. РВІКВ (відповідальний секретар)

Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2009.– Випуск 1 (67) – 86 с.

До збірника увійшли наукові статті, в яких висвітлені результати наукових досліджень, проведених ученими навчальних закладів та наукових установ аграрного профілю з актуальних питань розробки новітніх технологій виробництва та переробки продукції тваринництва.

ЗАГОРОДНИЙ А.П., асистент

РУДИК І.А., д-р с.-г. наук, чл.-кор. УААН

Білоцерківський національний аграрний університет

СПАДКОВІ ЗАХВОРЮВАННЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Вивчено спадкові захворювання великої рогатої худоби, за якими слід проводити генетичний моніторинг у молочному скотарстві для проведення селекції проти розповсюдження генетичних аномалій. Показано, що такі аномалії, як Чедіак-Хігаші синдром (CHS) та дефіцит адгезивності лейкоцитів великої рогатої худоби (BLAD) у популяціях великої рогатої худоби мають генетичну обумовленість і розповсюджуються через окремих бугаїв-плідників.

Ключові слова: Чедіак-Хігаші синдром, дефіцит адгезивності лейкоцитів великої рогатої худоби, спадкові захворювання, генетичний вантаж, рецесивні ознаки.

Постановка проблеми. Події останнього десятиліття свідчать про те, що вже на початку нинішнього століття ДНК-технології змінюють ситуацію в аграрному секторі економіки не лише розвинутих країн, але й тих, що розвиваються. Молекулярні методи досліджень набувають усе більшої популярності у прикладних галузях біологічних наук [1].

У процесі вузької спеціалізації на високу молочну продуктивність можуть накопичуватися шкідливі мутації, які у разі безконтрольного їх розповсюдження завдають значних економічних збитків. У великої рогатої худоби відкрито значну кількість небажаних рецесивних ознак, деякі мутації спричинюють різного ступеня порушення морфогенезу, обміну речовин, біохімічних функцій тощо [2].

На сучасному етапі розвитку тваринництва є необхідність оцінки плідників за наявністю генетичного вантажу, який виявляється у формі каліцтв (виродливостей) і аномалій, обумовлених зміною структури і функцій генетичного апарату. Збиток від народження аномального приплоду може перебивати поліпшувальний ефект плідника за продуктивністю, якщо він виявиться джерелом розповсюдження шкідливих генів [3, 4].

Метою дослідження було проведення аналізу існуючих спадкових захворювань великої рогатої худоби з подальшим створенням відповідних селекційних програм з елімінації шкідливих генів у популяціях.

Матеріал і методи досліджень. Вивчені шкідливі гени, які детермінують генетичні аномалії, у тому числі фактор дефіциту XIII (ген F13), який характеризується сильними кровотечами; сфероцитоз (ген EPB3) – анемія і жовтуха; ксантинурія (ген MCSU) – ниркова недостатність; Чедіак-Хігаші синдром (ген LYST) – сильні кровотечі, аномальні гранули лейкоцитів, понижена щільність гранул тромбоцитів, частковий альбінізм; реальна (ниркова) тубулярна дисплазія (ген PCLN1) – ниркова недостатність, діарея; хондродиспластичний дворфізм (ген LIMBIN) – короткі кінцівки; фактор дефіциту XI (ген F11) – кровотечі; гемофілія А (ген F8) – сильна кровотеча, дефіцит адгезивності лейкоцитів (BLAD, ген CD 18), дефіцит уридинмонофосфат синтетази великої рогатої худоби (ген DUMPS).

Результати досліджень та їх обговорення. Чедіак-Хігаші синдром (CHS) – генетичне спадкове захворювання у кодуєчій ділянці LYST гена, яке супроводжується кровотечами у худоби зі світлою мастю [5]. Уражені тварини мають аномальні гранули лейкоцитів, пониженою кількість гранул тромбоцитів і частковий альбінізм. Аномалія носить аутосомно-рецесивний характер успадкування [6]. LYST ген кодує мембранні зв'язки протеїнів, які регулюють інтрацелюлярний рух. Мутантний ген був знайдений також у людей, мишей, пацюків, норок [7].

Для виявлення CHS проводиться скринінг структури комплементарної ДНК мозку великої рогатої худоби. LYST-кодуєча ділянка носіїв ампліфікується за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) зі зворотною транскрипцією (RT-PCR), і встановлена нуклеотидна послідовність порівнюється із послідовністю нуклеотидів здорових тварин. Відповідно CHS характеризується заміною гуаніну на аденін (Г→А), що зумовлює заміну амінокислоти гістидину на аргінін (H2015R) (рис. 1, 2) [8, 9]. Ідентифікується мутантний ген LYST за допомогою методу ПЛР-PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Цей метод використовується, тому що локалізація нуклеотидної заміни є розпізнаною у послідовності FokI-ендонуклеази, і тому ПЛР-фрагмент, який містить мутаційний сайт, має FokI розщеплений сайт в нормальному алелі (рис. 3, 4), мутантний ж алель такого сайту не має. Розпізнавання CHS проводиться також за методикою Nakagiri [10] з використанням алельспецифічної ПЛР (AS-PCR).

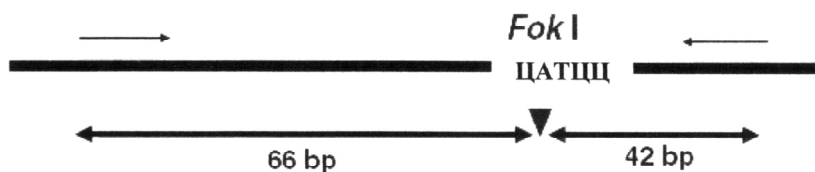
					6044						
Норма	ЦТТ	ТТА	ГЦА	ГТТ	ЦАТ	ЦЦТ	ЦЦТ	АЦТ	ААТ	АЦТ	
CHS	...	...	...	...	Г	...	...	...	...	...	

Рис. 1. Ділянка послідовності нуклеотидів з нормальним генотипом тварин та з геном *LYST* великої рогатої худоби на кодоні 6044. Проходження заміни аденіну на гуанін.

					6044						
Норма	Лей	Лей	Ала	Вал	Гіс	Про	Про	Тре	Асп	Тре	
CHS	...	...	...	...	Арг	...	...	...	...	...	

Рис. 2. Ділянка послідовності амінокислот з нормальним генотипом тварин та з геном *LYST* великої рогатої худоби із заміною амінокислот гістидину на аргінін.

Нормальний алель



Мутантний алель

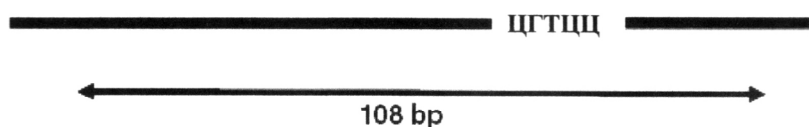


Рис. 3. Полімеразна ланцюгова реакція RFLP, використана для ідентифікації *LYST* гена великої рогатої худоби. Нормальний алель має фрагмент довжиною 108 пар байс, включаючи кодон 2015, який був ампліфікований з геномної ДНК великої рогатої худоби за допомогою парного праймера, вказаного стрілками, належного до *FokI* сайту. Вертикальна стрілка вказує на розщеплення *FokI* сайту. Ампліфікований фрагмент був розщеплений на 66 і 42 пари байс в нормальних алелях, тоді як в мутантному алелі не пройшло дане розщеплення.

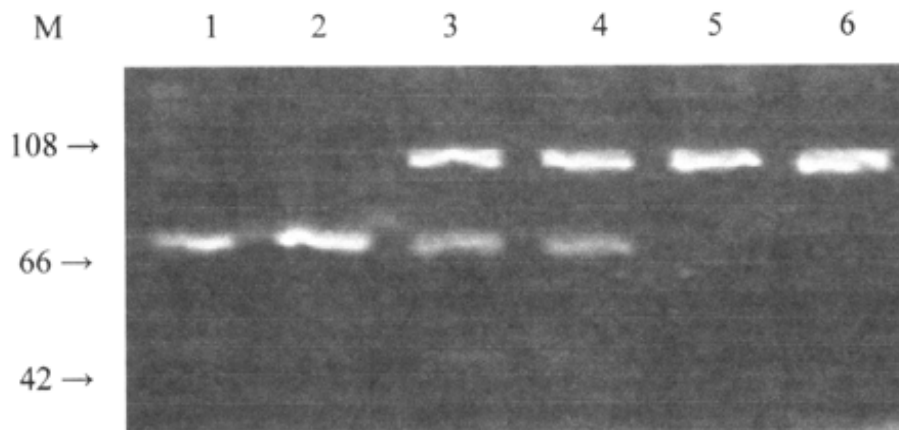


Рис. 4. Електрофореграма розщеплених ПЛР продуктів під УФ-опроміненням у 8 %-ному неденатуруючому акриламідному гелі: М – маркер молекулярних мас; 1, 2 – нормальний генотип; 3, 4 – прихований носій; 5, 6 – хворі CHS тварини.

BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) – дефіцит адгезивності лейкоцитів, хвороба телят голштинської породи. Це генетичне детерміноване захворювання з рецесивним типом успадкування. Воно обумовлене точковою мутацією у кодуючій частині аутосомного гена CD 18, який контролює синтез глікопротеїду β -інтегрину. Він відіграє ключову роль у процесі міграції нейтрофілів до осередку запалення. Вперше це захворювання описане у великій рогатій худоби в 1983 році під назвою "гранулоцитарний синдром" [1, 2, 11-14].

Контроль за допомогою PCR RFLP діагнозу дефіциту адгезивності лейкоцитів великої рогатої худоби дає змогу визначити тварин з нормальним генотипом (C_1), тварин-носіїв даного захворювання (C_2) та тварин-гомозигот (C_3), у яких фенотипово чітко прослідковувалася мутація (рис. 5). Утворення і втрата ділянки розпізнавання *TaqI* restriction endonuclease для ПЛР-ампліконів продиктовані зворотними праймерами: B1 – стандартний (N) зворотний праймер, B2 (N) – стандартний праймер і специфічний зворотний праймер для визначення мутації (mutation inducing specific (MIS) primer). У результаті полімеразної ланцюгової реакції ампліфікується фрагмент ДНК розміром 58 п.н. Після рестрикції ензимом *Taq I* за відсутності мутації утворюються продукти розміром 26 та 32 п.н., носій – 32, 26, 58 п.н. та рецесивна гомозигота – 58 п.н.

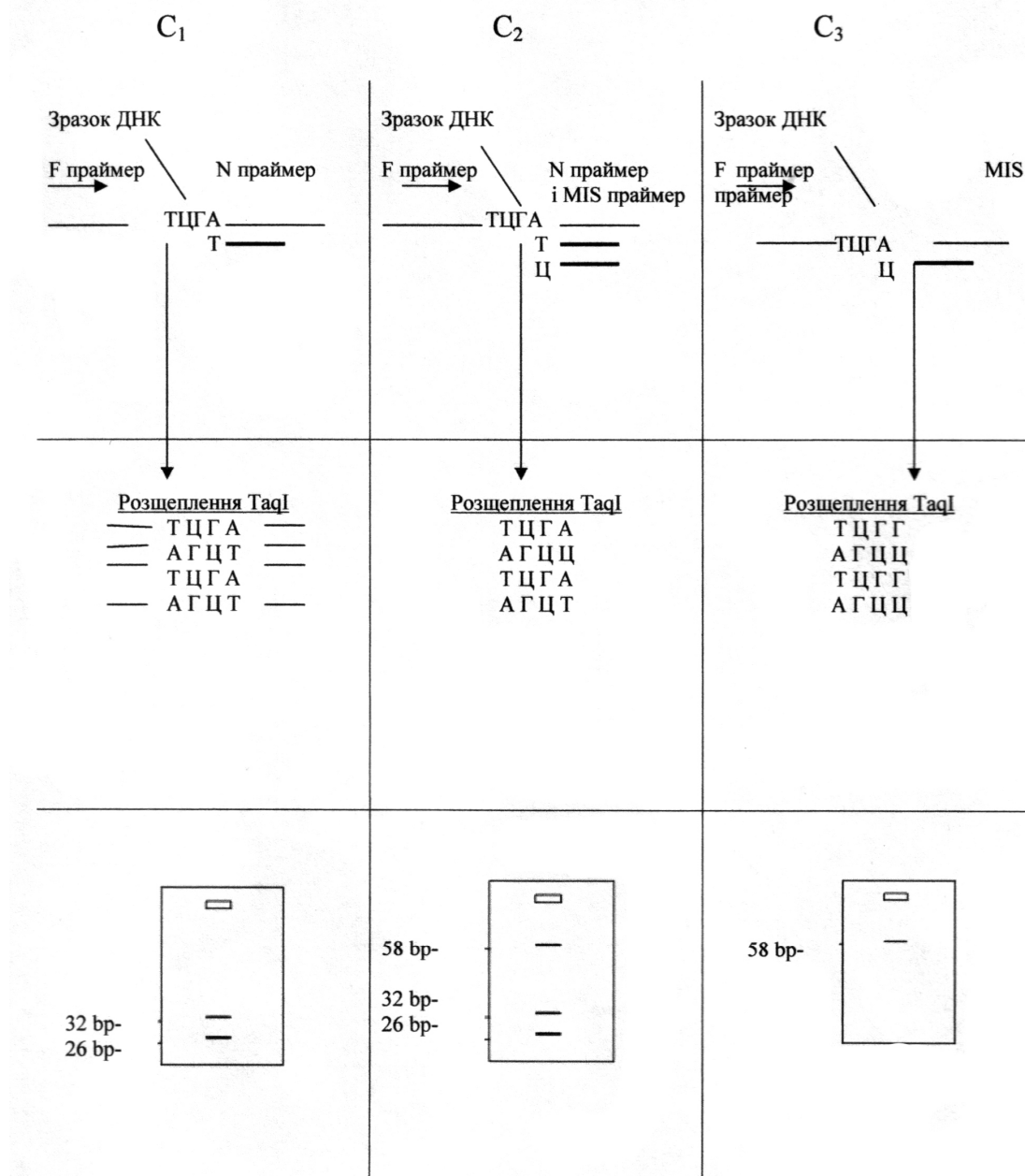


Рис. 5. Схематичне зображення PCR RFLP діагнозу дефіциту адгезивності лейкоцитів: C_1 – тварини з нормальним генотипом; C_2 – тварини-носії мутації BLAD; C_3 – рецесивні гомозиготи.

Висновки і перспективи подальших досліджень.

1. Використання методу ПЛР дає змогу виявити носіїв шкідливих генів і елімінувати їх з відтворення.
2. У популяціях великої рогатої худоби в процесі еволюції і розведення накопичений певний вантаж шкідливих мутацій. Частота їх змінюється під дією штучного відбору. Профілактика генетичних аномалій має особливо актуальне значення в умовах великомасштабної селекції, тому що використання неперевіраних плідників за наявності у генотипі шкідливих генів призводить до економічних збитків.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Димань Т.М. Полімеразна ланцюгова реакція: Методичні рекомендації / Т.М. Димань, В.І. Глазко. – Біла Церква, 2004. – 62 с.
2. Рекомендації з генетичного контролю розповсюдженості мутації BLAD у великої рогатої худоби/ [В.П. Буркат, В.С. Коновалов, М.Я. Єфіменко [та ін.]; Чубинське, 2005. – 24 с.
3. Эрнст Л.К. Профилактика генетических аномалий крупного рогатого скота/ Л.К. Эрнст, А.И. Жигачев. – Л.: Агропромиздат. Ленигр. отд-ние, 1990. – 240 с.
4. Дзіцюк В. Селекційні завдання генетиків у тваринництві/ [В. Дзіцюк, В. Коновалов, А. Шельов [та ін.] // Тваринництво України. – 2007. – № 2. – С. 61-64.
5. Clinical, morphologic, and biochemical characteristics of Chediak-Higashi syndrome in fifty-six Japanese black cattle/ [H. Ogawa, C.H. Tu, H. Kagamizono, [et al.]]// American Journal of Veterinary Research. – 1997. – V. 58. – P. 1221-1226.
6. Inheritance of Chediak-Higashi syndrome in Japanese black cattle/ [C.H. Tu, Y. Takahashi, Y. Kaseda, [et al.]] // Journal of Veterinary Medical Science. – 1996. – V. 58 – P. 501-504.
7. Beige rat: a new animal model of Chediak-Higashi syndrome/ [M. Nishimura, M. Inoue, T. Nakao [et al.]]// Blood. – 1989. – V. 74. – P. 270-273.
8. Cloning of bovine LYST gene and identification of a missense mutation associated with Chediak-Higashi syndrome of cattle/ [T. Kunieda, M. Nakagiri, M. Takami [et al.]]// Mammalian Genome. – 1999. – V. 10. – P. 1146-1149.
9. Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle (Wagyu)/ [H. Yamakuchi, M. Agaba, T. Hirano [et al.]]// Animal Genetics. – 2000. – V. 3. – P. 13-19.
10. Allele-specific polymerase chain reaction for identifying carriers of Chediak-Higashi syndrome in Japanese black cattle/ [H. Nakagiri, T. Kunieda, H. Ide [et al.]]// Animal Science Journal. – 1999. – V. 70. – P. 372-374.
11. Zagorodniy A. P. Identification of deleterious genes: Матеріали Міжнар. наук. -практ. конф. молодих вчених, аспірантів та докторантів ["Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті"], (Біла Церква, 15-16 травня 2008 р.)/ М-во аграр. політики, Білоцерк. держ. аграр. ун-т – Біла Церква.: Білоцерк. держ. аграр. ун-т, 2008. – 146 с.
12. Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian Cattle in Japan / [H. Nagahata, T. Miura, K. Tagaki [et al.]] // Journal of Veterinary Medical Science. – 1997. – V. 59. – P. 233-238.
13. Загородній А.П. Ідентифікація шкідливих генів/ А.П. Загородній, І.А. Рудик, О.М. Недвига// Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. – 2008. – Вип. 58. – С. 22-26.
14. Розповсюдження генетичної мутації BLAD у популяції молочної худоби/ [І.А. Рудик, Т.М. Димань, А.П. Загородній [та ін.]]// Вісник аграрної науки. – 2006. – № 11. – С. 53-55.

Наследственные заболевания крупного рогатого скота

А.П. Загородний, И.А. Рудик

Изучены наследственные заболевания крупного рогатого скота, по которым следует проводить генетический мониторинг в молочном скотоводстве для селекции против распространения генетических аномалий. Показано, что такие аномалии, как Чедиак-Хигаши синдром (CHS) и дефицит адгезивности лейкоцитов (BLAD) в популяциях имеют генетическую обусловленность и распространяются через отдельных быков-производителей.

Ключевые слова: Чедиак-Хигаши синдром, мутация BLAD, наследственные заболевания, генетический груз, рецессивные признаки.

Inherited disorders of cattle

A. Zagorodniy, I. Rudyk

Cattle inherited disorders have been analyzed and they concluded it should be realized over the genetic monitoring programs for cattle in order to carry out the selection against genetic anomalies. There has been showed Chediak-Higashi syndrome (CHS) and Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in the populations and their genetic conditionally was proved.

Key words: Chediak-Higashi syndrome, BLAD mutation, inherited disorders, genetic load, recessive traits.

Надійшла 04.02.2009 р.