Науковий вісник ветеринарної медицини: Зб. наук. праць. – Біла Церква, 2014. – Випуск 13 (108). – С. 70–73

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 підлягади дослідженню, три виявилися гетерозиготними носіями цієї хвороби. Разом з тим, ці тварини були носіями комплексного пороку хребта (*CVM*). 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 напряму 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 гранулематозний 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'ясуванні 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 комплекту 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 °С – 3 хв;
- 2-й етап – +94 °С – 30 с, +65 °С – 40 с, +72 °С – 40 с (35 циклів).
- 3-й етап – +72 °С – 5 хв.

© **Волков С.С., Лотоцький В.В.**, 2014.

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, відмивали, переносили у трансілюмінатор, 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).

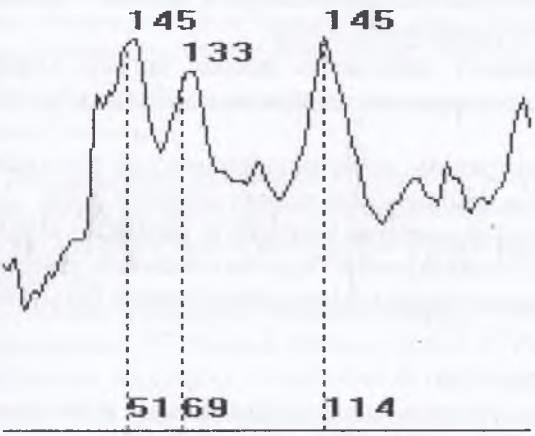

Рисунок 1. **Профілограма бугая-носія *BLAD***

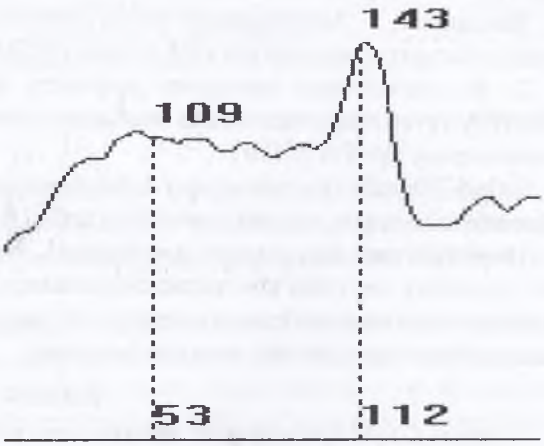

Рисунок 2. **Профілограма бугая, вільного від *BLAD***

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).

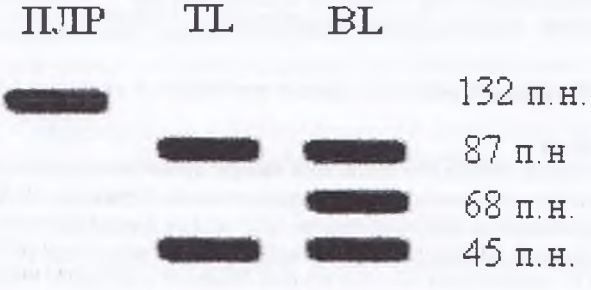

Рисунок 3. **Схема електрофоретичного розподілу фрагментів гена *CD* 18 за використання рестриктази *Hae* III**

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 виявилося, 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 родоводу [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 напряму 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., Dumerstorf. – 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.nbuv.gov.ua/e-Journals/nd/2008-1/08gmiciu.pdf.

5. Бірюкова О.Д. Генеалогічний 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. Внутрипородная 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-диагностика *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, подлежавших 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.

PCR-diagnosis of BLAD cattle and double carrier features of hereditary diseases

S. Volkov, V. Lototskiy

The study was conducted on 57 bull-sires of Ukrainian black and red and white Holstein dairy breeds and five regional bulls breeding center National companies in animal breeding "Ukrplempidpryyemstvo". Blood for the study were collected from the jugular vein into tubes with sodium citrate. DNA was extracted from lymphocytes using a kit of reagents "DNA Sorbo -In" For DNA amplification method used polymerase chain reaction (PCR) using Thermocyclers (termotsyklera programmable for amplification).The method was repeated in the direct synthesis of DNA in vitro DNF using thermostable Taq-F DNA polymerase. Hydrolysis was performed by incubating amplified DNA with restriction Hae III (0,5 ml) in a one-time buffer composition is specially optimized for particular restriction enzymes for 1.5 h at a temperature of + 65 ° C. Horizontal electrophoresis was performed in 5% agarose gels for 20 minutes. After electrophoresis, the gel stained with ethidium bromide solution (0.5 mg / ml) for 4–6 min, washed , transferred to transilyuminator , spent photographic documentation of results. For result analysis used computer program Gel Explorer. The same distribution of restriction fragments observed a similar pattern in most animals. However, three bulls distribution of restriction fragments was different, allowing the judge that they were carriers of the disease. A computer program Gel Explorer allows you to build profilohrams electrophoretic distribution of restriction fragments in agarose gels. These graphics are accompanied by an indication of the current measurement: I – intensity of luminescence (from 0 to 255 units.) And L – molecular weight in units For profilohrames heterozygous carriers were characterized by three peaks of luminescence intensity of 145, 133 and 145 units. The first and third peaks had molecular weights of 51 and 114 arbitrary units, indicating similar to the first case, separate the products of restriction, but the presence of a third peak with a molecular mass of 69 USD between evidence of differences in the structure of restriction sites of the first bull, typical for medium bulls leukocytes adhesion deficiency (BLAD). The analysis profilohrams match those visual inspection of the results of electrophoresis as in healthy

animals displays two DNA fragments (45, 87 bp) in patients – three (45, 68. 87 bp).Of the 57 subjects bulls similar to the first case, the distribution of restriction fragments observed in three. It should be noted that these same animals were both heterozygous carriers of complex defect of the spine (CVM). At the time of this research result was unexpected and demanded an explanation of dual carriers of inherited disease. However, analysis of literature sources yielded conclusive answers to any questions. It was found that widespread among CVM holsteins was due to an outstanding bull-sires KM 1667366 Bell , who was also a carrier of other hereditary defect - ieukocyte adhesion deficiency (BLAD). At the moment we know that from KM Bell in the U.S. alone had received more than 79000 daughters measured in performance and more than 1200 children evaluated for their daughters. The main source of the spread of a lethal gene in Ukraine are descendants of KM Bell 1667366 BL and PS Shake BL 1617421. Carriers of the mutant gene and not tested children found in lines Eleveyshn 1491007 – H.H. Starbuck 352790, P.F.A. Chif 1427381. These bulls have received the mutant allele for maternal ancestry. Analyzing pedigrees identified carriers (BLAD) included in the group of animals with a high probability of the presence of the defective allele ("risk"). Thus, three of the 57 bulls were heterozygous carriers bulls leukocytes adhesion deficiency (BLAD) and complex defect of the spine (CVM).Tested method allows accurate diagnosis Deficit bulls leukocytes adhesion deficiency (BLAD) in heterozygous carriers. For diagnostic bulls leukocytes adhesion deficiency (BLAD) in heterozygous carriers need to consider simultaneous carriage integrated defect of the spine (CVM).

Key words: bulls, bulls leukocytes adhesion deficiency, diagnosis, polymerase chain reaction.