

**ПРИОРИТЕТНЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПРОЕКТ «ОБРАЗОВАНИЕ»
РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ**

**Н.А. ЗИНОВЬЕВА, П.М. КЛЕНОВИЦКИЙ,
Е.А. ГЛАДЫРЬ, А.А. НИКИШОВ**

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ
ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
СЕЛЕКЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ
И СЕРТИФИКАЦИЯ ПЛЕМЕННОГО
МАТЕРИАЛА В ЖИВОТНОВОДСТВЕ**

Учебное пособие

Москва

2008

*Инновационная образовательная программа
Российского университета дружбы народов*

**«Создание комплекса инновационных образовательных программ
и формирование инновационной образовательной среды,
позволяющих эффективно реализовывать государственные интересы РФ
через систему экспорта образовательных услуг»**

Экспертное заключение –

доктор сельскохозяйственных наук, профессор *А.В. Бакай*

Зиновьева Н.А., Кленовицкий П.М., Гладырь Е.А., Никишов А.А.

Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификация племенного материала в животноводстве: Учеб. пособие. – М.: РУДН, 2008. – 329 с.

В учебном пособии подробно изложены методы выявления белкового и ДНК-полиморфизма и вопросы его использования для сертификации племенного материала. Детально описано современное состояние вопроса. Значительное внимание уделено проблеме поиска и выявления новых, перспективных генетических маркеров. Книга затрагивает ряд смежных областей науки, находится на стыке селекции и классической генетики, а также молекулярной биологии и молекулярной генетики. Основной целью пособия является подготовка специалистов со знанием современных методов генетического контроля селекционного процесса и сертификации племенного материала в животноводстве.

Предназначено для магистров по специальности «Зоотехния» и ветеринарных врачей.

Учебное пособие выполнено в рамках инновационной образовательной программы Российского университета дружбы народов, направление «Комплекс экспортноориентированных инновационных образовательных программ по приоритетным направлениям науки и технологий», и входит в состав учебно-методического комплекса, включающего описание курса, программу и электронный учебник.

© Зиновьева Н.А., Кленовицкий П.М., Гладырь Е.А., Никишов А.А., 2008

СОДЕРЖАНИЕ

Глава 1. Современная селекция животных.....	4
Глава 2. Современные представления о гене	20
Глава 3. Генетические маркеры	43
Глава 4. Типы генетических маркеров	56
Глава 5. Классические маркеры I типа	76
Глава 6. Основы ДНК-диагностики генных мутаций	97
Глава 7. Полиморфизм молочных белков	120
Глава 8. Гены, влияющие на репродуктивную функцию у животных.....	135
Тема 9. Генетические маркеры, связанные с ростом животных и качеством мяса. ..	156
Глава 10. Применение ДНК-диагностики для выявления летальных рецессивных мутаций.....	169
Глава 11. Прионные болезни.....	183
Глава. 12. Применение генетических маркеров I и II типа в филогенетических исследованиях.....	197
Глава 13. Генетический контроль в селекции на основе маркеров I и II типа.....	208
Глава 14. Методы ДНК-диагностики в ветеринарии	220
Глава 15. Основы цитогенетики животных.....	228
Глава 16. Цитогенетика в селекции животных	243
Тема 17. Анализ генетической структуры хромосом.....	265
Глава 18. Нормативные акты, регламентирующие сертификацию племенного материала в РФ	283
Перечень рефератов и/или курсовых работ по темам.....	296
Перечень вопросов итоговой аттестации	297
Литература.....	298
Словарь (глоссарий) основных терминов и понятий	300
Описание курса и программа	307

Глава 1. Современная селекция животных

Роль генетики в селекции. Традиционная и маркерная селекция. Реверсивная генетика. Преимущества селекции по маркерам.

Селекция (от латинского *selectio* – выбор, отбор) – наука, изучающая основанные на генетических закономерностях методы воздействия на животных для создания, поддержания и совершенствования путем улучшения наследственных качеств специализированных групп (пород, отродий, линий и семейств). Сам термин, пришедший из английского языка (*selection*), не вполне удачен, так как отражает лишь одну сторону процесса генетического улучшения животных – отбор. Второй термин – разведение (*breeding*), закрепившийся в качестве названия родственной селекции науки, также не отражает всей полноты явления.

Более того, обе эти научные дисциплины являются составными частями одной, а именно прикладной генетики животных. В условиях современности, когда в практику животноводства внедряются методы не только классической, но и молекулярной генетики, термин прикладная генетика был бы наиболее уместен. Однако, отдавая дань традиции, мы будем придерживаться термина селекция и его производных, не забывая о генетической основе селекционных процессов.

Каждый признак развивается под влиянием многих генов, взаимодействующих на уровне организма. Отсюда возникают различные изменения в соотношении фенотипов во втором поколении, и даже появляется проявление нового признака в первом. Впервые возможность такого явления была отмечена Г. Менделем, наблюдавшим отклонение от расщепления 3:1 при скрещивании сортов фасоли с белыми и пурпурными цветами. Г. Мендель объяснил это тем, что окраска цветков складывается из двух или нескольких совершенно самостоятельных красок, которые в

отдельности подчиняются тем же правилам, что и любой контрастный признак у растений.



Рис. 1. Грегор Иоганн Мендель (1822-84). Австрийский естествоиспытатель, основоположник учения о наследственности (менделизм). Применив статистические методы для анализа результатов по гибридизации сортов гороха, сформулировал основные закономерности наследственности, легшие в основу современной генетики.

Было установлено несколько типов взаимодействия между разными генами: новообразование, комплиментарные или дополнительные факторы, криптомерия, эпистаз и гипостаз, модифицирующее взаимодействие генов; все они в конечном итоге укладывались в классическую менделевскую схему. Однако имелся один класс признаков, который, как казалось, не подчиняется этим правилам.

Речь идет о количественных признаках. Подход к решению данной проблемы был дан в работах Иогансена (1909), показавшего, что на выраженность признака влияют как генотип, так и среда, и Нильсона-Эле (1909), исследовавшего характер наследования окраски зерен пшеницы и чешуй у овса.



Рис. 2. Вильгельм Людвиг Иогансен (1857-1927) - датский биолог. Член Шведской Академии Наук. Один из основоположников классической генетики. Ввел термины: «ген», «генотип» и «фенотип». Создал учение о «чистых линиях», легшее в основу современной селекции.

Разумеется, это довольно упрощенное представление, исключаящее из рассмотрения влияние аллельных и межаллельных взаимодействий. Любое генетическое построение – это во многом идеализированная модель. В этой связи вспоминается книга замечательного венгерского математика А. Реньи «Трилогия о математике», в которой он сравнил эту науку – царицу абстракций – с гладью озера, отражающего окружающий пейзаж. Отражение это не обладает реальными свойствами природы, однако оно позволяет нам правильно судить о многих из них. Но справедлива ли эта схема для любых количественных признаков, в том числе определяющих продуктивность животных? Да, но частично. Да, потому что любой продуктивный признак зависит от действия очень большого числа генов. Частично, так как в отличие от полигенов Нильсона-Эле, большинству генов, влияющих на продуктивность, нельзя однозначно поставить в соответствие определенный фенотипический эффект.

Дело даже не в том, что в природе нет гена, обеспечивающего грамм привеса или литр молока (представление о силе гена, часто используемое в исследованиях, является удобной абстракцией – своеобразной математической функцией от некоторого неизвестного). Да и если это было бы возможно, то как отличить в этом случае один грамм или литр от другого.

Главное в том, что гены, влияющие на продуктивность, плейотропны: продукт, кодируемый ими, выполняет тотальную функцию в организме, собственно говоря, признаки, связанные с продуктивностью, обусловлены действием всего комплекса генов. Исключение составляют так называемые главные гены, очевидно, несущие информацию о ключевых продуктах, коренным образом влияющих на проявление определенных функций организма.

Такая особенность этих признаков значительно затрудняет их анализ. Действительно, еще Мендель отказался от изучения непрерывной изменчивости, по-видимому, осознавая, что это может существенно усложнить анализ.

Разработка подходов к генетике качественных признаков связана с именами Райта и Лаша, явившихся основоположниками биометрического метода в генетике. Вообще, первым биометрический подход к изучению признаков с непрерывной изменчивостью применил в конце XIX века Гальтон.

Несмотря на то, что Гальтону и его последователю Пирсону не удалось вскрыть механизм наследования этих признаков, они четко показали, что те, по крайней мере, отчасти, обусловлены наследственно. Ни гальтоновский, ни менделевский подход не могли самостоятельно решить этой проблемы. Решение ее было дано работами Райта, Фишера и Лаша. Ими были разработаны методы, позволяющие оценить степень

влияния генотипа на проявление количественных признаков и явившиеся основой современной селекции.



Рис. 3. Сэр Френсис Гальтон (1822 —1911) — английский исследователь, географ, антрополог и психолог; основатель дифференциальной психологии и психометрики. Разработал методы статистической обработки результатов наблюдений (в частности, метод исчисления корреляций между случайными величинами); ввёл в статистику понятия средней регрессии и коэффициента корреляции; создал биометрическую школу. Основоположник евгеники.

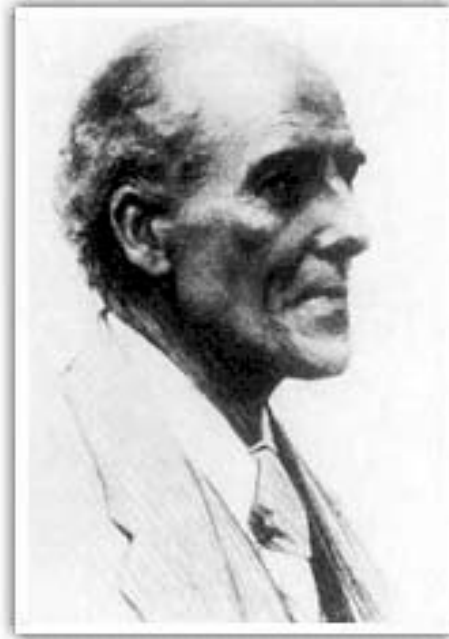


Рис. 4. Карл Пирсон (1857 – 1936). Член Королевского Общества. Значительную часть своих усилий он употребил на разработку и применение статистических методов в биологии. Один из основоположников современной статистики. Вместе с Гальтоном и Велдоном основал влиятельный журнал *Biometrika*.

Теоретической основой современной селекции животных в ее классическом варианте является представление о полигенной природе продуктивных признаков и участия в их формировании, как генотипа, так и средовых факторов. С последним положением связано понятие о наследуемости как о доле генотипически обусловленной изменчивости признака.

Одним из центральных моментов селекционной работы при чистопородном разведении является обоснованный выбор животных, предназначенных для улучшения породы. Не останавливаясь на изложении существующих методов оценки генотипа, поскольку этот вопрос детально изложен в ряде специальных курсов, задержимся на двух моментах, представляющих несомненный интерес для селекционера.

Большинство существующих методов оценки учитывают, как правило, только один или небольшое число взаимосвязанных признаков.

Вместе с тем племенная ценность и продуктивность животных определяется всем генотипом. Примеры негативных последствий односторонней селекции хорошо известны в зоотехнии. В связи, с чем селекционеры всегда искали пути, которые позволили бы им дать общую оценку животного. Классическим примером подобного подхода является определение комплексного класса животного при бонитировке. Но этот прием дает лишь частичную оценку животного.

Одно из решений этой проблемы было дано Лашем, предложившим использовать для комплексной оценки животных селекционные индексы. Селекционный индекс представляет собой уравнение, дающее обобщенную оценку животного по ряду продуктивных признаков пробанда или его предков. Каждому из признаков приписывается определенный вес (его доля), определяющий его вклад в суммарную оценку. Оставляя в стороне математическую сторону вопроса, ибо это увело бы нас далеко за пределы данной книги, поясним принцип определения весовых коэффициентов. При построении индекса возможен ряд подходов. Первый из них заключается в том, что оценка ведется по одному признаку, но с учетом его проявления у предков и/или боковых родственников. В этом случае значению признака у каждого родственника приписывается весовой коэффициент, характеризующий их генетическое сходство в зависимости от степени родства. В простейшем случае для отца и сына этот коэффициент принимают равным $1/2$, для деда и внука - $1/4$ и т.д.

Во втором случае индекс может включать ряд признаков, влияющих на определенный вид продуктивности. Например, у овец настриг шерсти зависит от густоты и тонины шерсти, массы тела, складчатости кожи и длины волокна. В этом случае в качестве веса каждого признака выступают соответствующие коэффициенты множественной регрессии.

Наконец, селекционный индекс может включать все виды продуктивности. При оценке быка нас может интересовать не только молочная продуктивность его дочерей, но и откормочные и мясные качества его потомков. В этом случае индекс и коэффициенты при его составных задаются в стоимостном выражении. Мы рассмотрели лишь простейшие варианты индексов. В практике возможны различные сочетания этих подходов.

Известно, что точность оценки по генотипу зависит от многих факторов, числа потомков, использованных при испытании, генетического фона на котором оно проводится, условий их кормления и содержания, сезона и многих других. В результате довольно часто производители, оцененные в одних условиях как улучшатели, оказываются нейтральными или даже ухудшателями в других.

Для решения этой проблемы профессором С. Хендерсоном из Корнельского университета в 70-е годы XX века был предложен метод BLUP. Название BLUP представляет собой аббревиатуру от английского Best Linear Unbiased Prediction (наилучший линейный несмещенный прогноз). Изначально речь шла только о теоретической модели, которая была абсолютно неприемлема для практического применения. Разработка в последующие годы методов расчета и различных моделей для оценки племенной ценности на основе BLUP привело к тому, что этот метод стал основным методом оценки племенной ценности крупного рогатого скота (с начала 80-х годов XX века) и свиней (с конца 80-ых годов XX века).

Сущность этого метода заключается в использовании статистических поправок на влияние поддающихся учету факторов. При этом следует различать статистический метод BLUP и модель, которая используется для описания данных. Модель описывает, какие причинные факторы (селекционное значение, ферма, сезон, материнское влияние и т.д.) оказывают влияние на продуктивность. Метод представляет собой

способ расчета, учитывающий в оцениваемых значениях влияние описанных в модели различных факторов.



Рис. 5. Основные свойства BLUP-оценки племенной ценности.

Все основные статистические свойства BLUP отражены в названии метода (рис. 5).

«Best» указывает точность значения оценки и означает, что ошибка оценки племенной ценности настолько мала, насколько это может быть при наличии имеющегося количества информации.

«Linear» означает, что статистическая модель, на основании которой происходит оценка племенной ценности, состоит из суммирования влияния причинных факторов. Нелинейные модели также могут иметь место, однако в животноводстве обычно редко используются.

«Unbiased» означает, что оцениваемая племенная ценность не смещена (не искажена). Не смещенность (не искаженность) является важнейшим свойством, которое отличает BLUP от селекционных индексов. Именно следствием свойства несмещенности племенной ценности является возможность корректного сравнения значений племенной ценности отдельных животных друг с другом.

«Prediction» означает прогноз.

BLUP является своеобразным вариантом индексной оценки. Коэффициенты этого индекса находятся на основании разложения общей дисперсии признака на факториальные, а сам он представляет собой уравнение регрессии. Преимуществом данного метода является то, что он позволяет увеличить число потомков для оценки, максимально нивелируя влияние средовых факторов.

Главное достоинство метода BLUP состоит в том, что он позволяет максимально использовать всю имеющуюся информацию об оцениваемом животном. Соглашаясь с разработчиками и сторонниками этого метода в том, что он является достаточно точным и снимает ряд проблем, существующих при оценке животных, не следует забывать, что не существует абсолютно надежных статистических методов. Примером этому служит история с использованием в селекции коэффициента наследуемости. Несмотря на теоретическую обоснованность этого показателя, дань увлечения которому отдали многие ученые и практики, оказалось, что сфера его применения довольно узка. В конечном итоге он позволил лишь дифференцировать признаки по степени наследственной обусловленности и с весьма невысокой степенью надежности прогнозировать селекционный процесс.

Наиболее совершенным приемом селекции, основанным на применении методов вариационной статистики, является использование индексов EPD (expected progeny difference, ожидаемое различие

потомства). Система индексов EPD – это система оценки племенной ценности всех генов, влияющих на проявление интересующего признака, она используется в качестве меры сравнения животных одной породы из разных стад. В дополнение к индексу племенной ценности для каждого отдельно взятого производителя рассчитывается точность оценки селекционно-значимых признаков, которая зависит от количества информации о предках и потомках данного животного. Значение точности составляет от 0 до 1 (чем больше значение, тем выше доверие) и является наиболее эффективным инструментом управления риском.

В 20-е – 40-е годы прошлого столетия определился и второй подход к решению данной проблемы. У истоков его стоял один из выдающихся генетиков XX века А.С. Серебровский. При решении данной проблемы он пошел иным путем, сосредоточив внимание на разработке приемов генетического анализа качественных признаков.

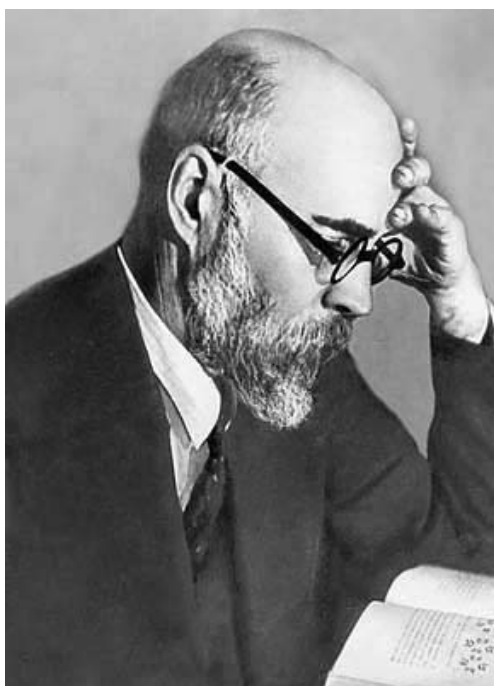


Рис. 6. Александр Сергеевич Серебровский (1892—1948). Выдающийся русский, советский генетик. Член-корреспондент АН СССР, академик ВАСХНИЛ. Автор фундаментальных работ в области генетики животных, теории гена, генетики популяций.

В основу его метода был положен поиск менделирующих генов, сцепленных с генами, влияющими на качественные признаки. Позднее это направление получило свое развитие в работах Мазера (1942), Вагана (1948), Уолстенхолма (1963) и других исследователей. К сожалению, в силу обстоятельств, сложившихся в отечественной науке, идеи А.С. Серебровского стали широко известны лишь в 70-е годы.

Одно из преимуществ данного подхода состоит в том, что он позволяет непосредственно учесть влияние аллельных и межаллельных взаимодействий. Было бы несправедливо забыть о том, что решение этой проблемы искалось и в рамках биометрической генетики. Однако ничего кроме абстрактных математических моделей, неприменимых в практике селекции, основанной на статистических подходах, оно не дало.

Вместе с тем многие из идей, заложенных в эти модели, были удачно использованы в экспериментальной генетике и сыграли свою роль при разработке основ маркерной селекции. Правда, в литературе этот процесс получил не совсем удачное название – маркерзависимая селекция.

Этот термин является неудачным вариантом сокращения (вопреки всем правилам русского языка) перевода с английского оригинала – marker assisted selection. Более правильно перевести это как селекция по маркерам или маркерная селекция. Последнего термина мы и будем придерживаться. Предвидя возможное возражение, что он не полностью отражает суть процесса, заметим, что любой термин – это символ, иероглиф, кратко обозначающий совокупность стоящих за ним явлений.

Вместе с тем между классическим подходом к использованию маркеров, предложенным А.С. Серебровским (1970), и современной селекцией по маркерам имеется существенное различие. Маркер или сигнал, по А. С. Серебровскому, это наследственно детерминированный признак имеющий, четко выраженные морфологические градации. Таким образом, в основе классической схемы выявления как сигнального гена,

как и сцепленных с ним генов, влияющих на формирование продуктивного признака, лежит поиск генетического полиморфизма на основе анализа фенотипических вариантов. Современная же методика выбора маркеров может базироваться как на классической схеме анализа, так и на принципах реверсивной генетики.

Г. Брем с соавторами (1995) так объясняют на молекулярном уровне различия между этими двумя подходами: «Классическим путем выявления гена является биохимический анализ развития признака и последующая идентификация кодируемого протеина как непосредственного продукта гена. Как только найден искомый протеин, может быть идентифицирован и локализован соответствующий ему ген. Таким образом, классическая схема поиска гена представляет собой следующую очередность: признак, генный, продукт, ген. В реверсивной генетике, наоборот, сначала выявляют ген, затем продукт этого гена и его влияние на признак». В качестве примера применения методов реверсивной генетики рассмотрим анализ мышечной дистрофии по типу Duchenne (DMD) у человека. На основании семейного анализа было показано, что данный ген локализован на X- хромосоме. От референтных семей были получены образцы ДНК, чтобы путем ее сравнения у рецессивных носителей и генетически здоровых особей, выяснить какой регион X-хромосомы изменен у рецессивных носителей DMD. Интересующий исследователей участок ДНК от генетически здорового человека был клонирован и гибридизирован с мРНК из мышечной ткани для идентификации протеина, мутационные изменения которого влекут за собой развитие DMD. Это довольно трудоемкий процесс. По данным Г. Брема с соавторами (1995) для изучения гена DMD потребовалось объединить усилия 24 исследовательских институтов из 8 стран. Однако в современной селекции принципы реверсивной генетики лежат не только в основе выявления и

изучения новых маркеров, но и используются при анализе связи мутаций известных генов с продуктивностью животных.

Стратегия оценки новых маркерных генов за рубежом ведется, в первую очередь, с определением экономического значения и востребованности рынком разрабатываемого продукта по следующим параметрам:

- наличие признак-специфичных мутаций в основных породах и повторяемость системы тестирования в технологических производственных процессах;
- значимость аналитической системы для соответствующих коммерческих групп животных;
- связь полиморфизма исследуемого маркерного гена с остальными продуктивными качествами;
- связь с другими маркерными генами этого признака;
- разработка генетических профилей для основных породных типов.

Хотя всесторонняя оценка увеличивает затраты на исследование и приводит к задержке выхода продукта на рынок, считается, что это делается в интересах животноводства.

Для молекулярно-генетического маркирования наибольшее значение имеют ДНК маркеры. Они имеют ряд преимуществ, которые делают их важным инструментом селекции:

1. Позволяют однозначно отличить гомозиготный генотип от гетерозиготного.
2. Не подвержены влиянию условий среды и имеют коэффициент наследуемости $h^2=1,0$.
3. Как правило, определяются независимо от возраста (в клетках эмбриона, в образцах крови и т.д.)

4. Могут быть определены у обоих полов (например, маркер генотипа, определяющего число поросят в гнезде, относится как к маткам, так и к хрякам).
5. Маркирование признака, который может быть определен после убоя (например, с использованием рианодинового гена).

Маркерные гены особенно актуальны для оценки признаков, фенотипическое проявление которых происходит относительно поздно, ограничено полом или на проявление которых большое влияние оказывают факторы окружающей среды. Такими признаками являются: резистентность или предрасположенность к болезням, плодовитость, молочная и мясная продуктивности и т.д. По числу генов, влияющих на проявление признака, все признаки можно подразделить на две категории.

1. Моногенные или олигогенные признаки (главные гены). Для таких признаков, в случае приблизительной локализации гена, существует возможность идентификации ДНК-маркеров, расположенных внутри главного гена или в непосредственной близости от него.
2. Полигенные признаки (локусы количественных признаков, QTL). К признакам с полигенной природой наследования относятся большинство важных хозяйственно-полезных признаков сельскохозяйственных животных. Полигенная природа признака означает, что его количественный уровень генетически определяется различными аллельными вариантами целого ряда локусов, разбросанных по всему геному.

Генетическое улучшение в стаде может идти по 4 направлениям: отбор отцов и матерей как производителя, так и матки. Применение маркерной селекции возможно как по каждому из них с целью сокращения временного интервала на выявление животных–носителей желательных аллелей по контролируемым или улучшаемым признакам, так и в

совокупности (для наиболее полного использования генетического потенциала животных).

Вместе с тем маркерная селекция не отрицает традиционных подходов к генетическому улучшению стад. Более того, оба эти подхода взаимно дополняют друг друга. Использование генетических маркеров позволяет ускорить процесс отбора животных, а индексные методы точнее оценить эффективность этого отбора.

Вопросы для самопроверки по теме 1.

1. Понятие генотип и фенотип.
2. Типы межаллельных взаимодействий.
3. Генетическая природа продуктивных признаков.
4. Наследуемость.
5. Селекционные индексы.
6. Сущность селекции по маркерам.
7. Преимущества селекции по маркерам.
8. Стратегия выбора маркеров.
9. Различия между классической и реверсивной генетикой.
10. Что такое QTL?

Глава 2. Современные представления о гене

Эволюция представлений о гене. Структура и функционирование гена у эукариот. Генетическая природа полиморфизма.

В 1865 г. в трудах Общества естествоиспытателей Брно появилась небольшая статья, в которой каноник и учитель физики и естественной истории И. Г. Мендель изложил результаты своих многолетних наблюдений над растительными гибридами. Трудно сказать, что более заслуживает восхищения: строгость проведения экспериментов, четкость изложения и уважение к предшественникам, глубокое понимание проблемы. Бесспорно, он был первым, кто открыл, идущим за ним, основное: дискретную природу наследственных детерминантов, их независимость друг от друга. И произошло это в то время, когда только еще предстояло открыть хромосомы, митоз, мейоз, в эпоху, когда господствовала гипотеза тысячелетней давности, согласно которой в основе наследственности лежит смешение кровей. Не это ли было причиной долгого забвения работы, ставшей классической?

Однако на протяжении десятилетий, отделяющих 1865 год от даты переоткрытия законов Менделя, шло накопление материалов, легших в фундамент классической генетики. Многие исследователи XIX века внесли свой вклад в ее развитие. Хертвиг (1875) впервые описал оплодотворение у животных и воспроизводство клеточных ядер. В 1880-1882 гг. Флеминг наблюдал расхождение сестринских хроматид при митозе. Ван Бенеден (1883) отметил регулярное равномерное распределение хромосом между дочерними ядрами. Индивидуальные особенности каждой пары хромосом были выявлены Бовери (1888). Сам термин *хромосомы* предложил Влайдер (1888).

В 1885 г. Негли выдвинул гипотезу *идиоплазмы*. По его представлениям, это небольшая часть цитоплазмы, содержащая (в современных терминах) информацию, необходимую для развития следующего поколения. Он первым сформулировал свойства, какими должен обладать носитель наследственной информации. Наиболее важное свойство мейотического деления – упорядоченная редукция хромосом была обнаружена Вейсманом.

1902 год считается годом рождения хромосомной теории наследования, в том же году Геррод установил аутосомно-рецессивный тип наследования алкаптонурии. Вслед за этим было показано, что многие врожденные аномалии наследуются как простые менделевские признаки.

Термин «ген» был предложен Иоганесеном в 1909 г. Тогда же он ввел термин «аллель», а также понятия «генотип» и «фенотип». Под понятием генотип подразумевается совокупность наследственных задатков организма, а фенотип представляет собой совокупность признаков организма. Хотя он ввел эти термины, исходя из результатов своих знаменитых опытов с бобами, необходимость такой дифференцировки непосредственно вытекала из природы расщепления наследственных задатков.

Отправным моментом в теории гена на тот момент оставались работы Менделя. Однако, несмотря на универсальность законов Менделя, уже ранним его последователям стало ясно, что эти законы удобная, но сильно идеализированная модель. Расхождение экспериментальных данных с теорией проявилось в нарушении третьего закона Менделя. Независимое комбинирование признаков во втором поколении основано на независимой перегруппировке генов при редукционном делении.

В 1902 г. Сеттон обратил внимание на параллелизм в поведении хромосом в мейозе и наследовании признаков у одного из видов

кузнечика. Он сделал вывод о нахождении генов этих признаков в хромосомах и ограниченности третьего закона Менделя. В 1916 г. Бриджес описал первый случай аномального распределения хромосом в мейозе у дрозофилы и назвал этот феномен *нерасхождением*.

В конечном итоге Морган со своими учениками Стертевантом, Бриджесом и Меллером к середине 20-х годов прошлого века сформулировал представление о линейном расположении генов в хромосомах и создал первый вариант теории гена. Проблема гена стала центральной проблемой генетики. Но ген все еще продолжал существовать лишь как абстрактная структура - некий атом наследственности.



Рис. 7. Томас Хант Морган (1866 – 1945). Американский зоолог и генетик. Совместно со своими учениками Стертевантом, Бриджесом и Меллером в середине 20-х годов нашего века сформулировал хромосомную теорию наследственности. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине, 1933 г.

К концу 20-х годов сложилось представление о гене как о материальной частице, лежащей в хромосоме, способной к саморепродукции и являющейся минимальной единицей рекомбинации,

мутирования и генетической функции. Цепочка сцепленных генов представлялась, как нитка корпускул или бусинок, механически связанных друг с другом. Ген, согласно этим представлениям, считался неделимым с помощью кроссинговера.

В 1925 г. русские микробиологи Г.А. Надсон и Г.С. Филипов обнаружили влияние радиации на мутационный процесс у низших грибов. Ученик Т. Моргана, американский генетик Г. Меллер, в 1927 г. продемонстрировал мутационный эффект рентгеновских лучей в экспериментах с дрозофилой, а другой американский биолог Стадлер в том же году открыл аналогичные эффекты у растений.



Рис. 8. Георгий Адамович Надсон (1867 – 1939). Русский, советский ботаник, микробиолог и генетик. Заслуженный деятель науки РСФСР. Член-корреспондент АН СССР. Совместно с Филиповым на низших грибах показал возможность искусственного получения мутаций под действием ионизирующей радиации.

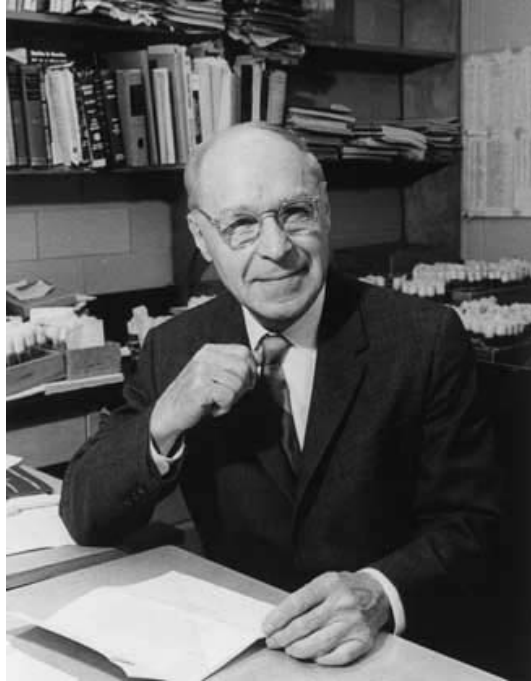


Рис. 9. Герман Джозеф Меллер (1890 –1967). Американский биолог и генетик. Ученик и сотрудник Моргана. Один из авторов хромосомной теории наследственности. В 30-е годы XX века работал в Советском Союзе. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине, 1946 г.



Рис. 10. Николай Петрович Дубинин (1906/7-2007). Крупный советский генетик. Ученик А.С. Серебровского. Академик АН СССР, действительный член ряда зарубежных академий наук. Герой социалистического труда. Лауреат Ленинской премии. Автор классических работ по эволюционной, радиационной, молекулярной и космической

генетике, проблемам наследственности человека, он дал научное обоснование селекции сельскохозяйственных животных, растений и микроорганизмов, внес крупный вклад в развитие медицинской генетики.

Метод искусственного получения мутации явился мощным инструментом для изучения структуры гена. В 1929 группа советских ученых во главе с А.С. Серебровским, в состав которой входил и Н.П. Дубинин, приступила к изучению строения гена у *Drosophila melanogaster*. В результате этих исследований было показано, что ген имеет сложную структуру.

Лауренс с коллегами, исследуя синтез пигментов у цветов, а Эфроусси и Бидлом – мутации окраски глаз у дрозофилы, в 40-х годах прошлого века пришли к выводу, что определенный ген контролирует определенную реакцию. Дальнейшее развитие этих исследований Эфроусси на дрожжах, а также Бидла и Татума на актиномицетах позволило постулировать принцип «один ген - один фермент». Однако, что такое сам ген, оставалось непонятным.



Рис. 11. Джордж Уэллс Бидл (1903 – 1989). Американский генетик. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине, 1958 г. В опытах, проведенных совместно с Таутум (в другой транслитерации Тейтем) доказал, что определенные гены отвечают за синтез специфических клеточных веществ.



Рис. 12. Николай Константинович Кольцов (1872–1940). Выдающийся русский, советский биолог, автор идеи матричного синтеза «наследственных молекул».

В 20-е годы выдающийся русский биолог Н.К. Кольцов выдвинул гипотезу о матричной природе репродукции генетического материала. Однако длительное время природа носителя наследственной информации оставалась неясна. Сам Н.К. Кольцов полагал, что эту функцию выполняют белки. Хотя еще в 1924 г. Р. Фельген обнаружил, что в состав хромосом входит дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), впервые выделенная Мишером (1868) из спермы лосося и клеток гноя, потребовалось еще двадцать лет для того, чтобы стала ясна роль этого вещества в передаче наследственной информации.

Это произошло в 1944 г., когда Эвери, Мак-Клод и Мак-Карти установили, что ДНК, выделенная из одного штамма пневмококков, способна вызывать генетическую трансформацию других штаммов и реплицироваться в них. В 1948 г. Буавена, Вандрели и Вандрели показали, что содержание ДНК в клетках напрямую зависит от числа содержащихся в них хромосом.

Труды Эвери послужили толчком, побудившим Чаргаффа заняться в 1950 г. детальным анализом молекулярного состава ДНК. В процессе этих исследований были открыты знаменитые равенства Чаргаффа: $A=T$, $G=C$, которые Уотсон и Крик смогли объяснить в 1953 г., когда они построили свою модель двойной спирали ДНК, основываясь на данных рентгеноструктурного анализа, проведенного Уилкинсоном и его сотрудниками.

Основные свойства пространственной модели ДНК, предложенной Уотсоном и Криком, сводились к следующему:

1. Молекула ДНК представляет собой двойную спираль, цепи которой соединены водородными связями между азотистыми основаниями.

2. Цепи двойной спирали ДНК комплиментарны, т.е. взаимно дополняют друг друга: аденину одной цепи в другой цепи соответствует тимин, а гуанину – цитозин, что обеспечивает постоянство диаметра двойной спирали.



Рис. 13. Джеймс Дьюи Уотсон (родился 6 апреля 1928). Выдающийся американский биолог. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1962 г. — совместно с Фрэнсисом Криком и Морисом Х. Ф. Уилкинсом за открытие структуры молекулы ДНК.

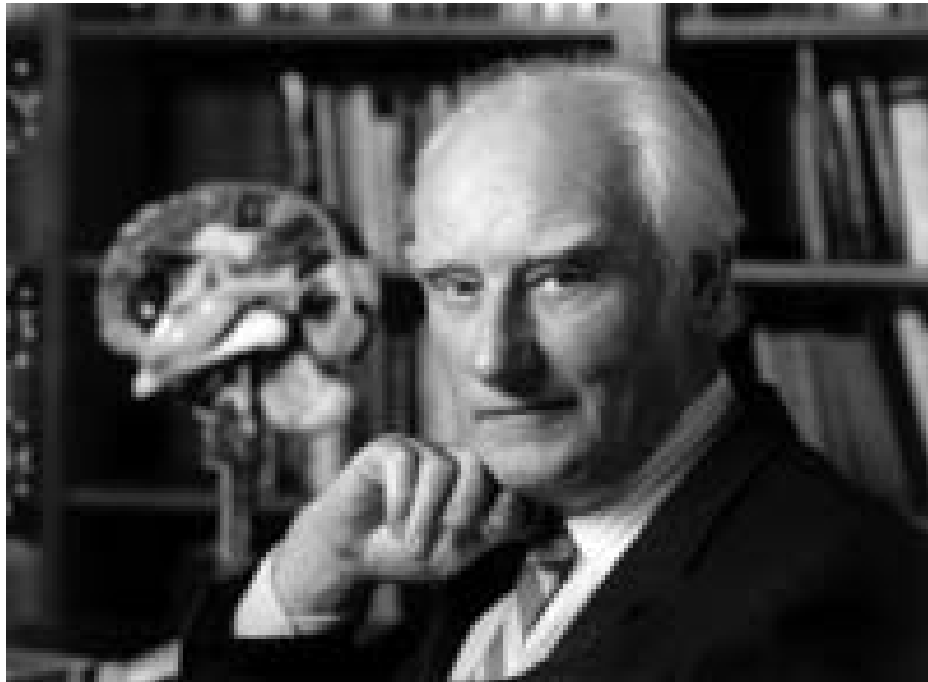


Рис. 14. Френсис Крик (1916 — 2004). Английский биолог, врач и нейробиолог. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1962 г. — совместно с Джеймсом Д. Уотсоном и Морисом Х. Ф. Уилкинсом за открытие структуры молекулы ДНК.

После открытия генетической роли ДНК оставалось выяснить, каким образом сочетание из 4-х нуклеотидов позволяют хранить и передавать информацию о последовательностях аминокислот, определяющих состав различных белков. На основании модели строения ДНК Уотсон и Крик предположили, что гены отличаются друг от друга чередованием пар нуклеотидов, а наследственная информация закодирована в виде их последовательностей.

К середине 50-х годов прошлого века стало ясно, что последовательность аминокислот различных белков записана в ДНК чередованием нуклеотидов, образующих генетический код. Первая, но неудачная, модель генетического кода была предложена известным американским астрофизиком Гамовым (1954). Только в 1961 г. исследования, проводившиеся в этой области, позволили Крику и его сотрудникам показать, что информация считывается группами из трех оснований, начиная с исходной точки, и всегда в одном направлении. Значительный вклад в расшифровку генетического кода внесли Ниренберг, Маттей, Очоа (1961) и другие исследователи. В результате этих работ была не только проведена расшифровка генетического кода, но и показана его биологическая универсальность. Генетическому коду оказались присущи следующие свойства:

1. Последовательность аминокислот кодируется в ДНК триплетами оснований (сочетаниями из трех нуклеотидов, получивших название кодонов).

2. Код не перекрывается – считывание информации возможно только с одной точки, иначе говоря, смещение «рамки считывания» приводит к искажению информации.

3. Код «без запятых» – между триплетами, кодирующими аминокислоты, не существует никаких специальных сигналов.

4. Код вырожден (избыточен) – одной аминокислоте соответствует несколько триплетов (группа кодирования, кодоны-синонимы).

5. Помимо кодирующего код содержит триплеты, не являющиеся кодонами, так называемые нонсенс-кодонами.

6. Код универсален (одинаков) для всех биологических видов.

На рис. 15 схематически показана эволюция представлений о гене, происшедшая с момента открытия Г. Менделем основных законов наследственности.

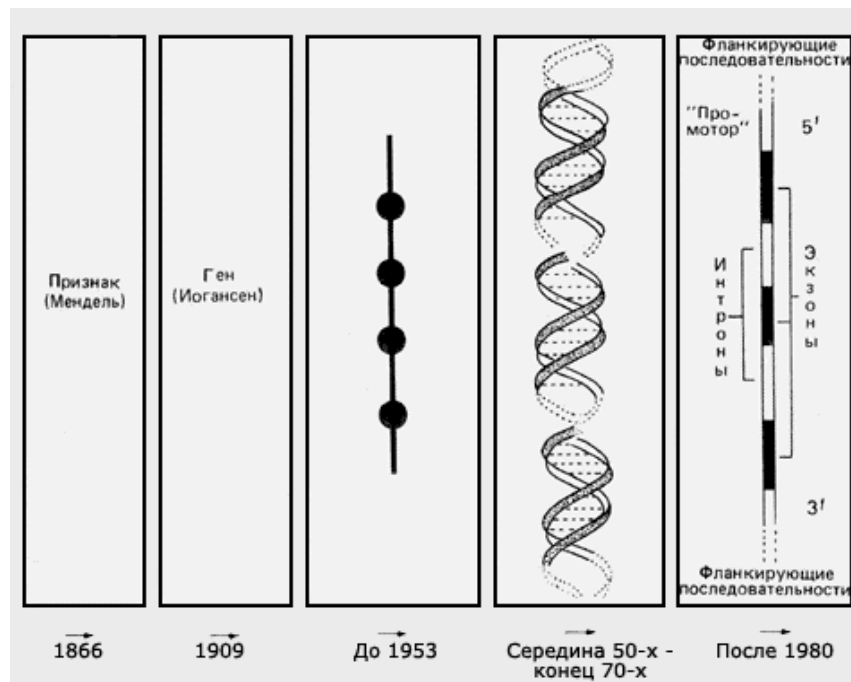


Рис. 15. Эволюция взглядов на природу гена. От контролирующего признак абстрактных наследственных задатков Г. Менделя до представлений о гене, как сложно организованном участке ДНК, содержащем кодирующие и некодирующие фрагменты. (Фогель Ф, Мотульский А., 1989; 1990)

Согласно современным данным, ген представляет собой участок ДНК, содержащий закодированную последовательностью нуклеотидных оснований информацию о составе полипептидной цепи. Частным случаем являются гены, кодирующие различные классы сервисной РНК (рибосомальная, транспортная и лидерная), а также проонкогены и мобильные генетические элементы, при этом

продуктом, кодируемым геном, является не полипептид, а нуклеиновая кислота.

В 1977 г. стало ясно, что гены высших организмов, в отличие от генов бактерий, «мозаичны», т.е. состоят из участков кодирующих последовательностей (экзоны), разделенных вставками из «молчащих» последовательностей (интроны). Число интронов может сильно варьировать: от 2 в генах гемоглобина до нескольких десятков в гене коллагена у человека. Размер интронов колеблется от 100 п.н. до 1000 п.н. или 1 kb и более. Таким образом из всего прерывистого гена (длиной обычно от 3 до 10 kb) лишь 10-20 % ДНК несет информацию о составе кодируемого им продукта.

Открытие мозаичной структуры гена внесло коррективу в представления о процессах связанных с биосинтезом белка в клетке. В связи с тем, что транскрибируемая РНК несет некодирующие вставки она получила название пре-мРНК, и стало ясно, что выходу информационной РНК предшествует процесс удаления интронных последовательностей и восстановления целостной структуры молекулы РНК, получивший название сплайсинга (рис. 16).

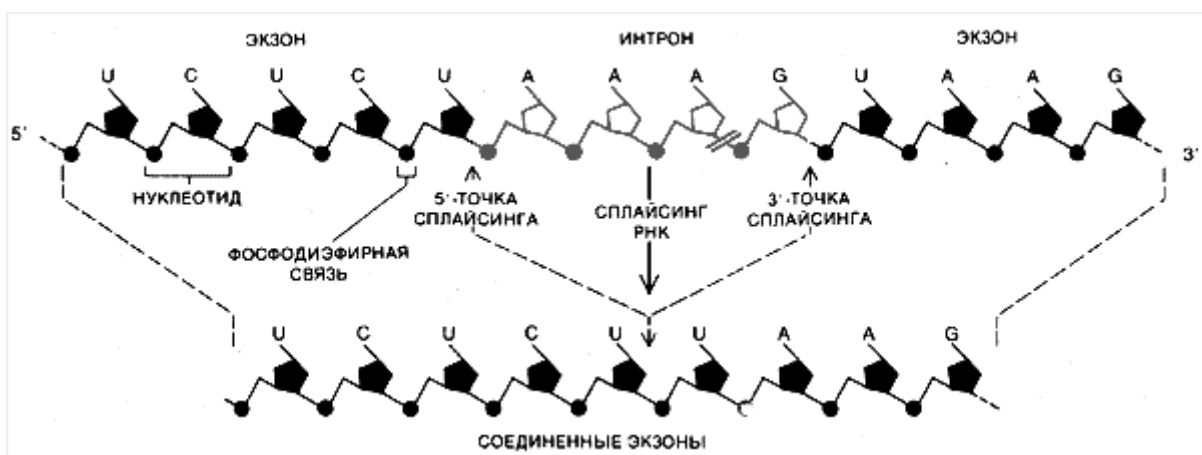


Рис. 16. Сплайсинг и образование иРНК.

На сегодня известно три или четыре разных механизма сплайсинга. Один из них описан в 1980 г. Абельсоном, обнаружившим ферменты, вырезающие интроны из молекул – предшественников транспортной РНК у дрожжей. В 1978 г. Шамбон предположил, что границы интронов и экзонов опознаются ферментами сплайсинга по сигнальным нуклеотидам.

На основании анализа нуклеотидных последовательностей у всех изученных к настоящему времени генов представляется вероятным, что интроны всегда начинаются парой нуклеотидов ГУ и оканчиваются дуплексом АГ. Точный разрез по границе экзон-интрон обеспечивается тем, что молекула интрона обладает способностью складываться таким образом, что оба конца его оказываются рядом. В этом процессе принимают участие малые РНК, комплиментарные участкам интронов, прилегающим к терминирующим дуплексам, получившие название – «лидерные последовательности». Терминирующие дуплексы являются сигналом, позволяющим молекулярному комплексу, обеспечивающему сплайсинг опознать место прикрепления лРНК, которая, связываясь с комплиментарными участками интрона, способствует образованию им петли.

Второй тип сплайсинга был обнаружен Чех в 1982 при изучении биосинтеза рибосомальной РНК. Оказалось, что в данном случае сама нуклеотидная последовательность интрона обладает псевдоферментной активностью, т.е. интрон вырезает себя сам (аутокаталитический сплайсинг).

Но наиболее интересным оказался феномен, выявленный Кошко и Ламуром (1978). Для митохондриального гена, кодирующего синтез цитохрома b, было показано, что интрон может вырезаться ферментом, который кодируется нуклеотидными последовательностями самого интрона. Этот фермент получил название мРНК-матуразы (от франц. maturation - созревание). Было показано, что матуразы играют

регуляторную в координированной экспрессии генов (Слонимски, Даншен; 1981). В ряде случаев они являются белками, ускоряющими аутокаталитическое вырезание интронов. Однако наиболее значимым результатом этих исследований, явилось открытие роли интронов в хранении генетической информации, что позволило Дашену и Слонимски (1987) выдвинуть принцип – «Один ген может кодировать несколько белков».

Существует, по крайней мере, два механизма реализации схемы "один ген – несколько белков", которые несколько видоизменяют классическую концепцию гена, но не опровергают ее: во-первых, кодирование белков интронами; во-вторых, синтез разных белков с одной матрицы в результате модификации сплайсинга (альтернативный сплайсинг).

На рисунке 17 показаны семь различных транскриптов ПХ, образующихся выпадением от одного до четырех полных экзонов. Экзоны показаны прямоугольниками и обозначены от 1 до 9 в соответствии со своим номером в гене ПХ. Отсутствующие экзоны изображены пунктиром. Полный транскрипт мРНК ПХ обозначен буквой Т. Изоформы, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга, обозначены А1-А7. Уменьшение размера альтернативных транскриптов мРНК ПХ по сравнению с полным транскриптом показано справа (В). Предполагаемые аминокислотные последовательности альтернативных транскриптов ПХ. Активные остатки Asp-34 и Asp-216 (нумерация химозина) показаны курсивом и обозначены как 34 и 216, соответственно. Аминокислотные остатки, вовлеченные в поддержание билобулярной структуры химозина, показаны звездочками.

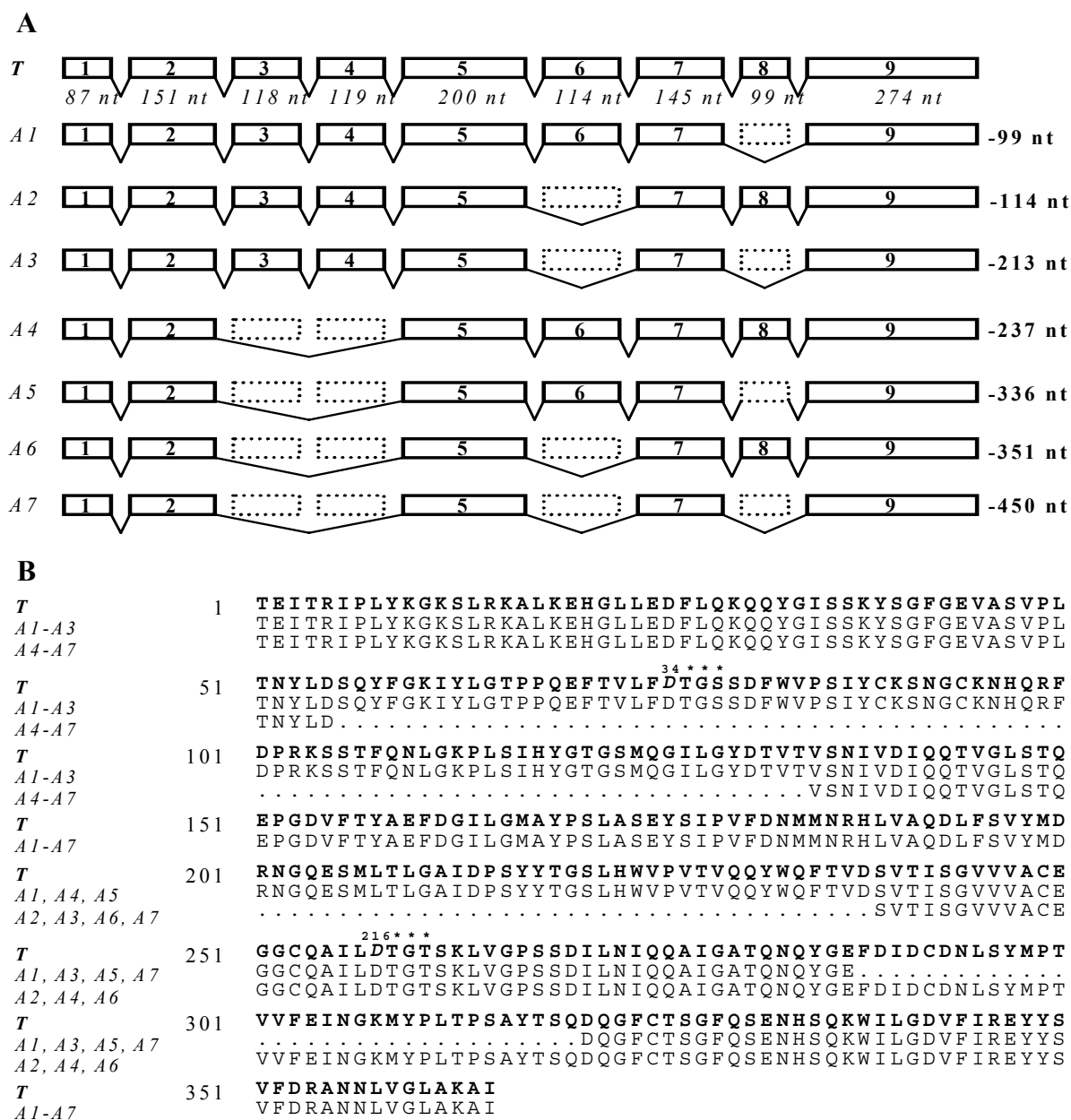


Рис. 17. Схематическое изображение множественных сплайсинговых форм мРНК прохимозина крупного рогатого скота (ПХ) и предполагаемые аминокислотные последовательности альтернативных транскриптов. (А).

Так, например, Зиновьевой Н.А. с соавторами (2002) было доказано наличие семи различных альтернативных транскриптов гена прохимозина (ренина) крупного рогатого скота, более широко известного под названием «сычужного фермента». Было доказано, что альтернативные транскрипты образуются в результате выпадения в процессе сплайсинга

последовательностей 3+4, 6 и 8 экзонов в различных комбинациях (рис. 17).

В 1960 г. Жакоб и Моно предложили первую модель, объясняющую, как же происходит регуляция активности (экспрессии) генов. Механизмы регуляции экспрессии генов у бактерий в основном выяснены и хорошо укладываются в схему Жакоба-Моно. Но у высших организмов (растений и животных) они оказываются иными.

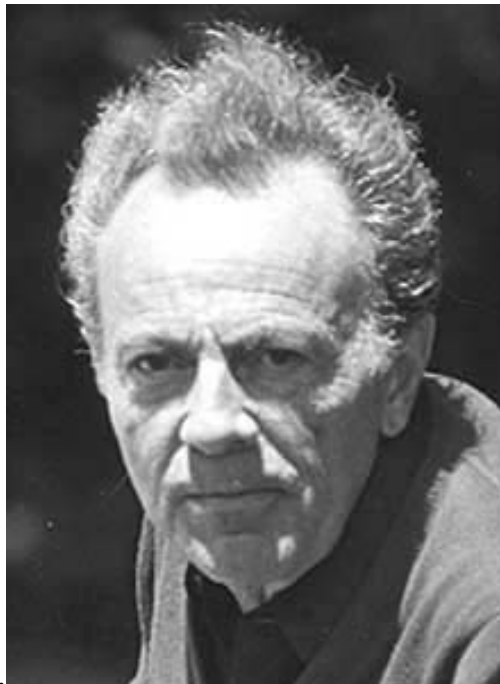


Рис. 18. Франсуа Жакоб. Родился 17 июня 1920 г. В начале 50-х гг. Франсуа Жакоб и его коллега Эли Вольман, проводя исследования в Пастеровском институте, установили, что хромосомы бактериальных клеток представляют собой кольцевые структуры, прикрепленные к клеточной мембране, и что к этим хромосомам можно добавлять или, наоборот, отщеплять от них небольшие фрагменты генетического материала. В конце 50-х гг. Франсуа Жакоб и Жак Моно открыли одну из трех разновидностей РНК – информационную РНК. В 1965 г. Жакоб совместно с Львовым и Моно был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине «за открытия, касающиеся генетического контроля синтеза ферментов и вирусов».



Рис. 19. Жак Люсьён Моно́ (1910 — 1976). Французский биохимик и микробиолог, лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1965 году (совместно с Франсуа Жакобом и Андре Львовом) «за открытия, касающиеся генетического контроля синтеза ферментов и вирусов». В 1971 году Моно становится директором Пастеровского института.

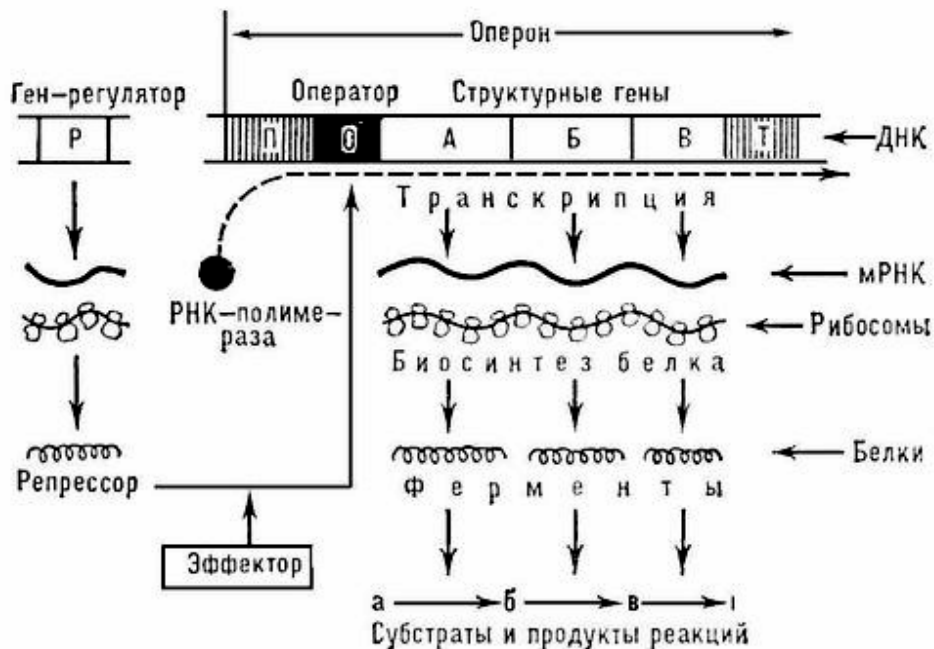


Рис. 20. Строение и функция оперона.

У бактерий и высших гены, кодирующие белки для взаимосвязанных процессов в клетке, зачастую оказываются сгруппированными вместе под общим контролем. Подобная совокупность генов с общей системой регуляции называется *опероном* (рис. 20).

Регуляция активности генов – многоуровневый процесс. Уже РНК-полимераза начинает синтез с определенной точки. Этот фермент обладает сродством к определенному участку ДНК (*промотору*), расположенному перед геном. Скорость образования мРНК зависит от нуклеотидной последовательности промотора. «Решение» о начале транскрипции принимают специальные белки-репрессоры. Репрессор специфичным образом узнает короткий (20 п.н.) участок ДНК (*оператор*) и, прикрепившись к нему, блокирует начало синтеза мРНК. Бактериальные клетки используют два варианта регуляции активности генов.

Первый из них – *позитивная ферментная адаптация* – имеет место в случае регуляции лактозного оперона у *E.coli*. Если бактерия находится в среде, не содержащей лактозы, то ферменты, входящие в лактозный оперон, не нужны клетке. Репрессор в данном случае связан с оператором и блокирует экспрессию данной группы генов. При внесении в среду лактозы, небольшая ее часть, попав в клетку, модифицируется в алколактозу и присоединяется к репрессору, в результате чего комплекс репрессор-оператор распадается и происходит считывание мРНК с оперона (рис. 21).

Существует и *негативная адаптация*. Примером ее служит синтез аминокислот в бактериальных клетках. Гены ферментов, контролирующих этот процесс, регулируются репрессором, который присоединяется к оператору только при избытке аминокислоты. При снижении концентрации продукта репрессор отсоединяется от оператора и происходит транскрипция мРНК, необходимой для синтеза соответствующих ферментов.

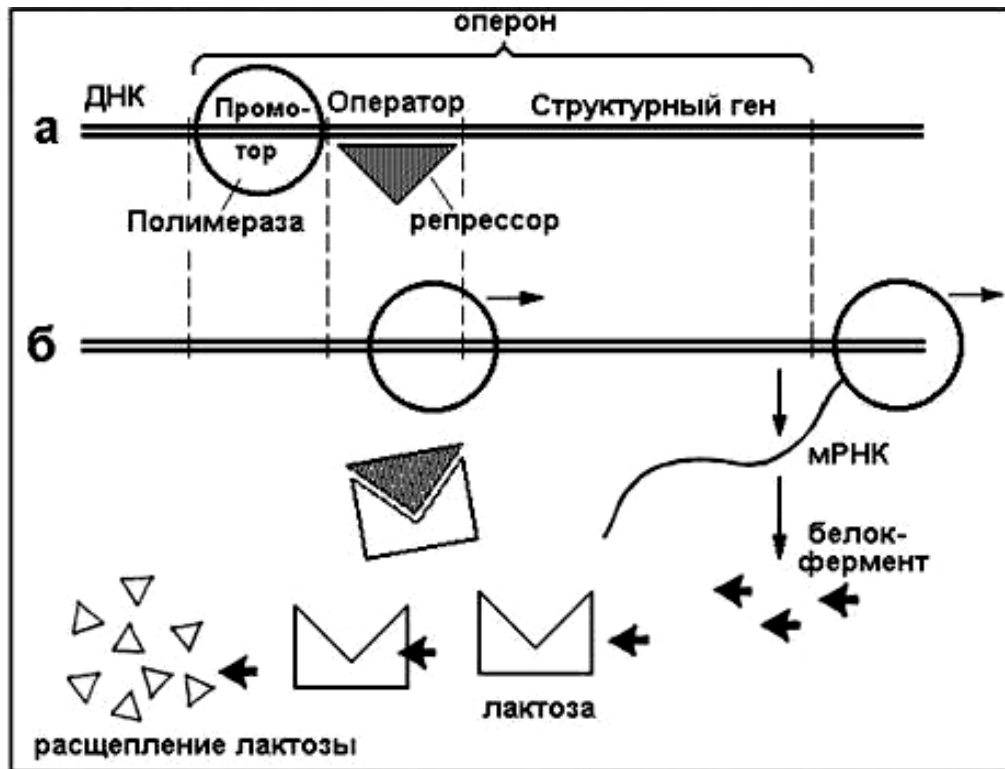


Рис. 21. Схема регуляции лактозного гена E. Coli по Жакобу и Моно

Регуляция экспрессии у эукариотических организмов гораздо сложнее. Существует три класса РНК-полимераз, каждая из которых отвечает за синтез своего продукта (рРНК, тРНК, мРНК). Специальные последовательности определяют эффективную транскрипцию генов.

У высших организмов существует несколько уровней контроля активности генов. Первый, на котором специфические белки взаимодействуют с промоторными, терминаторными и усилительными последовательностями – энхансерами. У эукариот более детально изучены промоторы взаимодействующие с РНК-полимеразой II. Они содержат три гомологичных участка в районах с координатами 25, 75 и в стартовой точке. Стартовым основанием служит аденин, фланкированный (ограниченный) с двух сторон пиримидинами. На расстоянии 19-27 п.н. расположены 7 п.н., называемых по 4 начальным нуклеотидам последовательностью ТАТА, или еще известных по имени открывшего их ученого как «ящик Хогнесса». Еще левее (в направлении 5'-3') в

положении от 70 до 80 находится «ящик ЦААТ». Последовательность ТАТА контролирует выбор стартового нуклеотида, а ЦААТ – первичное связывание РНК-полимеразы с ДНК-матрицей.

На втором уровне главное значение имеют крупные участки хроматина (*домены*), придающие генам потенциально активное или репрессированное состояние. К подобным структурам относятся MAR-элементы, обеспечивающие прикрепление молекулы ДНК к ядерной мембране.

Бриттен и Девидсон в 1969 г. предложили схему регуляции активности генов эукариот, основная идея которой состоит в том, что гены-продюсеры, т.е. структурные гены кодирующие белки, находятся под контролем генов-рецепторов (или операторов), реагирующих на особые молекулы – активаторы. В роли активаторов выступают малые молекулы ядерной РНК, транскрибирующиеся с генов-интеграторов (или регуляторов), которые в свою очередь контролируются сенсорными генами. Гены-интеграторы и рецепторы организованы в ряды. Внешний сигнал, например гормон, взаимодействуя с сенсором, может вызвать транскрипцию различных генов-продюсеров в результате каскада взаимодействий интегратора и рецептора.

В том же году свое объяснение этого явления дал Георгиев Г.П. (1969). Согласно его схеме к промоторной зоне прилегает группа акцепторных локусов, выполняющих регуляторную функцию. За промотором располагается семейство структурных генов. Предполагается, что сходные или идентичные последовательности акцепторных локусов присутствуют во многих единицах транскрипции.

Помимо известных механизмов в регуляции экспрессии, на уровне сплайсинга, принимают участие белки, кодируемые ядерными интронами. Эти белки получили название м-белков. Роль м-белков сводится к приведению пре-мРНК в удобное для сплайсинга положение.

Имеются также примеры регуляции экспрессии на уровне трансляции (Элен, 1987). Некоторые белки способны избирательно связываться со свободными молекулами своей мРНК. В результате этого не происходит образования комплекса рибосома-мРНК, что снижает или полностью блокирует дальнейший процесс сборки белка.

Еще один из механизмов регуляции активности генов был открыт Барбарой МакКлинток. МакКлинток обнаружила у кукурузы два своеобразных гена, функционально взаимосвязанных между собой. Один из них, получивший название Ds (dissociation – разрыв), стимулирует возникновение разрывов в месте его локализации. Вторым ген, без которого действие Ds не проявляется, был обозначен символом Ac (activator). Оба эти локуса, в отличие от обычных генов, обладали одним уникальным свойством: они были способны перемещаться по геному. За это качество они и подобные им элементы получили название «прыгающих» или мобильных генов (МГЭ).

Как оказалось, локус Ds обладает еще одним интересным свойством. Встраиваясь рядом с каким-либо нормальным геном (аллель дикого типа) или даже внутри его, Ds фактор подавляет его проявление (переводит в рецессивную форму). Эти своеобразные «рецессивные» аллели остаются весьма стабильными, если в генотипе отсутствует фактор Ac. В присутствии же его каждый из таких «рецессивных аллелей» оказывается «высокомутабельным», давая частые «мутации» к доминантному состоянию. Механизм этого явления заключается в том, что Ds ген вырезается и удаляется из данного места, возможно, перемещаясь в другой район той же или иной хромосомы. Следовательно, регуляторная активность мобильных элементов проявляется двояким образом: в результате изменения активности одного МГЭ под влиянием второго или путем модифицирующего действия МГЭ на прилегающие к нему стабильные гены. В настоящее время считается доказанным, что МГЭ,

которые Мак-Клинток открыла у кукурузы, на самом деле имеются у всех живых существ.

Из всего сказанного выше очевидно, что для достижения максимальной эффективности регуляции экспрессии генов природа использует целый набор различных механизмов. Их общая задача состоит в том, чтобы избежать ненужных затрат энергии и позволить клетке синтезировать необходимое для ее жизнедеятельности оптимальным образом.

Будучи элементарной единицей наследственности, ген, с одной стороны, выполняет функцию хранения, передачи и реализации наследственной информации, а, с другой, является основным элементом рекомбинационной и мутационной изменчивости. Разумеется, гены могут иметь различную структуру: содержать или не содержать интроны, различаться по их числу. Но общим для всех является то, что любой из них может существовать в разных формах – аллелях. Число аллелей может колебаться в широких пределах и достигать нескольких десятков. В случае если число аллелей более чем два, принято говорить о множественном аллелизме.

В популяциях наиболее распространены аллели «нормального» или «дикого» типа. Всякая другая форма рассматривается как «мутантный аллель». В генетике принято выделять доминантные и рецессивные аллели. Рecessивными называются аллели, не проявляющиеся в фенотипе, если особь не получила от своих родителей мутантный ген в двух экземплярах, т.е. не гомозиготна. Доминантные мутации, наоборот, проявляются независимо от того, в одинарном или двойном наборе присутствует данный аллель.

В основе мутаций, приводящих к возникновению аллельных вариантов гена, лежит феномен замены нуклеотидов в кодоне, приводящий к замещению одной аминокислоты на другую. Фенотипически это

проявляется наличием в стаде двух или нескольких различных генетически детерминированных форм, т.е. полиморфизмом.

Вопросы для самопроверки по теме 2.

1. Классическое определение гена.
2. Молекулярная природа гена.
3. Генетический код и его свойства.
4. Строение гена высших животных.
5. Сплайсинг. Механизмы сплайсинга.
6. Понятие оперона.
7. Методы регуляции экспрессии генов у бактерий.
8. Методы регуляции экспрессии генов у высших организмов.
9. Мобильные генетические элементы.
10. Природа генетического полиморфизма.

Глава 3. Генетические маркеры

История вопроса. Хромосомная теория и метод сигналей А.С. Серебровского. Понятие о маркере. Сцепление генов. Плейотропное действие генов. Главные гены. Понятие о генах-кандидатах.

Становление метода сигналей связано с работами по изучению генной карты у дрозофилы. Еще в ранних исследованиях Моргана и Меллера при изучении таких генов как *vortex*, *Notch*, *eosin* было отмечено, что их фенотипическое проявление сильно меняется при комбинации с другими генами. Опыты показали, что не сами гены *vortex*, *Notch*, *eosin* влияют на проявление указанных признаков, а какие-то другие, локализованные в тех же хромосомах, выявить влияние которых стало возможным, благодаря их сцеплению с сигнальными генами.

Термин сигнал (английский его синоним – маркер вошел в научный обиход гораздо позднее) ввел в двадцатые годы выдающийся русский генетик А.С. Серебровский (1970). Под этим термином А.С. Серебровский понимал аллеломорф менделирующего гена (дискретный признак), сцепленный с группой аллелей, определяющих проявление интересующего исследователя признака, как правило, полигенного, и тем самым выступающий в качестве своеобразной метки, позволяющей проследить наследование данной группы аллелей. В более широком смысле маркер – это любая наследуемая модификация структурных генов (аллели), анонимных нуклеотидных последовательностей или их материальных носителей – хромосом, с которыми сцеплена группа «аллелей интереса».

Основные принципы маркерной селекции – метод сигналей – впервые были сформулированы и детально разработаны А.С. Серебровским и его школой в 20-40-е гг. (Серебровский А.С., 1970). Теоретической предпосылкой для разработки А.С.Серебровским метода сигналей явилась хромосомная теория наследственности, созданная

Морганом и его учениками. Основные положения этой теории можно свести к следующему: гены расположены в хромосомах в линейной последовательности и вероятность того, что в результате рекомбинации произойдет изменение сочетания разных аллелей двух генов пропорциональна расстоянию между ними на хромосоме.

А.С. Серебровским было показано, что сигнал должен метить группы аллелей, генетическое расстояние между которыми менее 50 морган. Таким образом, минимальное число маркеров должно соответствовать диплоидному числу хромосом. Вопрос о максимальном их числе остается дискуссионным. Очевидно только одно: чем больше маркеров локализовано на хромосоме, тем эффективнее их использование.

Поясним сущность использования сигналей на следующем условном примере. Пусть на одной из хромосом локализован ген, аллели которого имеют четкое фенотипическое выражение, обозначим их как S и s . Предположим, что с этими аллелями тесно сцеплена группа генов, влияющих на какой-то количественный признак, и, что доминантные аллели вносят больший вклад, чем рецессивы. Для простоты рассмотрим два крайних варианта групп сцепления: $SABC..$ и $sabc...$. Очевидно, что потомки, унаследовавшие первую группу сцепления, будут превосходить по величине данного признака остальных.

В общем случае, в каждой хромосоме обычно бывает несколько генов, влияющих на определенный признак, различающихся по силе и направлению действия. Однако прямое определение силы действия гена является трудной задачей, поэтому А.С. Серебровский (1970) предложил метод расчета аллосилы и аллобаланса.

Обозначив силу действия доминантного и рецессивного аллелей как I_s и IS , он предложил в качестве оценки аллосилы i следующее уравнение [3.1]:

$$i = I_s - IS \quad [3.1].$$

Аллобаланс хромосомы в этом случае определяется как сумма аллосил локализованных на ней аллелей [3.2]:

$$D = \sum S_i \quad [3.2].$$

Аллелосила генов, сцепленных с маркером, по А.С.Серебровскому задается следующим выражением [3.3]:

$$j = i(1 - 2c) \quad [3.3], \text{ где:}$$

j - сигнальная аллосила гена,

c - расстояние гена от маркера в единицах перекреста (морганмах, т.е. в %).

Сигнальный аллобаланс в этом случае рассчитывается как сумма сигнальных аллосил [3.4]:

$$d = \sum S_j \quad [3.4].$$

Метод сигналей был успешно применен при анализе качественных признаков у дрозофилы.

Однако из-за малой изученности генома высших животных в те годы и даже в более позднее время (Рокицкий П.Ф., 1970) метод сигналей не нашел практического применения в селекции животных. Здесь в силу малого числа менделирующих генов, имеющих четкий фенотипический эффект, длительного репродуктивного периода, относительно небольшого числа известных тогда хромосомных маркеров и трудности их идентификации процесс картирования хромосом шел медленнее. Потребовалось длительное время на разработку новых идей и методов анализа, в том числе и методов выявления менделирующих признаков.

В простейшем случае в качестве маркера можно рассматривать признак, «замкнутый сам на себя». К таковым относятся генные мутации, приводящие к возникновению наследственной патологии. Собственно говоря, маркером может служить любой аллель любого гена, имеющего дискретное проявление (масть, комолость и т.п.), сцепленный с генами

интереса или непосредственно влияющий на интересующий человека признак.

Классическим примером использования генетических маркеров, сцепленных с интересующими селекционера признаками, стало раннее определение пола цыплят. В настоящее время для сортировки цыплят по полу служит ряд генов-маркеров, сцепленных Z-хромосомой и позволяющих создать аутосексные линии. Наиболее широко при этом применяют три пары аллелей: В/в – полосатость и сплошная окраска; S/s – серебристая и золотистая окраска оперения; К/к – быстрая и медленная оперяемость.

Особенностью аутосексных кроссов является то, что доминантные аллели должны находиться у самок, а самцы должны быть гомозиготны по рецессивному гену. Основываясь на применении гена В/-, известные селекционные фирмы создали несколько кроссов: «Б-390», Старкросс и А-браун. Суточные петушки этих кроссов имеют белое пятно на затылке. В дальнейшем у них формируется полосатое оперение. У курочек светлое пятно отсутствует, оперение взрослой птицы черное с золотистой гривой. Петушки четырехлинейного аутосексного кросса «Хайсекс коричневый» имеют светло-желтую окраску, курочки в основном коричневые.

Различия в скорости оперения, обусловленные действием сцепленного с полом гена К, были использованы в мясном кроссе «Бройлер-6». При скрещивании петухов линии 8 этого кросса, несущих аллель К, с курами линии 9 (носители аллеля к) получают курочек с медленной скоростью оперения. Скрещивая кур линии 89 (К/к) с петухами линии 67 (к-генотип), получают медленно оперяющихся петушков. Маховые перья в суточном возрасте развиты слабо, а кроющие длиннее или равны маховым.

Оба эти подхода позволяют во много раз повысить скорость сортировки по полу и снизить травмирование цыплят. Но

преимущественно используются кроссы, основанные на различиях в окраске. Это связано с тем, что доминантный аллель К оказывает отрицательное влияние на интенсивность яйцекладки, скорость полового созревания и жизнеспособность кур (Лоу и др. 1981). Также снижается репродуктивная функция у петухов.

В рассмотренных выше случаях имеет место сцепление маркирующего гена с генами, определяющими формирование интересующего человека признака. При этом сами гены интереса в данном случае идентифицировать необязательно. Однако маркерный эффект гена может возникать не только вследствие его сцепления с геном интереса. Второй механизм формирования этого феномена связан с плеiotропным (множественным) действием генов. Примером плеiotропии является влияние гена скорости оперения на репродуктивную функцию.

Интерес для селекционеров представляют и другие менделирующие признаки у кур. Показано, что для кур с розовидным гребнем, определяемым геноформулой R/R, характерны пониженные воспроизводительные качества, тогда как аллель r (листовидная форма гребня) выявляется у кур с повышенной репродукцией.

В птицеводстве генетиков и селекционеров в последние годы привлекла возможность использования и ряда других менделирующих признаков. Ограниченность кормовых ресурсов в мире обусловила интерес к сцепленному с полом гену карликовости (dW) и гена голошеести (Na). Введение dW гена в популяцию птицы позволило создать линии кур с достаточно высокой яйценоскостью при пониженном, за счет снижения массы тела, потреблении корма (Нинг Янг и др., 1996; Тайксер и др., 1996). Использование гена голошеести Na совместно с dW способствовало повышению оплаты корма.

В этих случаях мы также, скорее всего, имеем дело с множественным действием гена. Однако в ряде ситуаций плеiotропный

эффект может быть имитирован в результате тесного сцепления двух генов. В этом случае говорят об условной плейотропии. Ярким примером условной плейотропии служат результаты приведенных в начале этой главы исследований Моргана и Меллера.

В качестве своеобразного генетического маркера могут выступать и мутации, приводящие к возникновению различных наследственных заболеваний. Классическим примером такого заболевания является резус - несовместимость у человека. Аналогичные заболевания, получившие название гемолитической желтухи, известны у лошадей и свиней.

В 1970 г. Кентор показал, что причиной гемолитической желтухи у свиней является различие между партнерами по Sr-антигену. При спаривании Sr-отрицательной матки с Sr-положительным хряком в организме самки во время беременности в ответ на Sr-антигены плодов вырабатываются антитела. В случае повторного спаривания таких животных организм матери отвечает на Sr-антигены усиленным синтезом антител. Новорожденные поросята получают с молозивом Sr-антитела, и у Sr-положительных животных в результате иммунного конфликта развивается гемолитическая желтуха, приводящая к гибели приплода.

Определенная часть генов может кодировать продукт, участвующий в ряде ключевых процессов, и, следовательно, оказывать более сильное влияние на формирование признака. Это так называемые главные гены. В качестве главных условно принято считать те гены, у которых различие в величине признака между альтернативными гомозиготами равно стандартному отклонению или превышает его. Однако в силу малой изученности геномов домашних животных известно относительно небольшое число подобных генов.

В том случае если известны конкретные мутации того или иного гена, значительно влияющие на селекционируемый признак, аллели этого гена могут быть использованы в качестве маркеров для улучшения данного

признака. Однако подобная ситуация достаточно редка, поэтому поиск генов, пригодных для использования в селекции на улучшение интересующего признака, базируется изначально на выборе в качестве кандидатов генов, контролирующих биохимические процессы, связанные с формированием признака. Затем исследуется полиморфизм этих генов и продуктивные особенности животных, несущих в своем генотипе разные аллели этого гена. Следовательно, гены-кандидаты – это гены, кодирующие ключевые белки, принимающие участие в формировании признака. Но у этих генов изначально неизвестно наличие аллельных вариантов и их влияние на величину признака.

Принято различать позиционные и функциональные гены-кандидаты. О позиционных генах-кандидатах говорят в том случае, если данные гены расположены в области, прилегающей к точке локализации QTL. Функциональные же гены кандидаты – это гены, продукты которых играют ключевую роль в формировании данного признака.

Методом анализа *позиционных генов-кандидатов* был открыт «ген мышечной гипертрофии» миостатин, являющийся причиной синдрома двойного бедра у крупного рогатого скота бельгийской голубой породы и пьемонтского скота (Grobet et al., 1997).

Аналогичный подход был использован для открытия так называемого «гена вареного окорока» свиней породы гермпшир, связанный с мясной продуктивностью и качеством мяса (Milan et al., 2000). Большая часть свиней этой породы несет доминантную мутацию RN-, которая оказывает положительное влияние на наращивание мышц, но отрицательное влияние на пригодность мышечной ткани для приготовления вареного окорока. Такие отрицательные перерабатывающие свойства у животных, несущих аллель RN- (RN-/rn+ RN-/RN-), обусловлены 70% увеличением содержания гликогена в мышцах. Было установлено, что ответственный за проявление данного признака локус

был сцеплен с SSC15 (Milan et al., 1996). Последующее его картирование с использованием панели радиационных гибридов позволило установить два ВАС-клона, содержащих искомую область RN-. Секвенирование данной области выявило наличие последовательности, гомологичной гену человека, кодирующему γ -субъединицу протеинкиназы А (PRKAG3). Протеинкиназа А действует по двум направлениям: с одной стороны, с помощью фосфорилирования с участием АТФ в качестве кофермента она переводит в неактивную D-форму фермент гликоген-синтазу и вследствие этого останавливает синтез гликогена; с другой стороны, активирует - так же путем фосфорилирования - другую протеинкиназу, киназу фосфорилазы. Активная киназа фосфорилазы фосфорилирует неактивную b-форму гликоген-фосфорилазы, превращая ее в активную a-форму. Это приводит к высвобождению из гликогена глюкозо-1-фосфата, который после превращения в глюкозо-6-фосфат с участием фосфоглюкомутазы включается в гликолиз (Кольман, Рем, 2000). Таким образом, активированная протеинкиназа А участвует в путях обмена веществ, продуцирующих АТФ, и ингибирует пути обмена веществ, использующие АТФ.

Исследование экспрессии PRKAG3 выявило наличие специфической экспрессии в мышцах. Этот факт подтвердил закономерность, что животные, несущие аллель RN-, имеют повышенное содержание гликогена в мышцах, но не в печени. При исследовании гена PRKAG3 было выявлено 7 полиморфизмов единичных нуклеотидов (SNP), однако только одна замена R200Q была связана с искомой областью RN-. Было показано, что активность протеинкиназы А была в три раза выше у нормальных животных (гомозиготы gn+) по сравнению с животными, имеющими аллель RN-. Следовательно, мутация R200Q является причиной торможения активирования АМФ, а также распада гликогена. Однако вопрос о влиянии пониженной активности протеинкиназы А на

поддержание высокого энергетического статуса мышц требует дальнейшего выяснения.

Приведенный выше пример успешного так называемого позиционного клонирования генов-кандидатов у сельскохозяйственных животных стал возможен благодаря огромным достижениям в геномном анализе, как человека, так и сельскохозяйственных животных. Сравнительное позиционное клонирование генов-кандидатов требует не только точных данных о соответствующем регионе у наиболее хорошо исследованного вида – человека, но так же полной информации о расположении генов у животных. Таким образом, предпосылками успешного использования позиционного клонирования генов-кандидатов является наличие высокоразрешающих интегрированных физических и генетических генных карт отдельных видов животных, а так же сравнительных генных карт.

Примерами потенциальных *функциональных генов-кандидатов* являются гены лизоцима и лактоферрина. Продукты этих генов связаны с устойчивостью к заболеваниям, прежде всего, к маститам. Синтезируемый макрофагами лизоцим экспрессируется в сегментоядерных гранулоцитах, макрофагах и эпителиальных клетках желудка. Биохимически речь идет о ферменте 1,4-b-N-ацетилмураминидазе – ферменте, который обладает свойством распада муреина (составной части клеточной стенки). Он является прототипом неспецифического ответа против бактериальной инфекции в секретах млекопитающих. Большую роль он играет у жвачных, процессы преджелудочной ферментации у которых происходят с помощью бактерий, в распаде клеточных стенок которых в последующем он принимает участие. У большинства млекопитающих имеется один ген лизоцима, в то время как насекомые, мыши, кролики и жвачные несут несколько копий данного гена (Henke et al., 1996). У крупного рогатого скота гены лизоцима локализованы в геномном кластере ВТА5 (Brunner et al.,

1994). В молоке коров концентрация лизоцима в 1000 раз меньше, чем в молоке человека (Steinhoff et al., 1994).

Лактоферрин несет в себе несколько физиологических функций. Его антибактериальное действие базируется на его роли как гликопротеина, связывающего железо. Лактоферрин связывает ионы Fe^{3+} , отнимая их у бактерий. Он присутствует в молоке и других секретах млекопитающих. Лактоферрин обладает ДНК-связывающей способностью. Экспрессия этого белка наблюдается, главным образом, в жировых клетках молочной железы, накапливается в системе протоках, находящихся в непосредственной близости от соска (Molenaar et al., 1996). Неполовозрелые животные характеризуются пониженной экспрессией, в период полового созревания экспрессия многократно возрастает, после чего резко падает. Подобные колебания в экспрессии наблюдаются и в молочном секрете. Молозиво имеет повышенную концентрацию, в фазе производства молока содержание лактоферрина снижается, после чего в период сухостоя вновь существенно повышается. Кроме того, сильное повышение концентрации лактоферрина наблюдается в случае заболевания маститом (Molenaar et al., 1992). У обоих описанных выше генов требуется еще проведение исследований об их прямой взаимосвязи с признаками продуктивности. Примером функционального гена-кандидата у свиней является ген рианодинового рецептора. Установлена связь между мутацией в данном гене и чувствительностью к стрессам.

В последние годы в качестве генетических маркеров нашли применение различные сателлитные ДНК. К настоящему времени число их у различных видов достигает сотен. Интерес к использованию сателлитной ДНК для маркирования хромосом связан с тем, что ее выделение и идентификация более просты в сравнении с выделением и идентификацией ДНК структурных генов, при этом для отдельных классов сателлитов характерны как их хромосомная специфичность, так и специфичность

локализации на хромосоме. Последнее и, пожалуй, самое интересное свойство позволяющее надеяться на эффективность использования их в качестве маркеров – высокий полиморфизм этих систем. Если они образуют тесную группу сцепления с неизвестным главным геном, возникает эффект условной плейотропии (Серебровский А.С., 1970), лежащий в основе маркерной селекции. Таким образом, говоря о QTL, в общем случае, мы имеем дело не с генами в обычном представлении, а с группой тесно связанных аллелей разных генов, т.е. со своеобразной генетической системой. Положительной чертой анонимных генетических маркеров является и то, что в силу их высокого полиморфизма они могут быть использованы наряду с группами крови в системах, используемых для идентификации происхождения животных.

К отрицательным свойствам этих маркеров относится их анонимность (отсутствие фенотипического и генотипического проявления) и высокая видовая специфичность. Последнее делает практически невозможным использование их при изучении филогенетических связей.

В то же время при использовании анонимных маркеров существует необходимость выявления структурных генов, влияющих на изучаемый признак. Это собственно задача, обратная, рассмотренной нами выше, при описании выбора позиционных маркеров.

Имеется следующая стратегия перехода от сцепленных маркеров к самому гену (Collins F.S., 1992). В случае, когда нет информации о положении локусов, ответственных за определенный признак (такой как продуктивность или наследственные болезни и т.д.) он может быть определен с помощью позиционного клонирования. В этом случае тестируется ряд сцепленных маркеров для выявления того, который наиболее тесно связан с признаком, например, болезнью, и, следовательно, физически близко расположен с искомым локусом.

Процесс значительно ускоряется, когда в области «мишени» имеют место очевидные цитогенетические перегруппировки. С помощью этого метода у людей было локализовано немало генов наследственных болезней, например, ретинобластома, ломкая X-хромосома, опухоль Wilms и т.д. (Editorial G., 1994).

Другой метод основан на том, что ген, расположенный в вероятном сайте мутации, сканируется («просеивается») для установления отличий в нуклеотидной последовательности нормального и мутантного аллелей.

Таким образом, в качестве генетических маркеров могут служить как различные структурные гены, кодирующие определенные белки, так и фрагменты высокоповторяющейся ДНК. В генетической литературе их принято называть маркерами первого и второго типа. Соответственно, в зависимости от того какой из типов маркеров используется в работе, в последнее время принято говорить о маркер-зависимой или ген-зависимой селекции. Хотя оба эти варианта по сути своей являются частными случаями того, что выше было названо селекцией по маркерам, подобное их разделение вполне обосновано, т.к. механизмы, лежащие в основе связи между продуктивными признаками и генетическими маркерами разной природы, могут быть различны.

Вопросы для самопроверки по теме 3.

1. Роль хромосомной теории в маркерной селекции.
2. Метод сигналей А.С. Серебровского.
3. Понятие маркера.
4. Маркирование на основе сцепление генов.
5. Условная плейотропия.
6. Аллелосила и алелобаланс.
7. Маркирование на основе плейотропного действия генов.

8. Использование главных генов.
9. Функциональные и позиционные гены-кандидаты.
10. Маркер-зависимая и ген-зависимая селекция.

Глава 4. Типы генетических маркеров

Размер генома. Кодирующая и анонимная ДНК. Мутации и генетический полиморфизм. Маркеры I и II типа. Классификация маркеров II типа. Тандемные повторы. Микросателлиты. Хромосомные маркеры. Митохондриальные гены.

В результате цитохимического измерения количества ДНК у разных видов Бовин (1948) и Свифт (1950) показали, что содержание ее в ядрах клеток постоянно и типично для каждого вида. Однако дальнейшее изучение содержания ДНК в клетках разных видов привело исследователей к неожиданному результату. В пределах отдельных родов наблюдались резкие видовые различия по количеству ДНК на ядро. Более того, у ряда более примитивных видов уровень ДНК в ядре во много раз превосходил этот показатель у млекопитающих.

Но вряд ли геном представителей низших таксонов в десятки раз сложнее, чем у человека, или в пределах рода у одного вида в несколько раз сложнее, чем у других. Из сложившейся ситуации вытекал единственно возможный вывод: в ядрах эукариот содержится значительно больше ДНК, чем требуется для кодировки белков.

Если разделить размер генома, выраженный в нуклеотидах, на среднее их число, содержащееся в гене (вернее, в его кодирующей части), можно примерно определить число генов. Для млекопитающих, при среднем размере белка в 333 аминокислоты, такой расчет дает цифру 3 миллиона генов. В то же время расчеты, выполненные на основании анализа скорости мутирования и по числу различных мРНК, давали значения на 1-2 порядка ниже. По данным Мюллера (1967) и Кимура

(1971) анализ скорости мутирования у дрозофилы соответствует размеру генома в 10000, а у человека – 30000 генов.

Бишоп с сотрудниками (1974), исследуя спектр мРНК в клетках человека и дрозофилы, показал, что в клетках человека (для анализа была использована клеточная линия HeLa) синтезируется около 35000 различных мРНК, а у дрозофилы – около 4000. Разумеется, это минимальные оценки, т.к. клетка, скорее всего, не синтезирует всех возможных мРНК, информация о которых содержится в геноме. Но, тем не менее, эти данные согласуются с результатами, полученными на основе анализа «генетического груза».

Несколько отличные оценки удельного веса кодирующей ДНК были получены при анализе суммарной РНК Ханом (1971) и Брауном (1972) с сотрудниками, которые исследовали РНК в разных тканях мышей. Оказалось, что в большинстве тканей транскрибируется 2-3 % ДНК, но в тканях мозга этот показатель достигает 10 %, что соответствует примерно 300000 генов. Но измерения тотальной РНК дают явно завышенную оценку. Как мы теперь знаем, в процессе сплайсинга теряется около 80 % РНК, связанной с интронами. Кроме того с обоих концов гена присутствуют достигающие иногда больших размеров некодирующие последовательности, которые копируются в мРНК (Даншен, Слонимски; 1987). В связи с этим значительных противоречий между величинами 30-35 тысяч генов у млекопитающих и транскрипцией 10 % генома в мозге у мышей нет. В то же время известно, что определенная часть интронов хранит генетическую информацию о матуразах и м-белках.

Очевидно, что с большей степенью уверенности можно говорить только о нижней границе числа генов. Но, тем не менее, у млекопитающих, несомненно, лишь незначительная доля ДНК приходится на собственно гены. Хотя все эти расчеты приблизительны, ясно, что значительная часть ДНК в геноме «молчит». Где же локализована эта ДНК, получившая в 70-е

годы название «эгоистичной», и чем она отличается от несущей информацию?

Определенная часть «молчащей» ДНК входит в состав интронов. Если бы интронная ДНК была полностью некодирующей, можно было бы приблизительно рассчитать ее долю от общей «эгоистичной» ДНК. Однако это не так. Кроме того, в хромосомах эукариот подобную ДНК можно найти и в участках между генами (интеркалярный хроматин). Так, гены глобинового кластера расположены на участке длиной в 80 kb, но из них только 3000 пар нуклеотидов несут генетическую информацию. Отличается ли чем-то «анонимная» ДНК от ДНК генов?

Бриттен и Кон (1968), изучая кинетику реассоциации (скорость восстановления двойной спирали после ее денатурации – разрушения водородных связей), получили неожиданный результат. В большинстве случаев ДНК высших организмов восстанавливала свою структуру слишком быстро. Из этого был сделан вполне справедливый вывод о присутствии в ДНК нуклеотидных последовательностей, повторяющихся тысячи и сотни тысяч раз. Некоторые из них были выделены методами генной инженерии и подробно изучены. Оказалось, что они являются некодирующими повторами. Таких повторов существует несколько разновидностей.

Еще на ранних этапах становления молекулярной генетики было отмечено, что чем выше уровень избыточной ДНК, тем консервативнее вид. Выходит избыток ДНК в геноме затормаживает эволюционный процесс? Действительно, для представителей таких древних и высоко консервативных таксонов как кишечнополостные и амфибии характерно высокое содержание повторов, большая часть их генома не несет никакой информации. Примеры подобного рода можно отыскать и в царстве растений и в царстве животных.

Каким же образом «эгоистичная» ДНК охраняет генетическую информацию вида от изменений? С позиции теории мишени защитная функция повторов может быть объяснена чисто статистическими механизмами: вероятность мутационных изменений в зоне повторяющихся последовательностей пропорциональна их доле от тотальной ДНК.

В 70-е годы в результате серий работ по искусственному мутагенезу стало ясно, что перестройки хромосом у эукариот возникают преимущественно в районах, богатых ГЦ-последовательностями. Но содержащая ГЦ-последовательности ДНК составляет около 80 % от всей геномной ДНК и, может быть, это, действительно, просто случайное совпадение? Однако существуют и нестатистические механизмы, обеспечивающие перераспределение aberrаций между классами нуклеотидных последовательностей в геноме. В чем заключается их природа в настоящее время, к сожалению, неясно. Возможно, это связано с различной активностью репаративных систем в зонах структурных генов и некодирующих повторов.

Феномен депонирования наследуемых изменений в «анонимной» ДНК породил у ряда исследователей представление о том, что нетранскрибируемые повторы являются своеобразным резервом генетической изменчивости и источником для эволюции генома (Курильски и Гашлен, 1987). Возможно, это и так, но прямых доказательств тому пока не имеется.

Разумеется, теоретически допустим переход части «молчащих» генов, активность которых заблокирована мутацией (примером чему являются псевдогены глобинового кластера и рРНК), в активное состояние в результате обратных мутаций. Но этот процесс не имеет ничего общего с возникновением новых генов из истинных «молчащих» последовательностей. Вероятность последнего ничтожно мала. Кроме того, подобное допущение находится в некотором противоречии с фактом

консерватизма видов, характеризующихся повышенным содержанием избыточной ДНК, а потому отнесем пока данные взгляды к области научных предположений. Вместе с тем транскрибируемые нуклеотидные повторы, несомненно, играют роль в преобразованиях генома.

С подразделением ДНК на кодирующую и анонимную, а, главное, в связи с наличием генетических вариаций (полиморфизма) в обеих группах ДНК, связано существование двух типов генетических маркеров. Рассмотрим их основные характеристики.

Маркеры I типа:

1. Последовательности ДНК, кодирующие первичную структуру биополимеров (пептидов и нуклеиновых кислот).
2. Относительно низкий генетический полиморфизм (меньшее количество аллельных вариантов) в сравнении с маркерами II типа.
3. Относительно высокий эволюционный консерватизм. Несмотря на существование видовых различий в нуклеотидных последовательностях одноименных генов, кодируемый ими продукт у разных видов выполняет одну и ту же функцию. Это позволяет использовать маркеры I типа в различных эволюционных исследованиях генома.

Таким образом, маркеры I – это, в общем случае, гены, контролирующие проявление того или иного признака, полиморфизм которого выявляется либо по фенотипическому проявлению аллелей, либо путем молекулярно-генетических или иных специальных исследований. В качестве примера маркера I можно рассматривать различные мутации окраса у животных (рис.22), или различные генетически детерминированные аномалии и уродства (рис. 23).



Рис. 22. Сиа́мская ко́шка (http://foto.mail.ru/mail/zhemchug_nevy/1/i-116.jpg). Сиа́мский окрас у кошки обусловлен присутствием у животного в гомозиготном состоянии мутантного аллеля гена тирозиназы. Поскольку сиа́мский окрас является породным признаком, данная мутация служит маркером породы,



Рис. 23. Новорожденный теленок с синдромом SVM (Комплексный порок позвоночника). Генетически обусловленный летальный наследственный дефект голштинского и голштинизированного скота.

Маркеры II типа:

1. Микросателлиты (ди- три- тетрануклеотидные повторы в последовательности ДНК).
2. Генетическая функция неизвестна.
3. Высокая генетическая изменчивость (до 10 аллельных вариантов).
4. Видоспецифичны: существование одинаковых маркеров возможно только у близкородственных видов.

В качестве маркеров II типа используются повторяющиеся нуклеотидные последовательности, имеющие высокую степень полиморфизма. Эти последовательности могут быть подразделены на два класса: дисперсные последовательности и тандемные повторы.

Дисперсные последовательности в зависимости от длины делят на два подкласса: длинные интерсперсионные элементы (более 1000 п.о.) и короткие интерсперсионные элементы (менее 500 п.о). Функции этих элементов пока еще до конца не выяснены. Следует отметить, что данные элементы не отличаются консервативностью между видами животных. Так, между SINEs КРС и свиней не выявлено гомологии (Lenstra et al., 1993).

Тандемные повторы – это повторение коротких нуклеотидных последовательностей (мотивов), ориентированных в положении «голова-хвост». Поскольку в них в одном локусе повторяется один и тот же мотив, эти последовательности получили название сателлитов. Схематическое изображение сателлитов представлено на рисунке 24 (по Зиновьевой и др., 2002). Сателлиты представляют собой многократное повторение мотива, фланкированное уникальными (однокопийными) последовательностями.

Разные локусы тандемных повторов отличаются друг от друга нуклеотидным составом фланкирующих последовательностей, величиной, нуклеотидным составом мотивов и их числом.

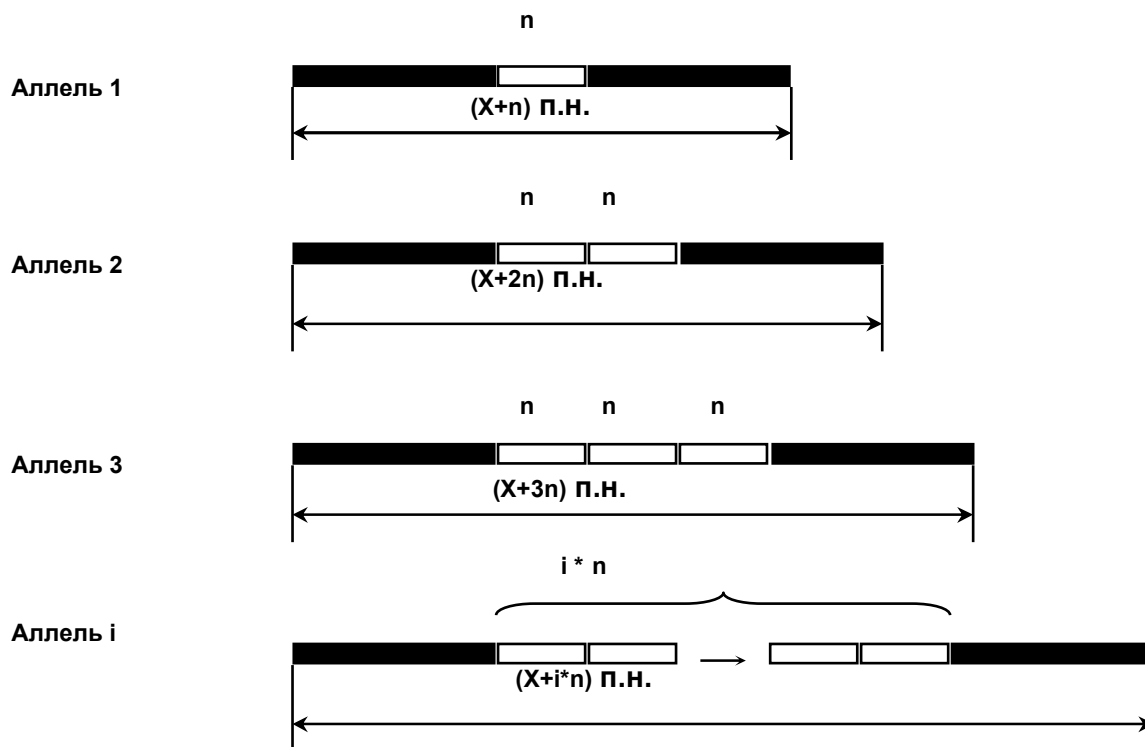


Рис. 24. Структура микросателлитов. Повторяющиеся участки длиной n п.о. (белые прямоугольники) локализованы между двумя однокопийными уникальными последовательностями (черные прямоугольники). Разное число копий повторяющихся последовательностей соответствует разным аллелям.

Изначально термин сателлиты являлся техническим обозначением физико-химических свойств означенных фракций, а не отражением их биологических свойств. Им обозначали ту часть генома, которая отделялась при градиентном ультрацентрифугировании и, следовательно, по плотности и по содержанию АТ/ГС должна была отличаться от основной массы ДНК. В дальнейшем выяснилось, что гены рибосомной РНК (рДНК), митохондриальные и хлоропластные ДНК могут образовывать отдельные сателлитоподобные пики в градиенте; с другой

стороны, «истинные» сателлиты с GC-составом, идентичным с основной ДНК, невозможно отделить от основной массы ДНК, и они обнаруживаются как «скрытые» сателлиты (Ganal, Hemleben, 1988).

Аллели одного сателлитного локуса отличаются друг от друга числом мотивов. Это еще одно из существенных различий между маркерами I и II типов. В первом случае в основе генетического полиморфизма в подавляющем большинстве лежит замена нуклеотидов (их делеции и вставки очень редки), а во втором – изменение числа нуклеотидов, связанное с вариацией числа мотивов.

Следует четко разграничить термины сателлитные и мини- и микросателлитные ДНК. Основные различия между ними заключаются в следующем: (1) мини- и микросателлиты в отличие от сателлитных ДНК обнаруживаются в эухроматине; (2) Число копий повторов в мини- и микросателлитах намного меньше по сравнению с сателлитными ДНК. Длина повторяющейся единицы минисателлитных ДНК составляет 10–100 п.н., а микросателлитных – 6 и менее п.н. (Tautz, Schloetterer, 1994). Длина повторов сателлитных ДНК не имеет каких-либо ограничений. Она варьирует от 2 п.н. до нескольких сотен.

По размеру мотивов различают моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и гексануклеотидные микросателлиты. Так, например, у человека простые последовательности нуклеотидов состоят из повторений A, CA, AAAN, AAN, AG, AC, TC и т.д. в порядке убывания частоты встречаемости (Рузыбакиев, Юлдашева, 2000). Наиболее многочисленны в геноме млекопитающих динуклеотидные микросателлитные повторы $(TG)_n(CA)_n$ - от 5 до 10×10^4 на геном, а поскольку гаплоидный геном в среднем содержит 3×10^9 п.о., то на каждые 50-100 т.п.о. приходится по микросателлитному блоку поли (TG). Они составляют 57% (в среднем, в зависимости от вида) от общего числа микросателлитных повторов. За ними в нисходящем порядке представлены повторы $(CT)/(GA)_n$ (30%),

(TA)_n (12%), (CG)_n (0,7%) (Симоненко В.Н., Корохов Н.П., Шевченко В.Г., 1999). Для каждого типа повторов характерна своя определенная локализация. Так, (TG)_n повторы разбросаны в основном по всему геному. Результаты гибридизации *in situ* показали, что у человека и свиньи понижена плотность этих повторов в центромерной и теломерной областях, районе ядрышкового организатора и промежуточного гетерохроматина (Stallings R. L, Ford R, Nelson O 1991).

Число повторяющихся мотивов микросателлитов варьирует от 10 до 30. Средние размеры микросателлитных последовательностей варьируют в зависимости от вида. У крупного рогатого скота размер динуклеотидных повторов сравним с таковым у человека и соответствует 14,89 единицам повтора (Wintero A. K., Fredholm M., Tomsen P D., 1992).

Согласно структуре, микросателлиты разделяются на три типа:

1. Совершенные повторы мотивов (CA)_n или (GT)_n, которые не прерываются другими нуклеотидами и не расположены рядом с повторами других последовательностей (непрерывная последовательность одного типа);

2. Несовершенные (неполные) повторяющиеся последовательности с двумя или большим числом блоков (CA)_n, разделенных не более чем тремя следующими друг за другом неповторяющимися основаниями (состоят из одной или нескольких прерывающихся последовательностей одного и того же типа);

3. Сложные повторяющиеся последовательности, у которых блоки (CA)_n отделены от других блоков более чем тремя неповторяющимися основаниями, представлены в виде одинаковых нуклеотидов в количестве 5-10 и более (состоят из совершенных или несовершенных повторов прерывающихся другими простыми последовательностями) (Марзанов Н.С., Озеров М.Ю. и др., 2004).

На долю совершенных повторов приходится до 70% микросателлитных последовательностей (табл. 1).

Таблица 1.

Распределение разных типов микросателлитных последовательностей в геномах млекопитающих (%)

Тип ДНК-МС	КРС	Овца	Свинья	Человек	Собака
Совершенные	56	84	71	64	80
Несовершенные	24	10	19	25	8
Сложные	20	4	10	12	12

Микросателлиты расположены, главным образом, в некодирующих областях, хотя сегодня доказано так же их нахождение (в малой степени) в кодирующих и промоторных областях (Hancock, 1999).

Микросателлиты равномерно распределены по всему геному и находятся, главным образом, в аутосомах, хотя предполагается их наличие и в X-хромосоме (Hancock, 1999). ДНК-МС характеризуются высокой степенью полиморфизма и имеют кодоминантный тип наследования (Litt, Luty, 1989). Не принимая во внимание тесное сцепление микросателлитов с определенными локусами (Barton, 2000, Maynard Smith, Haigh, 1974, Slatkin, 1995b), они являются нейтральными в селекционном аспекте (Tachida, Izuka, 1992). Вместе с тем, следует отметить, что в литературных источниках имеется ряд публикаций, в которых показано сцепление, как предполагают, нейтральных микросателлитов с генами-кандидатами локусов количественных признаков (Buitkamp et al., 1996, Kien et al., 1999, Nowak, Charon, 2001, Weimann et al., 2001).

Минисателлиты нашли свое применение в геномной дактилоскопии для оценки происхождения. Сложность использования минисателлитов связана с тем, что разделение аллелей идет только по молекулярной массе. А это означает, что фрагменты одинаковой массы, но различающиеся

фланкирующими последовательностями, т.е. относящиеся к разным локусам, не могут быть точно идентифицированы.

Более широкое применение для выявления генетического полиморфизма нашли микросателлиты. Они активно используются для создания генетических карт (Maddox et al., 2001). Вследствие их высокой специфичности, микросателлиты являются первоначальным маркером для идентификации индивидуумов (Arranz et al., 2001b), по ДНК контролю в судебной экспертизе, в биологическом/эволюционном контексте они полезны как маркеры для анализа происхождения (Glowatzki-Millis et al., 1995, Heyen et al., 1997, Schloetterer, 2000). Вероятность несовпадения результата один из миллиона. Они играют роль в биомедицинской диагностике как маркеры по установлению причины болезни. Т.е., определенные аллели микросателлитов связаны с определенными мутациями в кодирующих регионах ДНК, которые могут быть причиной некоторых болезней. Так, у человека была доказана связь ненормально длинных тринуклеотидных повторов с генами, ответственными за заболевания, такие как миотоническая дистрофия, хорея Хунтингтона, синдром ломкости X-хромосомы (Rubinsztein et al., 1995). У мышей были выявлены локусы, связанные с регуляцией кровяного давления у мышей с наследственной гипертонией (Hilbert et al., 1991).

В последние годы микросателлиты все больше и больше используются для разьяснения вопросов популяционной и эволюционной генетики, став наиболее распространенным типом маркеров, используемых для этих целей (Baumung et al., 2004, Schloetterer, 2004). Микросателлиты используются в решении вопросов определения степени родства индивидуумов или групп. Для исчезающих или содержащихся в неволе видов микросателлиты могут служить как инструменты для оценки уровней инбридинга (F_{IS}). От этого мы можем двигаться к генетической структуре субпопуляция и популяций (используя инструменты, такие как

F-статистика и генетические расстояния). Они могут быть полезны для оценки демографической истории (т.е., чтобы рассмотреть вероятность исчезновения популяции), для оценки эффективного размера популяции (N_e) и для оценки величины и направления генного потока между популяциями. Микросателлиты обеспечивают данными, удобными для филогеографических исследований, которые пытаются объяснить concordant биогеографические и генетические истории флоры и фауны больших регионов.

Следует отметить, что немаловажную роль в широком спектре прикладного использования микросателлитов, наряду с их полиморфными свойствами, играет возможность одновременного исследования нескольких локусов посредством мультиплексного ПЦР и автоматизации процесса генотипирования, что позволяет достигнуть очень высокой производительности метода.

К генетическим маркерам можно отнести и некоторые изменения хромосомного набора животных. Различные структурные изменения хромосом (транслокации разных типов) широко использовались и продолжают использоваться генетикам в качестве инструмента при определении локализации генов. В прикладной цитогенетике анализ кариотипа является основным методом раннего выявления вариантов генетической патологии, связанных с его аномалиями. Таким образом, хромосомные перестройки также являются своеобразными генетическими маркерами. Правда, как правило, это маркеры «замкнутые на себя», т.е. простейшего типа. Информация, получаемая с их помощью минимальна, хотя и может иметь большое практическое значение.

Начиная с 70-х годов прошлого столетия, в прикладной цитогенетике делалась ставка на выявление полиморфизма и гомеологии в рисунке индивидуальных хромосом. Было показано, что использование избирательных окрасок, выявляющих зоны ядрышковых организаторов

(ЯОР) и структурного гетерохроматина (NOR- и С-окраски) позволяет выявить полиморфизм по этим хромосомным структурам (рис. 25, 26).



Рис. 25, Ядрышковые организаторы у домашней свиньи (показаны стрелками).



Рис. 26. С-окраска центромер на хромосомах крупного рогатого скота.

В частности, у свиней отмечен породный полиморфизм по числу активных ЯОР. Описаны также случаи структурного полиморфизма ЯОР и С-блоков (Свитонский и Питрзак, 1992; Кленовицкий П.М. и Завада А.Н. с соавт., 1994; 1999).

Было показано, что С и NOR полиморфные варианты наследуются как простой менделирующий признак. Кристенсен с соавт. (1991) обнаружили связь С-полимофизма с репродуктивными качествами свиней. Однако частота встречаемости подобных С и NOR вариантов не велика, и возможность их практического использования ограничена.

Вполне закономерно встает вопрос: а существует ли внутривидовой полиморфизм рисунка индивидуальных хромосом? Несмотря на высокую разрешающую способность современных методов дифференциальной окраски, вероятность положительного ответа на него, в свете наших представлений о молекулярной организации хромосом и природе различных окрасок, ничтожно мала.

Все же анализ тонкой структуры хромосом нашел свое приложение в эволюционной генетике. Одним из подходов при анализе гомеологии хромосом и их отдельных участков у различных видов млекопитающих является сравнение их дифференциальной исчерченности. К настоящему времени выполнен ряд работ, посвященных анализу цитогенетического сходства и эволюции кариотипов (Рубцов Н.Б. и др., 1988; Аниськин В.М. и др., 1996).

Результаты этих исследований позволяет выделить два ключевых момента: анализ сходства хромосом на основании изучения их тонкой морфологии и анализ сходства и различия в организации наследственной информации, содержащейся в хромосомах животных разных видов.

Существование таких участков хромосом показано у различных видов млекопитающих (человек, кролик, норка, свинья, крупный рогатый скот, овца). Как отмечает Графодатский А.С. (1987), гомеологические

участки хромосом идентифицируются по характеру их рисунка тем чаще и надежнее, чем меньше сравниваемые кариотипы перестроены относительно друг друга. За редким исключением гомеология хорошо прослеживается при сравнении видов внутри рода или близких родов. Иногда удается с достаточной степенью надежности идентифицировать их в пределах семейства.

Однако необходимо учитывать, что сходство рисунка участков хромосом может и не являться результатом их общего происхождения, а возникать как следствие сложных перестроек, создающих рисунок, имитирующий хромосомный район другого вида. Следовательно, возникает необходимость использования более объективных критериев, отражающих генетическое тождество (гомеологию) хромосом или их участков у разных видов. Из самой постановки этого вопроса вытекает однозначный ответ, что в качестве такого критерия может служить единственный показатель – генетическое «содержимое» хромосом. Действительно, две хромосомы или более, а также их фрагменты, могут быть тождественны только в одном случае, если они содержат одни и те же гены или нуклеотидные последовательности в одном и том же порядке, независимо от их аллелизма.

Приведенные выше примеры свидетельствуют о том, что различные хромосомные варианты, а также хромосомные структуры могут служить генетическими маркерами. Но область их применения строго ограничена – это сфера профилактики генетической патологии; анализ филогенетических связей и построение генных карт.

Еще один тип цитогенетических маркеров – это микрохромосомные перестройки. К микрохромосомным перестройкам относится потеря или приобретение небольших участков ДНК. Возможен и обмен такими участками (рекомбинация). Принято различать классическую рекомбинацию между гомологичными последовательностями ДНК и

«незаконную». Последняя происходит значительно реже и без учета, какой-либо гомологии.

В 80-е годы в нескольких лабораториях мира выяснили, что существование нуклеотидных повторов может быть связано с особыми генетическими изменениями. Одно из них связано с неравным кроссинговером и проявляется в расширении и сжатии зон генома, вовлеченных в эту перестройку. У человека описан ряд заболеваний, связанных с наличием таких перестроек, затрагивающих кластер глобиновых генов.

Второй тип перестроек ДНК связан с внутренними изменениями в повторах. Это генная конверсия, механизм которой был сформулирован еще в 1930 г. Винклером и объяснен на молекулярном уровне Балтимором в 1981 г. Сущность этого процесса заключается в том, что в ряде случаев (довольно редких) репликация ДНК может идти с переменной матрицы, т.е. в качестве «материнских» могут выступать попеременно нити ДНК разных хроматид. В результате этого в нуклеотидную последовательность, при неправильной конъюгации, может быть скопирован участок из другого гена. В этом случае «ген-донор» сохраняет свою исходную последовательность, а «ген-реципиент» включает в себя чужую последовательность, соответствующую участку, реплицированному с матрицы «гена-донора». В результате этого данная последовательность оказывается дублированной.

Особенность данной ситуации состоит в том, что механизмы генетической изменчивости, связанные с неравным кроссинговером и конверсией, приводят к изменению генного баланса. Вместо того, чтобы приводить к простой перегруппировке генов, они сильно изменяют всю картину их распределения. Иначе говоря, они приводят к разного рода отклонениям от законов Менделя. И лишь в силу невысокой частоты их встречаемости до последнего времени им не придавали особого значения.

В отличие от хромосомных маркеров маркеры I и II типа могут быть использованы не только при диагностике генетической патологии и анализе филогенетических связей. Вполне реально использование их для маркирования стабильных аллельных групп или главных генов, влияющих на продуктивные качества животных.

Многочисленные исследования, начиная с работ Флеминга и Бовери, казалось, не оставляли места для иных носителей наследственных признаков кроме хромосом. Однако ряд фактов упорно не укладывался в стройную схему, и представления о генах вне хромосом в конце концов получили физическое обоснование, когда стало ясно, что некоторые из клеточных органелл содержат собственную ДНК.

У эукариотических организмов, принадлежащих к царству животных, дыхание клеток обеспечивают митохондрии. Происходящие в них процессы приводят к запасанию энергии в форме аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) – этой универсальной энергетической валюты клетки.

Эти самовоспроизводящиеся полуавтономные органеллы клетки имеют собственный аппарат белкового синтеза. А самое главное они имеют собственный наследственный аппарат, представленный кольцевой молекулой ДНК, отличной по своему составу от ядерной. Митохондриальный геном содержит единственный некодирующий участок, так называемая Д-петля или контрольный регион. В контрольном участке нити митохондриальной ДНК (мтДНК) находятся практически все основные структуры, ответственные за инициацию и регуляцию процессов репликации и транскрипции.

Одной из отличительных черт митохондриального генома является его более высокая мутабельность. Частота мутаций в генах митохондрий в среднем в 5-10 раз выше, чем в уникальных последовательностях ядерного генома. Фиксация мутаций происходит исключительно быстро.

Каждая клетка содержит большую популяцию (до нескольких сотен) митохондрий. Обычно у нормальных индивидуумов все молекулы мтДНК идентичны (гомоплазмия), присутствие нескольких вариантов мтДНК (гетероплазмия) у одного организма крайне редко. Причина этого явления пока неясна. Очевидно одно – полиморфизм организмов по мт-генам возникает в результате отбора определенных клонов митохондрий.

Строение этих органелл и особенности организации их генетического аппарата позволили предположить, что митохондрии являются своеобразными высокоспециализированными симбионтами клетки, ведущими свое происхождение от древних прокариот. Геном митохондрий содержит небольшое число генов, обеспечивающих их автономную репродукцию: фактор полярности рекомбинации, гены большой и малой субъединиц рРНК, тРНК, а также субъединиц мембранных и рибосомных белков. Функциональную активность рибосом обеспечивают гены субъединиц АТФ-азы, цитохромов b и c и оксидазы. Кроме того, к митохондриальной группе сцепления относится ряд генов, контролирующих устойчивость к антибиотикам и другим клеточным ядам.

Связь между генотипом митохондрий и метаболическим сдвигом в организме свидетельствует о том, что часть мутаций митохондриальных генов подвержена отбору на организменном уровне. Материнский цитоплазматический эффект, связанный с наследованием мтДНК, по данным Брауна (1989), оказывает влияние на молочную продуктивность, содержание жира и белка в молоке.

Уникальные характеристики митохондриального генома (наследование по материнской линии, отсутствие рекомбинации ДНК и высокая степень изменчивости нуклеотидных последовательностей, по сравнению с ядерными генами) позволяют использовать его для оценки генетического разнообразия в популяциях. Важнейшая его особенность –

сохранение митохондриальным клоном определенной комбинации сцепленных мутаций и генетическая независимость клонов. Это свойство митохондриального генома позволяет использовать его полиморфизм для реконструкции родственных связей и филогенетических отношений.

Вопросы для самопроверки по теме 4.

1. Факты, свидетельствующие о существовании некодирующей ДНК.
2. Методы определения числа генов.
3. Что такое маркеры I типа?
4. Основные свойства маркеров I типа.
5. Что такое маркеры II типа?
6. Основные свойства маркеров II типа.
7. Механизмы возникновения полиморфных вариантов у маркеров I и II типа.
8. Классификация маркеров II типа.
9. Строение сателлитной последовательности.
10. Классификация ДНК-сателлитов.
11. Хромосомные маркеры.
12. Митохондриальная ДНК, ее использование в генетических исследованиях.

Глава 5. Классические маркеры I типа

Качественные и количественные признаки. Качественные признаки как маркеры. Генетика окрасов домашних животных. Классические представления о генетике масти. Мутации окраса и ДНК-полиморфизм. Масть как квалификационный признак племенного животного. Основы иммуногенетики животных.

Говоря о маркерной селекции, обычно основной упор делают на связь генетических маркеров с количественными признаками. Это совершенно справедливо, потому что основная цель селекции – это увеличение продуктивности животных, т.е. в конечном итоге продуктов питания. Но большинство хозяйственно-полезных признаков имеют полигенную природу. Конечно, некоторые гены определяют признаки, являющиеся стандартом породы. К сожалению, число признаков с дискретным проявлением у сельскохозяйственных животных не велико и использование и в качестве маркеров, связанных с продуктивностью, малоэффективно. К таким маркерам, пожалуй, можно отнести лишь различные фенотипические аномалии, связанные с наследственными заболеваниями.

Однако было бы неправильно ограничить маркерную селекцию только признаками, связанными с производством продуктов питания, так как это ее основная, но не единственная цель. В ряде областей животноводства практически с момента их становления основное внимание уделяется качественным признакам.

В первую очередь это касается характера пигментации шерстного покрова пушных зверей, овец, собак и животных-компаньонов. При этом уместно вспомнить, что именно исследование этого «маркера» Г. Менделем послужило фундаментом всех генетических построений, а в дальнейшем работы Дж. Бидла и его коллег по генетике пигментов позволили понять механизм фенотипического проявления наследственных

задатков, сформулировав его одним предложением: «Один ген – один фермент».

Характер окраса в значительной мере определяет стоимость животного и его продукции. Данный признак, как правило, является «замкнутым» маркером, но в ряде случаев он связан с жизнеспособностью потомства. В связи со всем выше сказанным, правомочно рассматривать отбор по этому признаку как старейший и наиболее отлаженный вариант маркерной селекции, не утративший своего значения и в настоящее время.

Наиболее детально наследование различных окрасов изучено у пушных зверей и, в первую очередь, у наиболее распространенного в пушном звероводстве вида – американской норки (*Mustela vison* Brisson).

Генотип стандартного окраса у норки обозначают как **AABVCCddeeffGGHHIIJJKKMMnnOOPRRRQQssTTwwzz**, таким образом, стандартная окраска определяется 14 доминантными и 7 рецессивными аллелями. Всего у американской норки известно 53 аллеля, входящих в 21 локус, контролирующей пигментацию волосяного покрова. 22 основных варианта окрасов обусловлены рецессивными аллелями и 14 – доминантными, 25 из 53 входят в состав серий множественных аллелей. Кроме того, существуют компаунд, дирецессивные, дидоминантные и доминантно-рецессивные варианты окраса.

К компаунд-формам относят норок, гетерозиготных по множественным аллелям. Это серебристо-стальные – pp^s норки, которые в чистоте не разводятся, по фенотипу сходные со стальной голубой, а так же различные сочетания, несущие аллели серии соклот: $t^p t^s$ – палосоклот, $t^w t^s$ – финсоклот, $t^n t^s$ – буффсоклот, $t^n t^p$ – буффпало, $t^w t^p$ – финпало, $t^w t^n$ – финбуфф. Все они относятся к светлому типу, окраска варьирует от бледно-бежевой до светло-коричневой. Компаунд-формой являются также и пестрые норки, имеющие генотип $h^1 h$.

Доминантно-рецессивные норки по окрасу относятся к четырем сериям: стюарт, бос, крестовки и тень. Известно 23 варианта доминантно-рецессивных окрасов.

Наиболее многочисленная группа – это дирецессивные норки. Их в зависимости от окраса делят на несколько групп. В группу коричневых, светло-коричневых и бежевых входит 39 вариантов, образованных различными сочетаниями аллелей a, b, g, j, k, m, p, r и t.

Группа голубых норок включает 5 вариантов: сапфир – aarr, это наиболее красивые звери типа голубых норок; алеутские имперплатиновые или имперский сапфир – aaii, алеутские стальные – aar^sr^s, алеутские серебристо-стальные – aarr^s и кобальт алеутские – qqaа.

Белые дирецессивные норки представлены 5 генотипами: альбинопастель – ccbb, буффальбино – tⁿtⁿcc, финальбино – t^wt^wcc, гуфусальбино – оосс, хедлунд-пастель – hhbb. Четыре последних типа распространены незначительно и для производства шкурок не используются.

В группу три- и тетрарецессивных норок входят животные генотипов: mтаarr – мойлсапфировые, m^cm^caarr – камеосапфировые; bбаarr – пастельсапфировые или зимние голубые. К голубым норкам относятся соклоксапфировые – t^st^saarr, соклотпастельсапфир – tstsббаarr, мойлкобальталеутские – mmqqaа, янтарьсапфировые – гаarr, янтарьалеутские стальные – гаар^sr^s, янтарьалеутские серебристо-стальные – гаarr^s.

К тригибридным норкам относятся жемчужные норки: ампалосапфировые – kкаarr, палосапфир – t^pt^paarr, финсапфир – t^wt^waarr, ампалоалеутская стальная – kкаар^sr^s и ампалоалеутская серебристо-стальная – kкаarr^s.

В результате различных скрещиваний норок, несущих гены серебристо-голубой окраски, пастель, мойл и соклот получены светлые

серо-бежевые звери: соклотпастель серебристая – $t^{st}bbpp$, палопастель серебристая – $t^{pt}bbpp$, мойлпастель серебристая – $mmbbpp$. К трирецессивным норкам, созданным на основе комбинации мутаций, дающих коричневую окраску, относятся соклотимперпастелевая пастель – $t^{st}jjbb$, янтарьимперпастелевая пастель – $rrjjbb$, монокамеозеленопастель – mm^cggbb .

Из четырехрецессивных норок известен один вариант: выведенная в США мойлянтарьсапфировая – $mmrraarr$.

Среди дидоминантных норок наиболее распространены различные варианты крестовок: соболиные крестовка – $SsFf$ и гомокрестовка – $SSFf$, королевско-серебристо соболиная – $S^R sFf$, кольмира соболиная – $DdFf$, крестовка кольмира – $SsDd$. Норки эбони соболиные ($EeFf$) неотличимы от серебристо-соболиных, имеющих светлую подпушь. Королевско-серебристая кальмира ($S^R sDd$) имеет рисунок, характерный для норок кольмира и более светлый, чем у королевской серебристой окрас.

В классической генетике считается, что различные варианты окраски у животных наследуются в строгом соответствии с ее законами. Однако довольно часто их фенотипическое проявление не позволяет однозначно идентифицировать генотип животного. С одной стороны это обусловлено тем, что аллели некоторых генов, влияя на разные звенья формирования окраски, приводят к появлению фенотипически сходных вариантов. В качестве примера укажем существование доминантной и эпистатической рыжей, а также доминантной и рецессивной черной масти у собак, связанных с мутациями в А и Е локусах. Но это не единственный механизм возникновения неоднозначности фенотипов.

Второй и наиболее распространенный механизм проявления этого феномена связан с множественным аллелизмом. У американской норки множественный аллелизм выявлен в четырех локусах, у лисицы и овцы как минимум в трех, у домашней собаки в пяти. Множественный аллелизм

генов, контролирующих окраску, известен также у нутрий, лошадей и кошек.

Рассмотрим фенотипическое проявление множественного аллелизма на примере некоторых полиморфных генов домашней собаки. Разумеется, приведенные ниже схемы скрещивания представляют собой идеализированную модель. В реальных условиях разведения собак некоторые из перечисленных вариантов спаривания могут никогда не встретиться. Но именно наличие модели, пусть и несколько абстрактной, помогает при анализе реальных ситуаций.

Таблица 2

Варианты расщепления по генотипу и фенотипу при спаривании собак дикого окраса (агути)

Генотипы родителей		Генотипы потомков	Фенотипы потомков
AA	AA	AA	агути
AA	Aa ^{sa}	AA, Aa ^{sa}	агути
AA	Aa ^t	AA, Aa ^t	агути
Aa ^{sa}	Aa ^{sa}	AA, Aa ^{sa} , Aa ^{sa} , a ^{sa} a ^{sa}	агути, чепрачный; 3:1
Aa ^t	Aa ^t	AA, Aa ^t , Aa ^t , a ^t a ^t	агути, подпалый; 3:1
Aa ^{sa}	Aa ^t	AA, Aa ^{sa} , Aa ^t , a ^{sa} a ^t	агути, чепрачный; 3:1

У собаки описано пять аллелей гена агути. Аллель дикого типа А – агути обуславливает волчье-серый (дикий) окрас. Он доминирует над аллелями a^{sa} и a^t, вызывающими появление чепрачного и подпалого окрасов. Таким образом, дикий окрас может наблюдаться у животных с генотипами AA, Aa^{sa} и Aa^t. При этом полагаем, что все животные гомозиготны по аллелю дикого типа локуса E (табл. 2.). В том случае, если оба или один из партнеров являются гомозиготами по аллелю А, все потомство будет фенотипически однородно. Но если один из партнеров

гетерозиготен по одному из мутантных аллелей, то 50% потомков будут гомозиготны, а 50% гетерозиготны по аллелю А.

При спаривании между собой гетерозигот по аллелю подпалой окраски в потомстве будет наблюдаться расщепление по генотипу 1:2:1, а по масти агути и подпалые 3:1. При спаривании гетерозигот по аллелю чепрачной окраски в потомстве будет наблюдаться расщепление по генотипу 1:2:1, а по масти агути и чепрачные 3:1. В том случае если один партнер гетерозиготен по a^{sa} аллелю, а второй a^t , расщепление по генотипу будет 1:1:1:1, но в силу доминирования аллеля a^{sa} над a^t расщепление по фенотипу будет тем же: агути и чепрачные 3:1. Еще сложнее может быть картина расщепления в потомстве гетерозигот по аллелю сплошной черной окраски A^s , доминирующего над всеми аллелями локуса агути

Базируясь на данных литературы и собственных исследованиях, Алиев А.Г. и Рачковский М.Л. (1989) предложили следующую схему генетического контроля меланогенеза у овец (рис. 27).

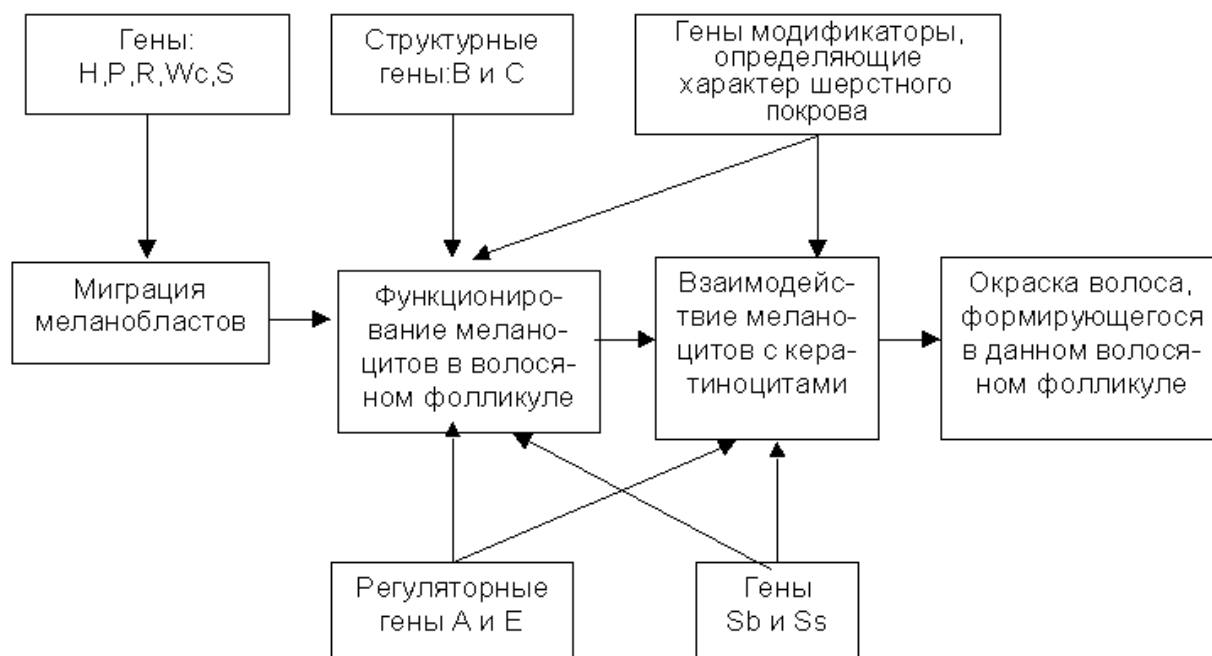


Рис. 27. Этапы генетического контроля меланогенеза у овец.

В основу этой схемы положено то, что масть животного определяется двумя основными моментами: особенностями окраса шерстного волокна и характером распределения различно окрашенных волос по телу. При этом необходимо учитывать, что восприятие цвета зависит от преломления света, проходящего через гранулы пигмента или отраженного от них, что определяется не только типом пигмента, но также размером, формой гранул и их распределением по волосу.

Эта схема, несомненно, представляет интерес и при анализе наследования окрасок и у других видов животных. Однако ее приложение к конкретным видам затрудняется отсутствием единой номенклатуры генов окраски.

Отсутствие единой номенклатуры генов окраса у различных видов животных в значительной мере затрудняет понимание механизмов действия различных генов в процессе меланогенеза. Вместе с тем необходимость подобного анализа очевидна, что отмечается, в частности, в работе Bowling A.T. (2000). Результаты сравнительного анализа генетики окрасов собак и кошек опубликован Москвиной Н.Н. и Сотской М.Н. (2000). На пушных зверях аналогичная работа была выполнена Колдаевой Е.М. (2005). Ниже приведены данные об особенностях проявления ряда генов окраса у разных видов животных.

Ген *A* (*Agouti*). У собак этот ген представлен пятью аллелями. Сплошной черный окрас доминирует над всеми аллелями. У кошек он представлен двумя аллелями, доминирующим является окрас дикого типа.

У шиншиллы в локусе *A* известна рецессивная мутация не агути, обозначаемая символом *a*. Мутантный аллель *a* в гомозиготе не изменяет основную окраску, но вызывает отсутствие зональности в окраске кроющих волос.

У овец известно 12 аллелей этого гена. Аллель A^{wh} определяет рост депигментированной шерсти у большинства пород, имеющих полностью

белую окраску. Появление в этих породах черных, подпалых и обратно подпалых животных связано с гомозиготным состоянием аллелей a , A^w , A^+ , A^b , A^{bi} .

У лошади данный ген представлен двумя аллелями A и a . Их фенотипический эффект зависит от сочетания с аллелями гена «Brown». Животные с генотипом $E-A$ имеют гнедую или коричневую масть. Черная масть проявляется у лошадей с генотипом $E-aa$, а рыжая у особей с генотипами eeA - и $eeaa$.

Локус В (Black). Ген белкового матрикса меланосом. У овец, собак и кошек контролирует проявление черного и коричневого окрасов. Рecessивная мутация этого гена связана с появлением более светлого окраса. У лошади не описан. У нутрий четко выражен эффект ослабления окраски у recessивных гомозигот, а у норок он варьирует в довольно широком диапазоне.

Символом **c (Color)** у всех видов животных обозначают ген тирозиназы. У собаки известно пять аллелей этого гена, у кошки шесть. У овцы известно только два аллеля этого гена.

У лошади два аллеля C – интенсивная окраска и C^{cr} – кремовая относятся к гену, контролирующему синтез тирозиназы. У большинства пушных зверей данный ген представлен двумя аллелями: дикого типа и альбино. Только у лисиц и шиншиллы известно еще по одной мутации этого гена.

Локус D (Dense pigmentation). У собак и кошек представлен двумя аллелями. Recessивная мутация d приводит к ослаблению основной окраски. У овец этот ген не описан.

Серовато-коричневый окрас (фенотип «Dun») наблюдается у лошадей с геноформулой D -. Аллель D наследуется по типу полного доминирования. Неясно являются ли Dense pigmentation и Dun одним геном. Соответствие генов окраса пушных зверей, обозначаемых символом

D, в том числе гена, ослабляющего окраску у лисиц, друг другу и гену Dense pigmentation не выяснено.

Ген E (Extension). У собак известно, как минимум, 4 аллеля этого гена, контролирующего распределение черного и коричневого пигментов по телу. Характер ряда окрасов собак зависит от взаимодействия между аллелями генов E и A.

В локусе E у овец имеется два аллеля. E^d определяет интенсивную черную окраску, эпистатическую над белой. Аллель E⁺ не имеет собственного фенотипического выражения и не препятствует проявлению аллелей гена A. Взаимодействие аллелей гена A с двумя аллелями гена E определяет формирование «доминантной» и «рецессивной» черной окрасок, различных вариантов серой (черная ость и белый пух), типа агути, подпалой и обратно подпалой.

У овец описано еще три аллеля локуса E: E^{bl}, E^{br}, E^y, действие которых аналогично действию аллеля E^d. В сочетании с аллелями локуса A они дают различные варианты бурой, палевой и рыжей окрасок. Аллель E^{bl} в ряде сочетаний дает черную или темно-коричневую и чалую окраски.

Считают, что у лошадей аллель E контролирует синтез эумеланина (черного пигмента), а аллель e – феомеланина (коричневого пигмента). Животные с генотипом E имеют черную, гнедую и коричневую масть, а рецессивные гомозиготы рыжую. Точно также как у собак и овец этот ген у лошади эпистатичен по отношению к аллелям локуса «Agouti».

У кошек ген с механизмом действия, фенотипически сходным с геном Extension, не известен. Некоторая аналогия прослеживается между действием гена E у собаки и Tabby у кошки.

По литературным данным мутации, сходные по проявлению с мутациями гена Extension, известны у лисиц.

С фенотипическим проявлением этого гена сходна мутация эбони E у шиншиллы. Возможно, что в данном случае мы также имеем дело с геном Extension.

Доминантная мутация E с аналогичным названием у норок имеет иное фенотипическое выражение, нежели известные мутации данного гена у других видов животных. Кроме того, мутация E в гомозиготе у норок летальна, что резко отличается от проявления мутаций гена Extension. Следовательно, у норки данным символом, вероятно, обозначен локус, несущий ген, отличный от Extension.

Ген чалости R (Roan). Ген чалости R у многих видов млекопитающих на характер окраски действует аналогично, обладая при этом рецессивным летальным или сублетальным эффектом. У овец показано, что аллель R полностью доминирует над r, эпистатичен по отношению к E^d и в гомозиготе летален.

Доминантный аллель гена «Roan» обуславливает развитие чалости у лошадей и собак. Предполагают, что данный феномен существует и у кошек.

Гены пегости (Piebald spotting). Ген s. Данный ген у собак и кошек влияет на скорость миграции меланобластов. Фенотипически проявляется появлением депигментированных участков тела. Экспрессия данного признака у различных мутаций неодинакова: от единичных белых пятен до практически сплошной белой окраски. У обоих видов известно по 4 аллеля этого гена. Основное отличие в проявлении данного гена у этих видов заключается том, что в отличие от собак у кошек пегость является доминантным признаком.

Наиболее известной группой овец, для которых типична пегость, обусловленная рецессивной мутацией гена S, являются овцы древней испанской пегой породы. Генотип этих животных имеет вид $E^d E^d ss$. В эту же группу генов у овец входят аллели локуса H, которые, согласно

гипотезе Алиева Г.А. и Рачковского М.Л. (1989), препятствуют миграции меланоцитов в эмбриональный период.

Пегость головы и ног (северная пегость) широко распространена среди романовских и северных короткохвостых овец, ряда голландских пород и черных меринсов. Некоторые связывают этот вариант пегости с мутациями гена S.

У лошади не описано мутаций гена Piebald spotting. Различные варианты пегости у лошади связаны с тремя генами: «Tobiano», «Overo» и LP. В гомозиготе «Overo» дает летальную белую окраску, т.е. по фенотипическому действию сходен с геном «доминантной белой окраски» лошади. Еще один вариант пегости – «леопардовая окраска». Полагают, что этот вариант окраса обусловлен локусом LP.

Ген W (White dominant). Один из вариантов белой окраски у кошки, связанный с доминантной мутацией гена, контролирующего пролиферацию меланобластов, обозначаемый символом W. Данная мутация включается на ранних стадиях онтогенеза и нарушает пролиферацию не только меланобластов, но и других производных нервной трубки. Одним из последствий этого является глухота у таких кошек.

Аналогичная мутация известна у лошадей. Доминантный аллель W у лошадей в гомозиготном состоянии летален, а в гетерозиготном – он обуславливает появление белой масти. Рецессивный аллель этого локуса в гомозиготном состоянии на окраску не влияет.

Возможно, что доминантной мутацией гена White dominant обусловлена окраска азербайджанских белых нутрий и доминантных белых шиншилл. В гомозиготном состоянии данная мутация у нутрий и шиншилл летальна.

Следовательно, данный ген входит в общую группу с двумя описанными выше категориями генов. К этой же группе, очевидно, о

тносятся ген раннего посеждения у собак (G), ген «Grey» лошади, гены **вашингтонской платиновой (F) и радиевой (r)** окраски у лисиц. Возможно, что к этой группе относится и окрас **золотистая крестовка**, связанный с мутацией в локусе, обозначаемом у норок символом **G**.

Естественно, что особенности формирования и последующей работы практически всех звеньев меланиновой “системы” (тропины, рецепторы и др.) кодируются не одним, а многими генами. Иначе говоря, цвет волос является полигенным признаком. Это обстоятельство несколько ограничивает свободную манипуляцию терминами “доминантность” и “рецессивность” применительно к проблеме пигментации волос и кожи. Между вовлеченными в данные процессы генами имеется межallelное взаимодействие, ставящее под вопрос любые теоретические прогнозы. Однако среди множества генов, детерминирующих окраску волос, имеются и такие, чей вклад является наиболее весомым (т.н. “главные” гены) и именно к ним определения “доминантный” или “рецессивный” все же применимы.

Все многообразие окрасов млекопитающих обусловлено наличием или отсутствием пигмента – меланина. Согласно современным представлениям меланин представлен двумя формами: эумеланином и феомеланином. Оба типа меланинов по своему составу гетерогенны. По своему составу меланины являются сложными гетерополимерами производных от ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина. Химическое строение меланинов окончательно не установлено из-за их большого разнообразия и сложной полимерной структуры.

При синтезе эумеланина, по данным Ватти К.В. и Алексеевич Л.А. (1976), фенилаланин под действием 1,2-фенилаланин – 4-гидроксилазы превращается в тирозин. Тирозин под действием тирозиназы превращается в 3,4-диоксифенилаланин (ДОФА), который под действием того же фермента в присутствии кислорода переходит в ДОФА-хинон. Дальнейшее

образование пигмента, согласно этим авторам идет аутокаталитически. ДОФА-хинон и его производные (ДОФА-хром, 5,6-дидидрокси-индол, индол-5, хинон-6) образуют гетерополимер эумеланина.

Необходимо отметить, что даже этот, казалось бы, простой биохимический процесс практически не изучен. Представление Ватти К.В. и Алексеевич Л.А. (1976) об аутокаталитическом характере превращения ДОФА-хинона в его производные оспаривается Медниковым Б.М. (1980), который считает, что для образования меланина требуется не менее 8 ферментов, катализирующих каждый этап перехода при синтезе меланина.

Эумеланин имеет две модификации: черный пигмент (собственно эумеланин) и коричневый пигмент (или серию пигментов), являющийся мутантной формой эумеланина. Гранулы эумеланина имеют несколько вытянутую эллипсоидальную форму и могут достаточно сильно варьировать по размерам.

В случае синтеза феомеланина происходит изменение в биохимическом процессе на стадии превращения ДОФА в ДОФА-хинон. В результате неизвестной пока мутации к молекуле ДОФА присоединяется серосодержащая аминокислота цистеин и образуется цистеинил-ДОФА, в результате чего не происходит образования индольного кольца. Считается, что это влечет за собой снижение синтезирующей способности меланосомы, вследствие чего пигментные гранулы феомеланина незначительны по размерам. Для феомеланиновых гранул характерна желтая или оранжевая окраска.

Как уже сказано выше, окрас шерстного волокна зависит от типа пигмента. У большинства окрашенных животных в волосе присутствуют оба пигмента. Кроме того, показано, что многие природные меланины представляют собой смесь эумеланина и феомеланина или результат сополимеризации продуктов окисления ДОФА и цистеинил-ДОФА.

Парадоксальность ситуации, сложившаяся в генетике окрасов, состоит в том, что, несмотря на то, что история вопроса насчитывает много десятилетий, достаточно трудно интерпретировать молекулярно-генетическую природу формирования окраски шерстного волокна. Это нелегко сделать даже на стадии биосинтеза пигмента, находящегося непосредственно под генетическим контролем. Исключение составляют лишь мутации тирозиназного гена, поскольку активность этого фермента играет роль «узкого места» в синтезе меланинов.

В настоящее время выяснился механизм действия еще одного гена, влияющего на характер пигментации – гена мелакортинового рецептора (MC1R). Этот рецептор, известный также как рецептор альфа-МСГ (альфа-мелакортинового гормона), является трансмембранным белком, состоящим из семи альфа-спиральных доменов, пронизывающих липидный бислой, и его функционирование тесно связано с G-белками (Chhajlani et al., 1992; Chhajlani, et al., 1993). MC1 рецепторы контролируют способность меланоцитов выделять пигмент меланин. опыты показали, что активация рецепторов приводит к увеличению черно-коричневой пигментации животных, а уменьшение рецепторной активности к увеличению красно-желтой пигментации (Wikberg et al., 2000).

Исследования показали, что у человека рыжий цвет волос (как правило, сочетающийся со светлой, плохо подверженной солнечному “загару” кожей) нередко встречается у людей, имеющих определенные особенности строения гена MC1R (“рецессивные” мутации R160W, D294N, R142H, 86insA и др.). Вышеперечисленные мутации “обеспечивают” рыжую окраску волос только в гомозиготном состоянии, т.е. для того, чтобы быть “рыжим”, пробанд должен унаследовать такие мутации одновременно от матери и от отца. Последние, в свою очередь могут быть гомозиготными по данной мутации (и тогда они тоже должны быть рыжеволосыми), либо гетерозиготными (в этом случае цвет волос

родителей чаще всего бывает темно-коричневым с разной долей “рыжеватости”, но может быть и почти черным; маловероятна только “блондинистость” волос одного или обоих родителей).

В то же время некоторые из мутаций в гене MC1R обеспечивают эффект, отнюдь не похожий на рецессивный. Так, например, люди, гетерозиготные по таким аллелям MC1R как R151C, 537insC или V60L, имеют существенные шансы быть рыжеволосыми. Такая особенность некоторых аллелей гена MC1R делает его похожим на доминантный ген с неполной пенетрантностью. Получены первые данные (Candille et al., 2007) о роли MC1R в формировании окраса у собак (рис. 28).

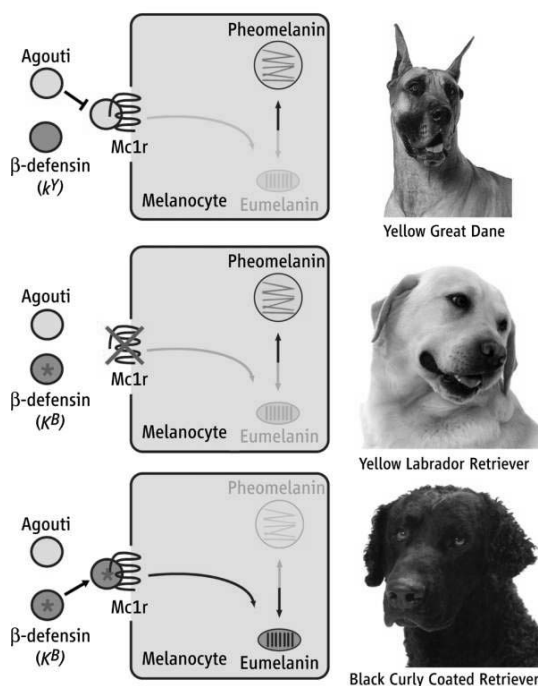


Рис. 28. Участие MCR1 рецептора в формировании окраса у домашней собаки (Candille et al., 2007; <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/318/5855/1418/DC2>)

Хотя у человека роль MC1R в формировании светлых цветов волос ясна, все же характер формирования цвета волосяного волокна — достаточно сложный процесс. Например, у собак формирование рыжего окраса и его производных (рис 29) определяется действием различных генов.



Рис. 29. Бульмастиф палевого окраса, одного из наиболее сложных по генетической природе окрасов у собак (<http://www.babby.by.ru/dogs/032.jpg>)

Помимо гена MC1R, в качестве “главного” гена рыжей окраски волос может быть рассмотрен также ген RHC. Условия проявляемости аналогичны таковым гена MC1R: детерминируемая геном RHC рыжая окраска рецессивна, но изредка отличается пенетрантностью в гетерозиготном состоянии.

В настоящее время удалось персонифицировать и один из генов, связанных с распределением меланина. Меланоциты распределяют меланин с помощью выступов клеточной мембраны – дендритов, которые контактируют с другими типами клеток, входящими в состав эпидермиса (наружного слоя кожи) или волосяных фолликулов. Однако механизм, определяющий клетки-накопители меланина, до настоящего времени оставался неизвестным. В результате изучения трансгенных мышей было показано, что накопление меланина в клетках зависит от активности гена Foxn1. В результате экспериментов было установлено, что ген Foxn1

взаимодействует с меланоцитами посредством белка Fgf2, содержание которого в клетке повышается при активации этого гена.

Знание генетических механизмов детерминации окраса позволяет в ряде случаев с определенной степенью уверенности по фенотипу реконструировать генотип животного. В фелинологии на основе этого подхода разработан ряд рекомендаций по разведению кошек, причем созданы таблицы прогноза окрасов при разных вариантах спаривания, в частности для персидских кошек (Крылова Н., Афолина И., 2002). В кинологии, фенотипическое проявление окрасов строго регламентируется в стандартах пород.

Разведение человеком любого вида животных в итоге преследует одну цель – получение и размножение особей с заданными свойствами. Не составляет исключения и селекция по окрасам. Учитывая неослабевающий рост интереса урбанизированного человека к животным-компаньонам, основное внимание мы обратим на решение этого вопроса в кинологии и фелинологии. Это обусловлено тем, что в данном случае значительное количество племенных животных, помимо крупных ведомственных питомников, находится в частных питомниках или у отдельных владельцев. При этом вся племенная работа со значительной долей поголовья ведется в рамках клубов, в связи, с чем очевидна необходимость соответствующей генетической подготовки, особенно начинающих владельцев и заводчиков.

Для характеристики генетических особенностей животного в данном случае возможно два подхода: оценка по фенотипу (экстерьерная оценка) и различные методы оценки на основании проявления окраса в ряде поколений (у родителей, потомков, боковых родственников и генеалогический анализ). Таким образом, более или менее реально оценить вероятность того, что дети унаследуют рецессивный ген, контролирующий

тот или иной окрас, можно либо на основании сегрегационного анализа, либо данных молекулярно-генетического обследования отца и матери.

Однако реально пройти вышеупомянутое молекулярно-генетическое исследование в настоящее время весьма проблематично. Причем это сложно сделать не только в России ибо большинство зарубежных исследовательских центров генетикой окраски волос пока еще не интересуются.

В связи с этим единственный пока метод изучения генетики окрасов – это анализ фенотипа животных в ряде поколений. Анализ родственных групп может быть достаточно надежен при исследовании пород относительно консолидированных по окрасу, но его использование при анализе пород, для которых допускаются широкие вариации масти, не гарантирует от получения ошибочных выводов.

Рассмотрим еще один из классических маркеров, нашедший применение в селекционной работе, главным образом для определения достоверности происхождения животных.

В последний год позапрошлого столетия были открыты наследственные признаки, которые имели полное право претендовать на роль генетических маркеров в их классическом понимании. В 1900 г. австрийский медик Карл Ландштейнер открыл существование групп крови (AB0) у человека. Длительное время этот факт не привлекал особого внимания генетиков, хотя имел большое прикладное значение. Только после объяснения Бренштейном (1924) характера наследования групп крови появилась отправная точка для развития иммуногенетических исследований.

Так что же открыли Ландштейнер и Бренштейн? Ландштейнер впервые обнаружил антигенные различия в крови у человека, а Бренштейн доказал, что эти различия обусловлены двумя аллелями одного локуса. Таким образом, была показана генетическая природа систем групп крови и

положено начало их изучению и практическому использованию. В настоящее время под системой групп крови понимают совокупность антигенов, контролируемых одним локусом. Число аллелей, контролирующих систему групп крови, может быть более двух. Если в генетической системе встречается более трех аллелей, такие системы называются полиаллельными. У крупного рогатого скота это А-, В-, С-, S-, F-, М- и Z-системы. У овец – В-система. У свиней - А-, Е-, F-, Н-, К-, L- и М-системы. Наиболее сложной из известных систем является В-система у крупного рогатого скота, включающая более 60 аллелей.

В сложных системах, например В- и С- системы у крупного рогатого скота, антигенные факторы контролируются несколькими тесно сцепленными сублокусами, расположенными на 12 и 18 хромосомах. С-система состоит из двух серий аллельных детерминант. Анализ рекомбинаций между фланкирующими аллелями показал, что длина участка хромосомы, занимаемого этой системой, составляет 0,3 сантиморана (сМ), тогда как размер В-системы равен 0,7 сМ. У свиней сцеплены локусы Н- и С- групп крови. Кроме того, J- локус сцеплен с генами SLA (главного комплекса гистосовместимости). Частота кроссинговера между локусами J- и SLA- составляет 9,8 сМ. Расстояние между локусом F-системы групп крови и геном эпистатической белой масти у свиней равно 16,7 сМ.

Все известные системы групп крови у сельскохозяйственных животных локализованы на аутосомах. Так, Н-система у свиней, тесно связанная с геном чувствительности к синдрому злокачественной гипертермии (MHS) локализована на 6 хромосоме, здесь же находится и S-система. Ген F-системы у свиней локализован на 17 хромосоме, а В- и J-системы на 7. У крупного рогатого скота гены групп крови А, L, S и Z локализованы на 15, 3, 21 и 10 хромосомах. Хромосомная локализация F-системы у этого вида пока неизвестна. У овец локализация групп крови не

определена. У лошади известна хромосомная локализация двух систем: А- на 20 и К- на 2 хромосоме.

С развитием иммуногенетических методов был обнаружен ряд новых систем крови у человека и животных. В настоящее время известно 12 систем групп крови у рогатого скота, 17 у свиней, 8 у овец, 9 у лошадей и 14 у птиц. Таким образом, число известных систем групп крови оказалось меньше числа хромосом. И хотя эти генетические структуры позволяют маркировать часть хромосом, значительная часть генома остается немеченой. О практическом использовании групп крови в селекционном процессе (в том числе и для сертификации племенного материала) будет подробно рассказано далее.

Здесь же мы остановимся лишь на одном моменте методического порядка. Дело в том, что эффективность использования групп крови в селекционном процессе зависит не только от степени полиморфизма той или иной системы, но и от генетической структуры популяции. Это положение наглядно иллюстрируют данные Н. С. Марзанова (1990), приведенные в таблице 3.

Таблица 3

Эффективность применения систем групп крови и полиморфных белков у овец для контроля достоверности происхождения с учетом популяционных частот аллелей (Марзанов Н.С. 1990)

Система	Число аллелей	Эффективность системы	Общая эффективность
Группы крови			
А	2	0,07	
В	8	0,44	0,48
С	3	0,13	0,55
Д	2	0,03	0,57
М	4	0,07	0,59
Полиморфные белки			
Tf	14	0,44	0,77
Hb	3	0,13	0,80
Ca	2	0,03	0,81

Из этих материалов видно, эффективность использования системы прямо пропорциональна числу входящих в нее аллелей, но эта зависимость отличается от прямолинейной. Это связано с различиями в генетической структуре популяции по аллелям, относящимся к разным системам групп крови и полиморфных белков. В связи с чем системы, характеризующиеся одинаковым уровнем полиморфизма могут иметь в одной и той же популяции разную информационную ценность, что надо учитывать при сертификации племенного материала.

Вопросы для самопроверки по теме 5.

1. Качественные признаки у животных.
2. Мутации окраса на примере американской норки.
3. Химическая природа пигментов, определяющих окрас.
4. Классические представления о формировании окраса
5. Генетический контроль меланогенеза.
6. Полиморфизм генов окраса. Межаллельные взаимодействия.
7. Роль MCR1 и Foxn1 генов в формировании окраса.
8. Масть как квалификационный признак племенного животного.
9. Подходы к генотипированию по окрасам.
10. Понятие о системах групп крови.
11. Полиаллельные системы.
12. Иммуногенетическая изученность сельскохозяйственных животных.

Глава 6. Основы ДНК-диагностики генных мутаций

Анализ нуклеотидной последовательности генов. Мутации и изменение сайтов рестрикции. Анализ длин рестриктных фрагментов.

С развитием молекулярной генетики и молекулярной биологии стала возможной идентификация генов, напрямую или косвенно связанных с хозяйственно-полезными признаками (геномный анализ). Задачи геномного анализа состоят в исследовании нуклеотидной последовательности генома, идентификации отдельных генов, как структурных, так и функциональных единиц, и выявление механизмов действия генов на проявление признаков. Идентификация генетических маркеров локусов количественных признаков сельскохозяйственных животных делает возможным оценку истинного генетического потенциала животных без учета влияния факторов внешней среды. Выявление предпочтительных с точки зрения селекции вариантов таких генов позволит дополнительно к традиционному отбору животных, например, по уровню удоя, содержания жира и т.п., проводить селекцию непосредственно на уровне ДНК, то есть по генотипу (маркер-зависимая селекция) (Зиновьева Н.А. и др., 2002).

Технологии живых систем являются одним из приоритетных направлений развития науки и техники России. В развитии данного направления на современном этапе важную роль играет использование генодиагностики, включенной в перечень критических технологий Российской Федерации.

Генодиагностика (ДНК-диагностика) представляет собой перспективное направление фундаментальной и прикладной биотехнологии, одной из областей применения которой является

разведение и селекция сельскохозяйственных животных. Необходимой предпосылкой для выполнения генной диагностики является наличие генетического полиморфизма, который лежит в основе наследственной изменчивости всех признаков организма. Говоря о генетическом полиморфизме, имеют в виду, что конкретный локус представлен, по меньшей мере, двумя вариантами проявления (аллелями). Полиморфный характер локуса возрастает с увеличением числа аллелей. К локусам, характеризующимся наличием трех и более аллелей, следует отнести локусы систем групп крови у сельскохозяйственных животных. Наряду с полиморфизмом ДНК и белка различают также хромосомный полиморфизм.

Генетический полиморфизм может быть выявлен на фенотипическом, биохимическом, хромосомном, молекулярном и геномных уровнях.

В случае молекулярно-генетического полиморфизма речь идет об изменениях в структуре ДНК, обусловленных различными типами мутаций: точковыми мутациями, делециями и инсерциями одного или большего числа нуклеотидов. Наиболее распространенный тип полиморфизма обусловлен точковыми мутациями (Зиновьева Н.А., 2005).

Термин «*точковая мутация*» означает локальное изменение в нуклеотидной последовательности ДНК, обусловленное заменой одного азотистого основания на другое. Более широкое распространение для обозначения этого типа полиморфизма получил термин SNPs (single nucleotide polymorphisms) - полиморфизм единичных нуклеотидов (Brookes, 1999). SNPs – это позиции в последовательности геномной ДНК, которые в популяции могут быть представлены различными нуклеотидами (аллелями), при этом редкий аллель встречается с частотой не менее 1%. Если частота встречаемости редкого аллеля составляет более 20%, то говорят о "распространенных SNPs".

Генетический полиморфизм свойственен как структурным генам, так и некодирующим нуклеотидным последовательностям. В случае структурных генов, которые кодируют белки, изменения в структуре ДНК могут обуславливать изменения в аминокислотных последовательностях белка и, как следствие, нарушение действия генов. Так, например, точковые мутации могут обуславливать появление стоп-кодона в кодирующей последовательности белка, приводя тем самым к остановке транскрипции и образованию белков с соответствующими нарушениями их функциональности (Зиновьева Н.А., 2005).

Точечные мутации в кодирующей области могут приводить к замене одной аминокислоты на другую, изменяя тем самым аминокислотную структуру, а, следовательно, и функции белка. Как и в случае обрыва аминокислотной последовательности белка, это может приводить к различным генетическим заболеваниям.

Отправным моментом для проведения исследований локусов количественных признаков является создание банка ДНК животных различных пород. Исходным материалом для создания банка ДНК являются пробы ткани (ушной выщип), крови или спермы.

Ушной выщип размером около $0,5 \times 0,5$ см сразу после отбора помещают в 1,5 мл пробирки, наполненные 1 мл 96% этилового спирта. Пробы спермы (в пайетах или гранулах) транспортируют в лабораторию или в жидком азоте, или в 1,5 мл пробирках, или пенициллиновых флаконах с 96% спиртом, помещая в каждую по 2 спермодозы. Консервацию проб крови осуществляют, используя кислый цитратный раствор (ACD) (Зиновьева и др., 1998).

Для выделения ДНК могут быть использованы методы, подробно описанные ранее (Зиновьева и др., 2002). Для создания банка ДНК крупного рогатого скота в ВИЖ нами был использован, главным образом, метод экстракции с перхлоратом натрия.

В таблице 4 обобщены методы, использующиеся для анализа SNPs.

Таблица 4.

Методы детекции точковых мутаций.

Обозначение	Краткое описание
• ПДРФ (RFLP)	расщепление геномной ДНК соответствующими рестрикционными ферментами с последующим разделением в геле и гибридизацией по Southern.
• ПЦР-ПДРФ (PCR RFLP)	амплификация фрагмента, содержащего точковую мутацию посредством ПЦР, с последующим анализом ПДРФ
• АС-ПЦР (AS-PCR)	амплификация фрагмента, содержащего точковую мутацию, с использованием специфических для каждого из аллелей праймеров
• ЛЦР (LCR)	специфическое для SNP лигирование LCR- и аллелеспецифических праймеров, комплементарных матрице с использованием термостабильной ДНК-лигазы
• анализ гетеродуплексов	денатурация продуктов ПЦР с последующей их ренатурацией и определение подвижности методом гельэлектрофореза
• секвенирование	определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК, содержащего точковую мутацию
• SSCP	электрофорез денатурированных одноцепочечных продуктов ПЦР, содержащих точковую мутацию, в неденатурирующем геле
• масс спектрометрия	ионизация на матрице молекул ДНК с последующей разгонкой в электрическом поле и определением скорости движения.

Рассмотрим некоторые из этих методов более подробно.

Метод полимеразной цепной реакции, ПЦР (рис. 30) представляет собой энзиматическую амплификацию специфических участков ДНК *in vitro*. Метод разработан Saiki с соавторами (1985), а затем вследствие применения термостабильной Таq-полимеразы был упрощен и автоматизирован (Saiki et al., 1988). Количество выбранного участка ДНК

в ходе ПЦР увеличивается в 10^8 - 10^9 раз, что делает возможным его визуализацию. Для выполнения ПЦР используют два синтетических олигонуклеотидных праймера (обычно одноцепочечные фрагменты ДНК длиной 18-22 нуклеотидов), комплиментарные двум различным цепям специфического фрагмента ДНК. Праймеры ориентируют таким образом, что после отжига к матрице они своими 3'-концами располагаются друг напротив друга. Праймеры служат начальными пунктами (затравками) синтеза ДНК термостабильной Taq-полимеразой, которая в присутствии ионов Mg^{2+} катализирует синтез новой цепи ДНК из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ) в направлении 5'→3'.

ПЦР состоит из повторяющихся циклов энзиматической амплификации ДНК, каждый из которых включает три шага: денатурация ДНК, отжиг праймеров и синтез новой цепи ДНК (рис. 30). В ходе денатурации, протекающей, как правило, при 94-95°C, происходит разделение двухцепочечной ДНК на одиночные цепи. Для отжига праймеров с одноцепочечной матрицей температуру снижают с тем, чтобы праймеры могли гибридизоваться с комплиментарными им участками матрицы. После отжига праймеров с повышением температуры до 72°C происходит синтез новой цепи ДНК. Конечный продукт ПЦР - специфический фрагмент ДНК, концами которого являются 5'-концы праймеров.

ПДРФ-анализ. Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) нашел широкое применение в выявлении различных вариантов генов. Он выполняется как в сочетании с Саузерн-блот анализом, так и с ПЦР анализом. Говоря об анализе ПДРФ, в большинстве случаев подразумевают проведение Саузерн-блот анализа.

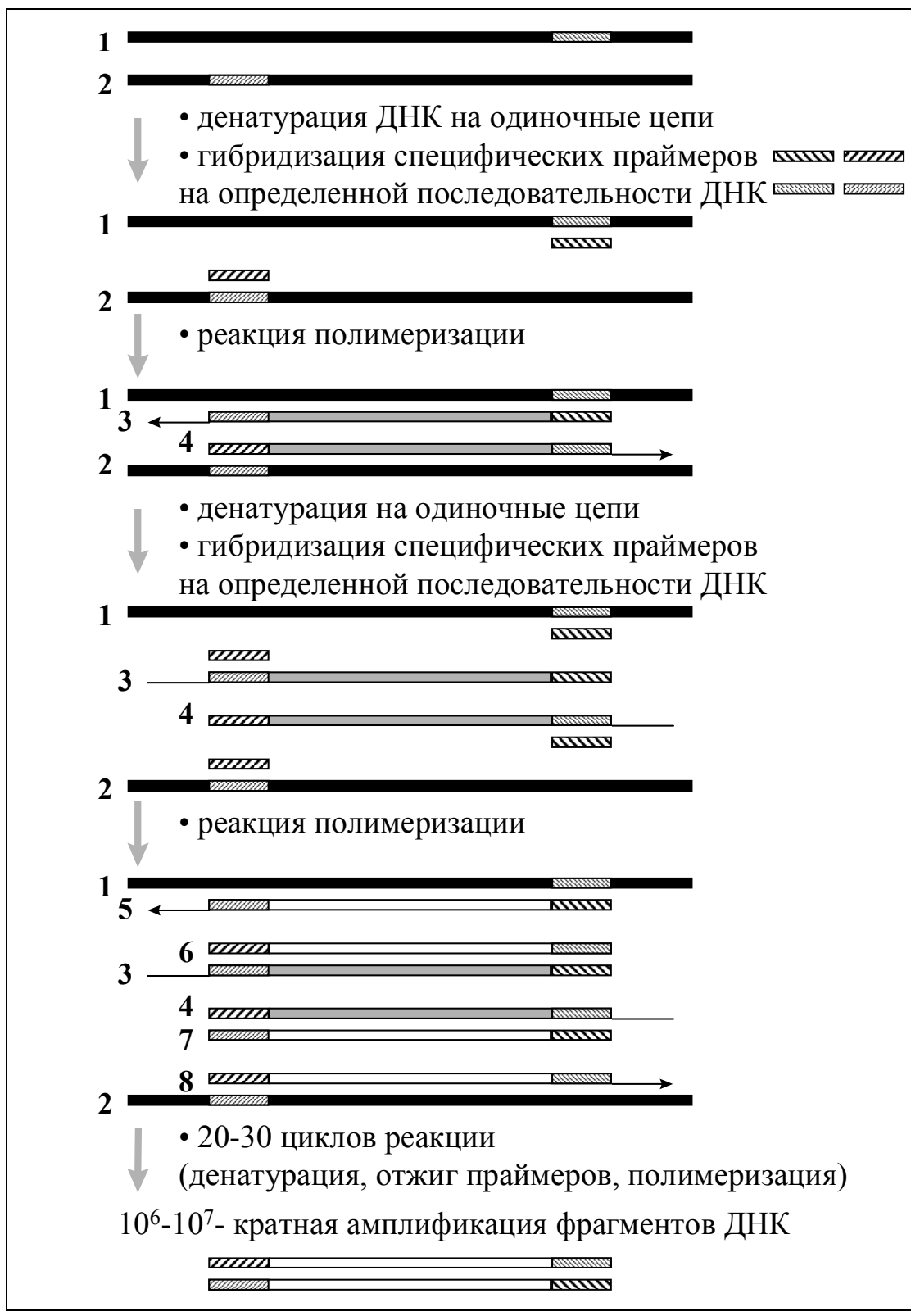


Рис. 30. Схема полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Саузерн-блот анализ получил название по имени своего разработчика Эдвина Саузерна. 10-20 мкг хорошо очищенной высокомолекулярной ДНК гидролизуют ферментами, способными разрезать ДНК в специфических участках связывания - так называемыми рестрикционными эндонуклеазами типа II. Сегодня известно около 400 таких ферментов из более 200 бактериальных штаммов с 90 специфическими участками разрезания. Различают тетра- пента- и гексануклеазы с последовательностью узнавания, соответственно, четыре, пять и шесть нуклеотидов. Если принять, что доля пар ГЦ в геноме составляет 50%, то тетрануклеазы будут разрезать ДНК в среднем через каждые $4^4 = 256$ п.о., а гексануклеазы - в среднем через каждые $4^6 = 4096$ п.о. Примером тетрануклеазы является фермент *HaeIII*, выделенный из *Haemophilus aegyptius* с последовательностью узнавания 5' – ГГ/ЦЦ - 3'. Примером гексануклеазы может служить фермент *EcoRI*, выделенный из *E. coli* и узнающий нуклеотидную последовательность 5' – ГАА/ТЦЦ - 3'.

Рестрицированную ДНК разделяют в 0,8-1% агарозном геле, фрагментируют посредством депурирования, после чего осуществляют перенос на нитроцеллюлозный или капроновый фильтр по методу. С этой целью на гель помещают фильтр и слой фильтровальной бумаги высотой около 10 см. Принцип переноса основан на действии капиллярной всасывающей силы фильтровальной бумаги. Для полного переноса ДНК из геля на фильтр требуется 10-15 часов. Для ускорения переноса могут быть использованы методы вакуумного блотинга и электроблотинга.

После переноса ДНК фиксируют на фильтре посредством облучения ультрафиолетом, короткой экспозиции в растворе NaOH или выдержки при 80°C в течение 2 часов. Затем осуществляют гибридизацию фильтра в течение 1-2 часов с неспецифической ДНК с целью блокировки неспецифических участков связывания и затем с меченой специфической ДНК (ДНК-зонды) в течение 10-15 часов. В качестве зондов могут быть

использованы как радиоактивно, так и не радиоактивно меченые пробы (диоксигенин, флуоресцин и другие). Следует отметить, что уже существуют нерадиоактивные метки, позволяющие добиться не меньшей чувствительности, чем при использовании радиоактивно меченых зондов. После гибридизации фильтр отмывают от несвязанных и не специфически связанных зондов, регулируя степень отмывки молярностью солевого раствора. Чем ниже концентрация соли в отмывающем буфере, тем интенсивнее степень отмывки.

Заключительным этапом является экспозиция фильтра на рентгеновскую пленку при -80°C . При использовании нерадиоактивной метки, предварительно проводят инкубацию фильтра со специфическим для метки субстратом. Детекцию в этом случае осуществляют колориметрическим методом по появлению окраски или люминесцентным методом посредством экспозиции на соответствующую фотопленку.

Таким образом, Саузерн-блот анализ позволяет сделать вывод не только о наличии специфических фрагментов, но и об их длине. Модификацией метода является так называемая реверсивная гибридизация по Саузерну, которая позволяет исключить перенос фрагментов ДНК из геля на фильтр. Гибридизацию обработанной рестрикционным ферментом ДНК в этом случае осуществляют в пробирке, после чего разделяют фрагменты в геле и идентифицируют. Преимуществом данной техники является сокращение времени, требующегося для гибридизации фрагментов, до минут по сравнению с часами при выполнении гибридизации на фильтре.

Если анализируемый участок ДНК не содержит последовательности узнавания используемого рестрикционного фермента, то наблюдается один фрагмент большей длины. В случае наличия участка разрезания наблюдается образование более короткого фрагмента.

Примером такого анализа является определение аллелей эстрогенового рецептора (ER) свиней (Rothschild et al., 1996). Схематично это представлено на рисунке 5. Аллель А характеризовался отсутствием в исследуемом фрагменте гена ER свиней сайта *PvuII*, и как следствие наличием нерестрицированного фрагмента длиной 4,3 т.п.о. В случае присутствия специфического сайта (аллель В) идентифицировались фрагменты длиной 3,7 и 0,6 т.п.о., соответствующие аллелю В. Таким образом, генотипы свиней по ER, представленные на дорожках 1-3 (рис. 31), могут быть идентифицированы, соответственно, как AA, AB и BB.

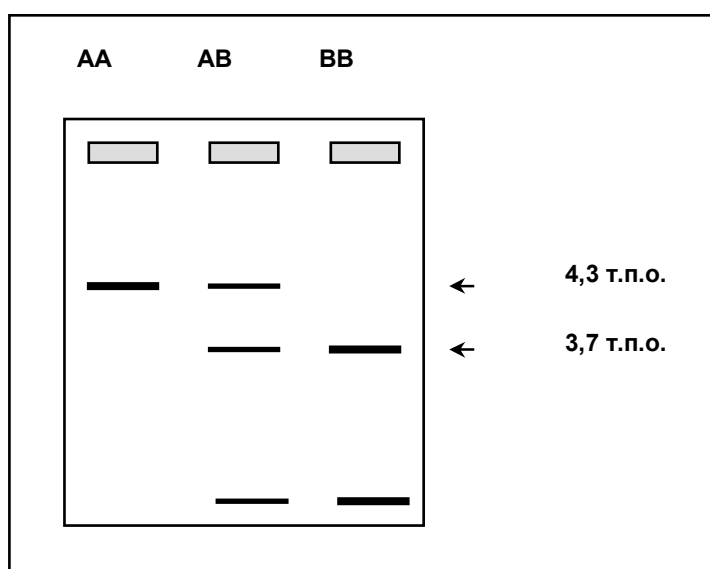


Рис. 31. Схема ПДРФ анализа гена ER свиней (по Rothschild et al., 1996). Для гидролиза геномной ДНК свиней была использована эндонуклеаза *PvuII*. В качестве зонда применяли фрагмент кДНК ER человека. Фрагмент длиной 4,3 т.п.о. соответствует аллелю А, в то время как фрагмент длиной 3,7 т.п.о. – аллелю В. Длины фрагментов в т.п.о. показаны слева от рисунка.

ПЦР-ПДРФ. Стандартным методом анализа точковых мутаций является ПЦР анализ с последующим рестрикционным гидролизом образующихся фрагментов (ПЦР-ПДРФ) (Schumm et al., 1988; Saperstin et al., 1991). Суть метода заключается в амплификации определенного

фрагмента ДНК, содержащего анализируемую точковую мутацию, с последующим расщеплением его соответствующей рестрикционной эндонуклеазой. По длине фрагментов (ПДРФ) делают вывод об отсутствии или наличии точечной мутации, а также о гомозиготности или гетерозиготности индивидуума по данному аллелю.

Данный метод получил широкое распространение благодаря своей простоте и надежности. Он рутинно используется для диагностики аллельного полиморфизма ряда генов-кандидатов, связанных с локусами хозяйственно-полезных признаков сельскохозяйственных животных (рианодинный рецептор, эстрогеновый рецептор, рецептор E.coli, каппа-казеин и др.), а также для диагностики ряда наследственных заболеваний (BLAD, DUMP, цитрулинэмия и другие). На рисунке 32 в качестве примера показаны фореграммы выявленных ПЦР-ПДРФ методом полиморфных вариантов генов, влияющие на продуктивные признаки свиней.

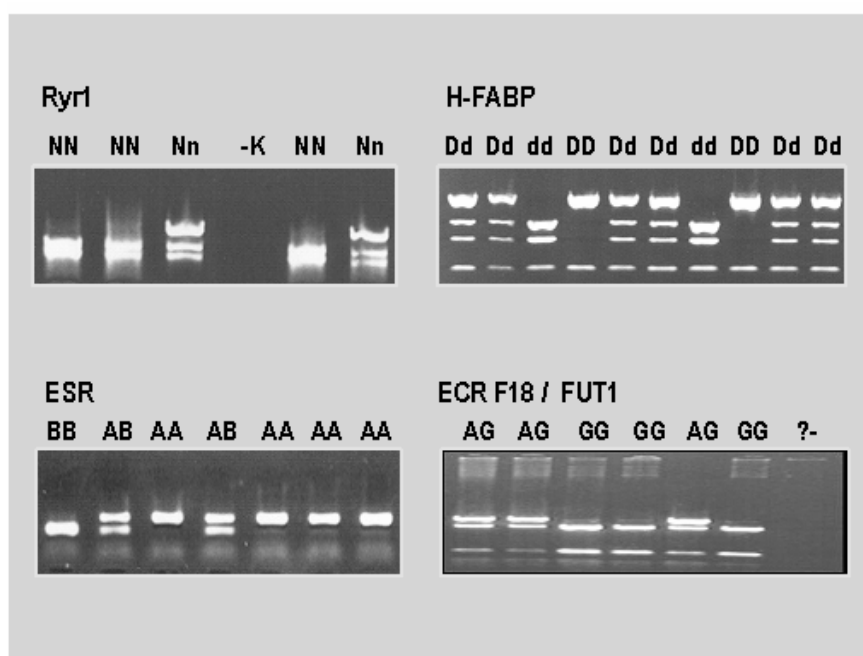


Рис. 32. Выявление маркеров продуктивности методом ПЦР-ПДРФ анализа. На дорожках фореограмм видны рестриктные фрагменты ДНК разной длины, соответствующие различным аллелям исследуемых генов.

Следует, однако, отметить, что стандартный метод ПЦР-ПДРФ имеет некоторые ограничения, так как позволяет диагностировать только те SNPs, которые обуславливают образование или, наоборот, исключение сайта рестрикции. Одним из путей решения данной проблемы может быть искусственное введение в исследуемый фрагмент ДНК сайта рестрикции посредством праймеров. С этой целью один из двух праймеров, используемых для амплификации интересующего фрагмента ДНК, подбирают таким образом, чтобы он своим 3' концом приходился на область точечной мутации и за счет замены одного нуклеотида приводил к образованию сайта рестрикции в одном из полиморфных аллелей (рис. 33).

Метод аллелеспецифической ПЦР (АС-ПЦР, ARMS = Amplification Refractory Mutation System) (Newton et al., 1989) является модификацией ПЦР-ПДРФ анализа является так называемый. Использование АС-ПЦР для диагностики различных аллельных вариантов имеет ряд преимуществ перед стандартным методом ПЦР-ПДРФ: отсутствие необходимости наличия сайта рестрикции в точке мутации, сокращение времени анализа за счет исключения процедуры рестрикционно-энзиматического гидролиза продуктов ПЦР, а также уменьшение материальных затрат. Суть метода АС-ПЦР заключается в проведении независимых для каждого аллеля реакций с использованием специфического лишь для одного аллеля праймера в паре с общим праймером. Вывод о генотипе животного в случае двухаллельного признака делается на основании сравнения результатов двух реакций (Newton et al., 1989, Wu et al., 1989).

Lo с соавторами (1991) разработали двойной ARMS, включающей использование двух аллелеспецифических праймеров в одной реакции. Оба праймера являются специфичными для двух различных точечных мутаций внутри одного аллеля.

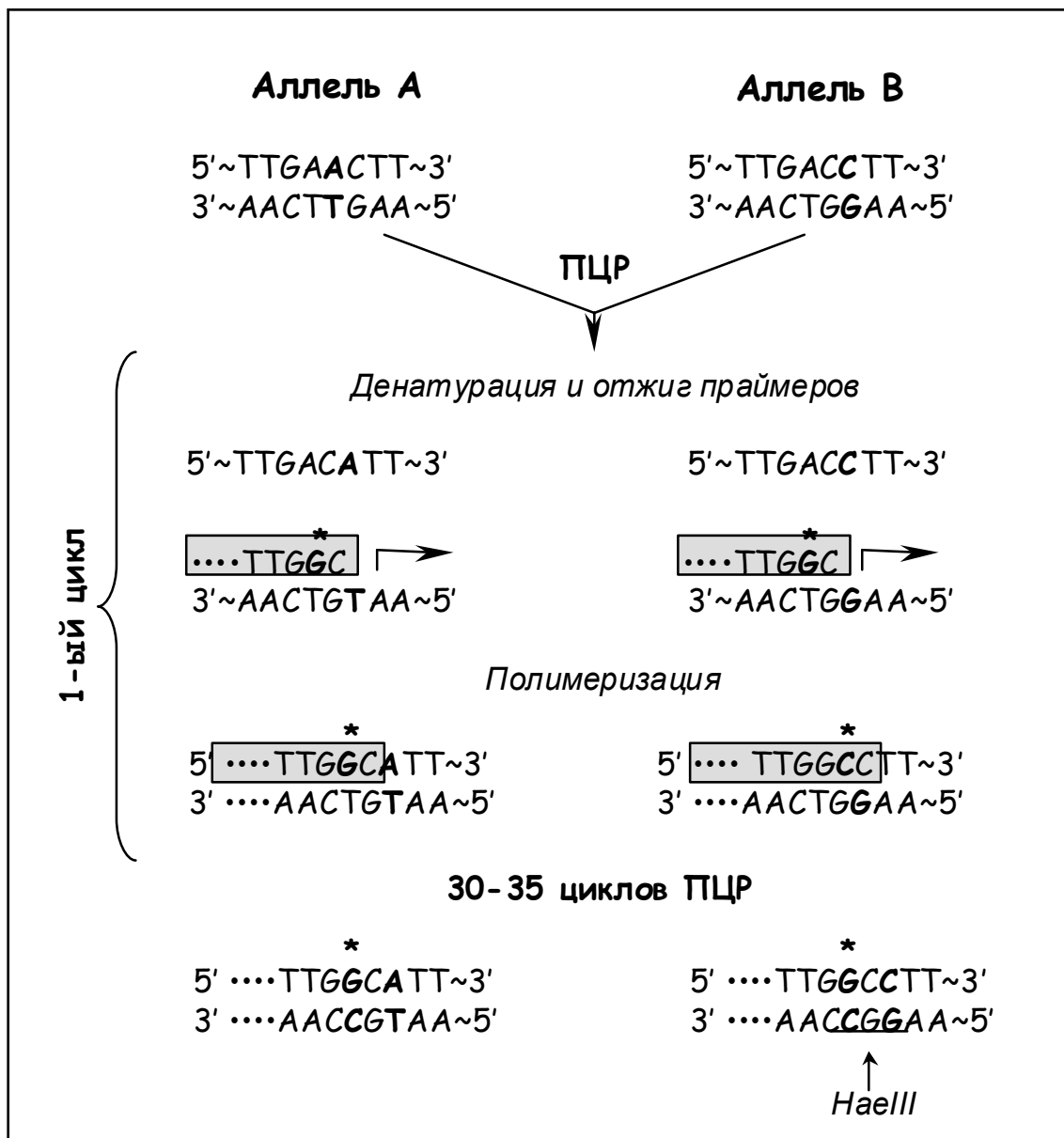


Рис. 33. Схема ПЦР-ПДРФ анализа с введением в амплифицируемый фрагмента сайта рестрикции. Мутлируемый нуклеотид в последовательности ДНК показан жирным шрифтом. Искусственно введенная в праймер (показана серым прямоугольником) олигонуклеотидная замена выделена жирным шрифтом и маркирована звездочкой. Образующийся в ходе ПЦР одного из аллелей (аллель В) рестрикционный сайт HaeIII подчеркнут.

Использование двух специфических праймеров для каждого аллеля, по мнению авторов, позволяет исключить неспецифические реакции и тем самым увеличить достоверность анализа. Для определения аллельного состояния индивидуума (гомо- или гетерозигота) выполнялись четыре

независимые реакции. Учитывая, что длина фрагментов, амплифицируемых с помощью ПЦР в рутинном анализе исчисляется несколькими сотнями пар оснований (п.о.), необходимым требованием для применения данного подхода является высокая полиморфность анализируемого участка ДНК.

Способ для одновременного анализа обоих аллельных вариантов был предложен Li с соавторами (1990). Использование в одной реакции двух различающихся по длине аллелеспецифических праймеров в комбинации с одним общим праймером приводило к образованию фрагментов, длина которых зависела от аллеля. Поскольку различие праймеров по длине исчислялось несколькими нуклеотидами, эта техника требовала использования электрофореза в высоко разрешающем полиакриламидном геле и поэтому была не вполне удобна для проведения рутинных молекулярно-генетических исследований.

Зиновьевой Н.А. с соавторами (Зиновьева и др., 1996; Zinovieva et al., 1996) разработан однопробирочный ("single tube") метод диагностики точечных мутаций с использованием АС-ПЦР. Аналогичный метод, названный Bi-PASA (Bidirectional PCR Amplification of Specific Alleles) – двунаправленная ПЦР амплификация специфических аллелей был предложен несколько позже Liu с соавторами (1997).

Принцип выбора аллелеспецифических праймеров заключается в следующем (рис. 34): два аллелеспецифических "внутренних" праймера (INT1, INT2), каждый из которых специфичен для одного из двух аллелей, ориентируются в противоположных направлениях и своими последними нуклеотидами на 3' конце приходятся на точковую мутацию. При этом последний нуклеотид одного из праймеров соответствует нормальному, а другого - мутантному аллелю

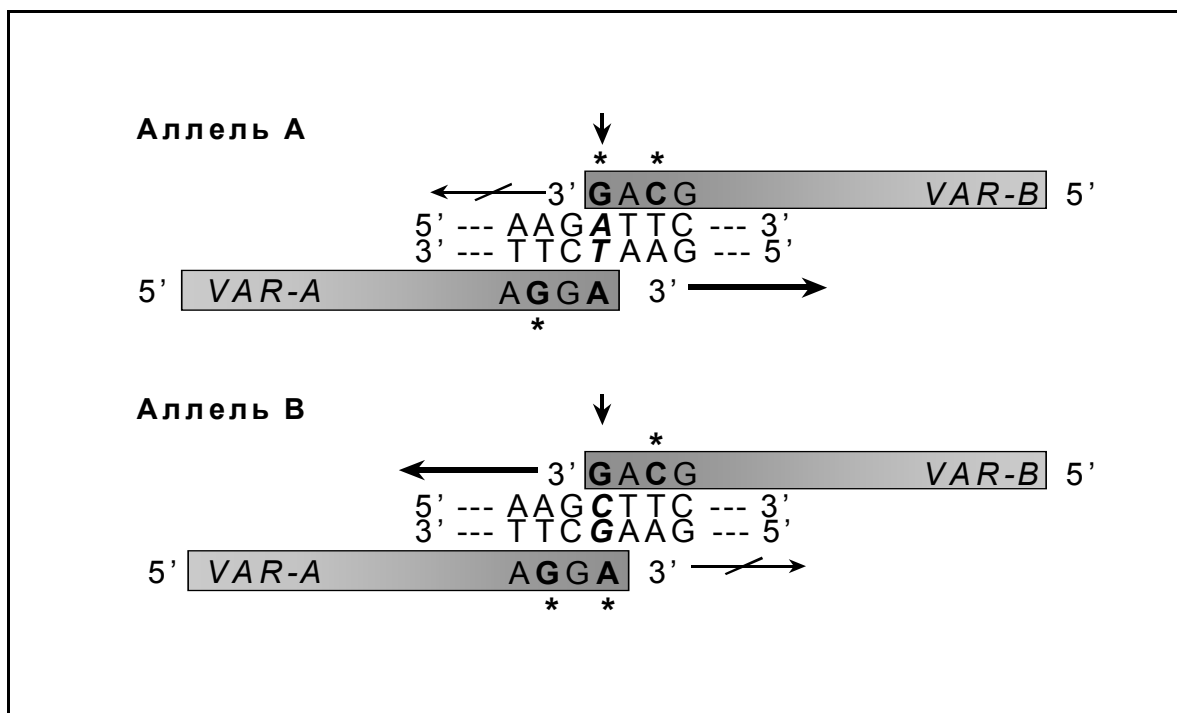


Рис. 34. Дизайн и расположение аллелеспецифических праймеров на примере анализа гена каппа-казеина КРС. Показаны последовательности ДНК в области точковой мутации (маркирована стрелкой) и 3'-концы аллелеспецифических праймеров. Мутируемые нуклеотиды выделены жирным курсивом. Нуклеотиды в праймерах, влияющие на аллелеспецифичность реакции, выделены жирным шрифтом, при этом нуклеотиды не комплементарные матрице маркированы звездочкой.

Для увеличения аллельной специфичности в праймеры вводятся дополнительные нуклеотидные замены в позиции 3 от 3' конца праймера (Newton et al., 1989, Wu et al., 1989). Предлагаемый дизайн праймеров предполагает сочетание в одной реакции четырех различных олигонуклеотидов. Общие для обоих аллелей "наружные" праймеры (EXT1, EXT2) локализуются на различном расстоянии от точковой мутации. Таким образом, специфический для одного из аллелей фрагмент EXT1-INT1 отличается по длине от амплифицируемого с другого аллеля фрагмента INT2-EXT2 (рис. 35).

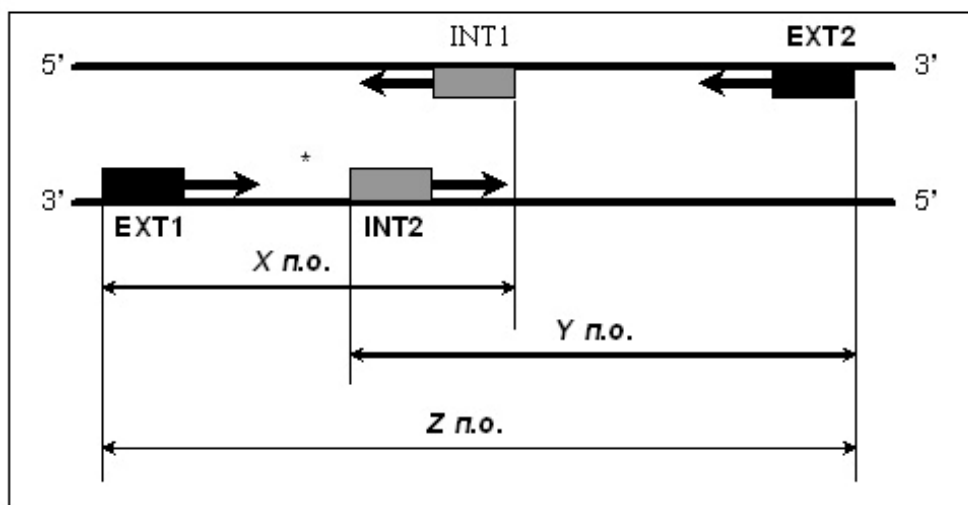


Рис. 35. Схема “single tube” метода аллелеспецифической ПЦР. Внутренние специфические для двух различных аллелей праймеры INT1 и INT2 (показаны серыми прямоугольниками) своими последними нуклеотидами приходятся на точковую мутацию (показана звездочкой). В комбинации с наружными праймерами EXT1 и EXT2 (показаны черными прямоугольниками) они приводят к амплификации фрагментов длиной X п.о. для одного из аллелей и Y п.о. для другого аллеля. Длина общего для обоих аллелей продукта амплификации “наружных” праймеров обозначена Z.

Зависимость длины фрагментов от аллеля делает возможным непосредственное определение генотипа животного по данному признаку по результатам одной одноступенчатой реакции.

Данная методика была нами апробирована для анализа гена каппа-казеина и диагностики BLAD крупного рогатого скота и гена *gug1* свиней.

Преимуществами одноступенчатого метода АС-ПЦР являются: (1) Возможность идентификации генотипа по результатам одной реакции; (2) Отсутствие необходимости использования рестрикционных ферментов; (3) Сокращение материальных и временных затрат.

Лигазная цепная реакция, LCR основана на использовании термостабильной ДНК-лигазы, способной сшивать ники (одноцепочечные разрывы) в случае, если фланкирующие ник нуклеотиды комплементарны

матрице. В стандартной лигазной цепной реакции используются четыре олигонуклеотидных праймера: два аллеле-специфических праймера и два LCR-праймера. Аллелеспецифические праймеры ориентированы в противоположных направлениях и своими последними нуклеотидами на 3' конце приходятся на точковую мутацию. LCR-праймеры непосредственно примыкают к аллелеспецифическим праймерам с 3' конца. После повторных циклов денатурации и лигирования с использованием термостабильной ДНК-лигазы, продукты LCR детектируются с помощью электрофореза (рис. 36).

Для диагностики двухаллельных SNP's необходимо проведение двух независимых реакций с использованием специфических для каждого из аллелей праймеров. Введение в аллелеспецифические праймеры флуоресцентной метки (метка различается в зависимости от аллеля) делает возможным проведение специфической для каждого из аллелей LCR в одной реакции.

Полиморфизм структуры одноцепочечной ДНК, SSCP был впервые описан Orita с соавторами (1989). Традиционный SSCP анализ состоит из нескольких стадий: амплификация фрагмента ДНК, содержащего точковую мутацию, денатурация продуктов ПЦР и разделение их в неденатурирующем полиакриламидном геле. Электрофоретическая подвижность одноцепочечных фрагментов ДНК зависит от их нуклеотидной последовательности, которая определяет характер вторичных и третичных структур. Даже единичная нуклеотидная замена изменяет подвижность ДНК в геле и может быть идентифицирована. Оптимальный размер ампликона для детекции большинства точечных мутаций составляет менее 200 п.о.

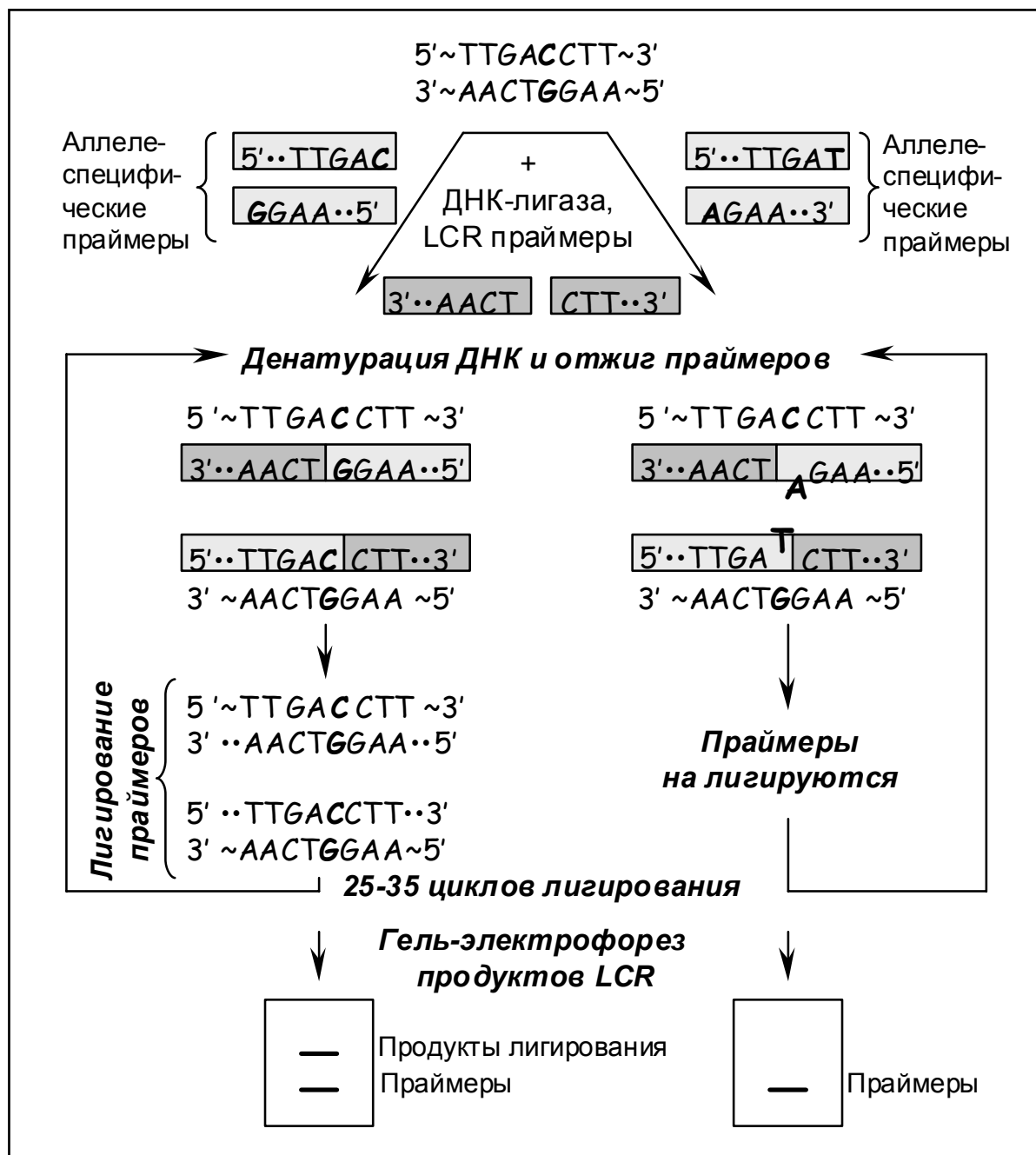


Рис. 36. Схема лигазной цепной реакции (LCR). SNP в последовательности ДНК, а также введенные в аллелеспецифические праймеры олигонуклеотидные замены показаны жирным шрифтом. Нуклеотиды, не комплиментарные матрице, вынесены в подстроку (надстроку).

Преимуществом SSCP-анализа является его высокая производительность. Данный метод может быть легко автоматизирован за счет введения в амплифицируемый фрагмент флуоресцентной метки и применения метода капиллярного электрофореза с последующей детекцией фрагментов на капиллярном секвенаторе (например, ABI 310). В этом случае производительность метода может быть значительно повышена за счет одновременного анализа нескольких SNP's.

К недостаткам SSCP анализа следует отнести тот факт, что различия в подвижности фрагментов ДНК не коррелируют с различиями в последовательности. Это означает, что последовательности двух более далеких в генеалогическом дереве видов могут иметь практически одинаковую подвижность, в то время как ампликоны двух разных семейств одного и того же вида могут расходиться в геле более далеко. Таким образом, единственная информация, которая может быть получена на основании результатов SSCP, это - являются ли продукты ПЦР идентичными или не идентичными.

Анализ гетеродуплексов заключается денатурации продуктов ПЦР с последующей их ренатурацией. Если последовательности двух цепей полностью комплементарны, то образуются гомодуплексы. Наличие двух полиморфных аллелей обуславливает образование так называемых гетеродуплексов. Разделение гомо- и гетеродуплексов основано на их различной электрофоретической подвижности в неденатурирующем геле.

Метод масс спектрометрии (MALDI-MS) заключается в ионизации на матрице молекул ДНК с их последующим отрывом от матрицы методом MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionisation) и разгонке в электрическом поле в вакуумной камере. При этом время достижения молекулами ДНК детектора фиксируется. Так как скорость движения молекул ДНК зависит от их нуклеотидной последовательности, и даже

единичные нуклеотидные замены изменяют подвижность молекул (скорости движения прямо пропорциональна отношению массы летящей молекулы ДНК к ее заряду), методом MALDI-MS могут быть достоверно диагностированы SNP's как в гомо-, так и в гетерозиготном состояниях. Метод находит применение вследствие высокой чувствительности (для анализа достаточно нескольких нанолитров раствора ДНК), быстроты анализа (время, затрачиваемое на анализ каждого образца составляет всего несколько секунд), а также высокой производительности (одновременно могут анализироваться несколько SNP's) (Little et al. 1997; Graber et al. 1999; Griffin et al. 1999; Li et al. 1999; Jackson et al. 2000).

Секвенирование – это определение нуклеотидной последовательности ДНК какого-либо гена. Оно служит и как основной метод, используемый при картировании геномов различных видов растений и животных. В зависимости от секвенирующего праймера различают прямой и обратный сиквенс. В основе метода секвенирования лежит либо избирательная химическая деградация нуклетидов, либо терминация (прерывание) синтеза ДНК. Метод терминации (рис.37) наиболее распространен в настоящее время. Терминирующими агентами являются 2'3'-дидезокситрифосфаты (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ и ддЦТФ).

При втором методе, получившем название ферментативного, готовят четыре реакционные смеси, содержащие одну и ту же анализируемую ДНК, радиоактивно меченый праймер и ДНК-полимеразу-I, но различающиеся входящими в них 2'3'-дидезокситрифосфатами. В каждой пробирке синтез ДНК будет прерываться в том месте, где ДНК-полимераза-I присоединит соответствующий 2'3'-дидезокситрифосфат, при этом возникнет набор фрагментов разной длины.

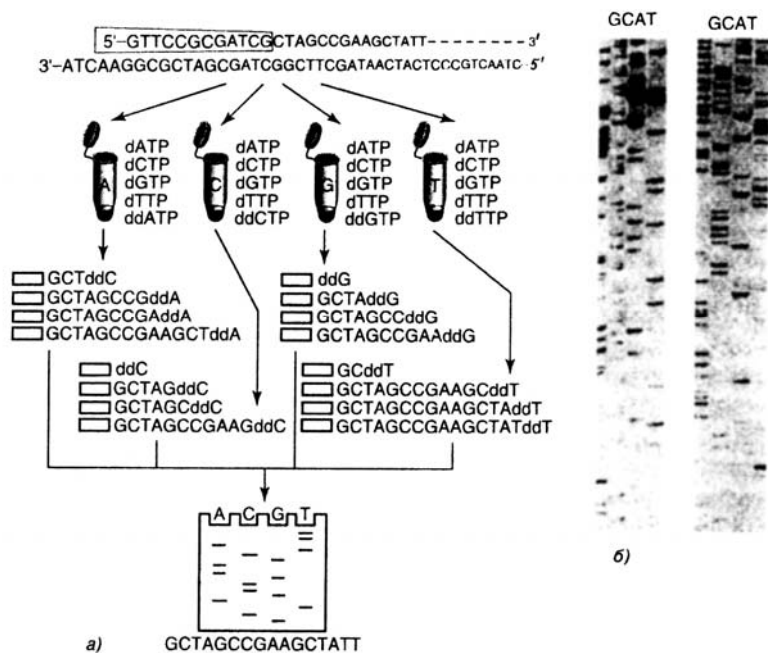


Рис. 37. Принцип определения нуклеотидной последовательности ДНК ферментативным методом Сэнгера (а) и фореограмма исследуемого фрагмента ДНК (б). (цит. по В.С. Шевелуха и др., 2003).

Полученные фрагменты разделяют в полиакриламидном геле с точностью до одного нуклеотида и по картине их распределения во всех четырех образцах восстанавливают нуклеотидную последовательность данного фрагмента ДНК.

Пиросеквенирование является одним из самых современных методов диагностики точковых мутаций. Прибор, позволяющий выполнять пиросеквенирование, компактен, прост и надежен в управлении, он разработан фирмой Pyrosequencing AB. Технология пиросеквенирования базируется на детекции светового сигнала, появляющегося в результате каскада ферментативных реакций при включении каждого следующего нуклеотида в одноцепочечную ДНК-матрицу. Данный способ позволяет проводить генотипирование и анализ мутаций в режиме реального времени, исключая использование рестриктаз. Принципиальная схема

пиросеквенирования показана на рисунке 38. (по Ларионовой П.В. с соавторами, 2005).

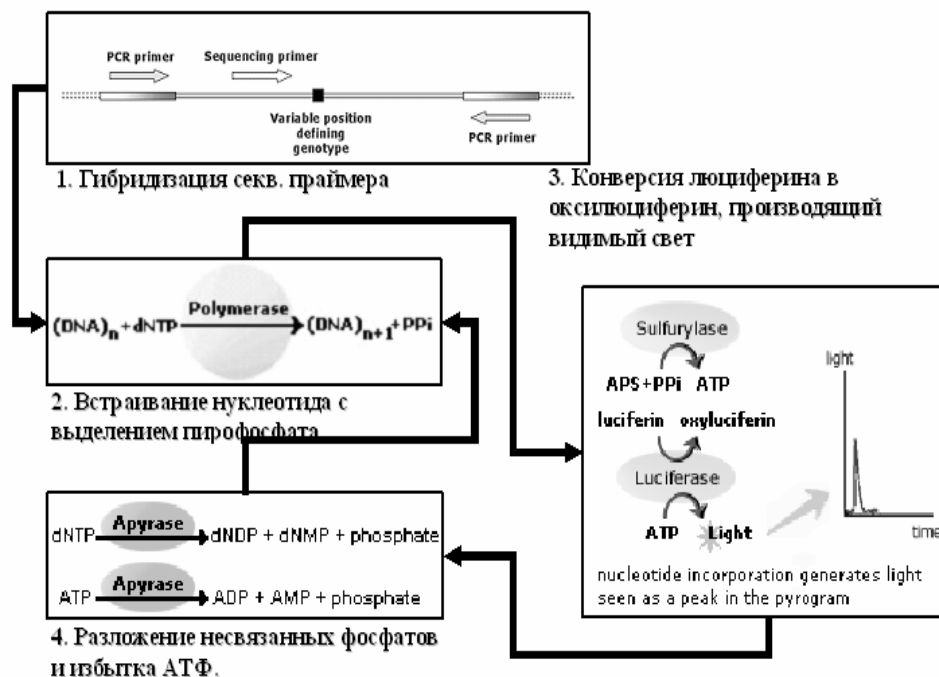


Рис. 38. Принципиальная схема пиросеквенирования нуклеотидных последовательностей.

На первом доприборном этапе работы проводится гибридизация секвенирующего праймера с амплифицированной в результате ПЦР ДНК-матрицей. При попадании в подготовленную пробу меченого нуклеотида, соответствующего последовательности ДНК в матрице, выделяется пирофосфат, который конверсирует люциферин в окслюциферин, производящий видимый свет, улавливаемый сенсорами прибора. На экране монитора в это время появляется пик характерной высоты (этапы 2, 3). При отсутствии в цепи ДНК поступившего нуклеотида апираза разлагает несвязанные фосфаты и избыток АТФ (этап 4). Цикл повторяется сначала с этапа 2.

В ходе процесса создается комплиментарная цепь ДНК и нуклеотидная последовательность детерминируется в виде сигнальных пиков на пираграмме.

К преимуществам метода относятся следующие (Ларионова П.В. и др., 2005).

- Анализ мутации в контексте нуклеотидной последовательности до и после SNP - гарантия контроля и защиты от ошибок;

- «Золотой стандарт» генетического анализа: представление непосредственно самой нуклеотидной последовательности, а не только «да/нет» сигнала → значительное упрощение интерпретации результатов и оперирования полученной информацией;

- Гибкость дизайна анализа: минимальные ограничения расположения праймеров → возможно изучение практически любого маркерного гена;

- Простота дизайна праймеров: не требуется модификации олигонуклеотидов. Необходимо стандартное биотинилирование одного из праймеров;

- Толерантность к мутациям: в отличие от методов, основанных на гибридизации, при пиросеквенировании определяется нуклеотидная последовательность независимо от возможного появления новой неожиданной мутации, что гарантирует от неверной интерпретации результатов в случае, например, ложных негативов в микробиологии;

- Получение информации о последовательности ДНК не только в качественном, но и количественном аспекте, что позволяет анализировать метилирование, гетерозиготность, ploидность, мульткопийные гены, объединенные участки ДНК, гематопозитический химеризм и смешанные генотипы в гетерогенных образцах;

- Возможность адаптации технологии под различные задачи рутинных клинико-лабораторных исследований;

- Обслуживание и техническая поддержка проекта: программное обеспечение – простота и удобство работы, интуитивно понятный

интерфейс, анализ полученных данных и представление результатов, как в графическом, так и в числовом выражении (цветовое маркирование степени доверительной вероятности, доступность в любое время информации о генотипах, частоте встречаемости аллелей и высоте пиков).

Вопросы для самопроверки по теме 6.

1. Генетический полиморфизм – объект ДНК-диагностики.
2. Получение и выделение образцов ДНК.
3. Секвенирование нуклеотидных последовательностей.
4. Пиросеквенирование.
5. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).
6. Полиморфизм длин рестриктных фрагментов.

Глава 7. Полиморфизм молочных белков

Методы выявления полиморфных вариантов: гель-электрофорез, ПЦР-ПДРФ. Полиморфизм казеинов. Полиморфизм лактоглобулинов. Полиморфизм молочных белков, качество молока и молочная продуктивность

С древних времен люди используют в пищу молоко некоторых сельскохозяйственных животных. Его потребляют как в натуральном виде, так и переработанное в различные продукты. Структура потребления молока и молочных продуктов определяется социальными, экономическими, географическими и другими параметрами. Увеличивается количество молока, перерабатываемое на молочные продукты, в том числе на белкомолочные (сыры и творог).

При производстве того или иного продукта молоко должно отвечать определенным технологическим требованиям. Так, при производстве сыров, особенно его твердых сортов, большое внимание уделяется составу молока. Содержание казеина в этом молоке должно быть не менее 75 %, а таких фракций, как α_s -Сп, (альфа s-казеин), β -Сп (бета-казеин, обозначаемый также CSN2) и κ -Сп или CSN3 (каппа-казеин) -91% от общего количества казеина. Молоко должно хорошо свертываться под действием сычужного фермента, быть термостабильным, обладать хорошими синергическими свойствами и высоким выходом конечной продукции.

Технологические свойства молока, как и все остальные признаки, зависят от паратипических и генотипических факторов. В селекционной работе с крупным рогатым скотом характеристика молока проводится в основном по удою и жиру, в то время как содержанию белка и его структуре не уделяется должного внимания. Вместе с тем эти показатели

являются ключевыми параметрами при производстве сыров и творога. Установлена тесная взаимосвязь между технологическими свойствами и биохимическим полиморфизмом белков молока. Например, содержание общего белка в коровьем молоке, его свертываемость и синергетические свойства взаимосвязаны с генотипом животного по локусу каппа-казеина (Зиновьева Н.А. и Эрнст Л. К., 2006). Взаимосвязь хозяйственно-полезных признаков с полиморфизмом белковых фракций обнаружена и у других видов сельскохозяйственных животных. Выявлено, что технологические свойства молока овец и коз в определенной степени зависят от генотипа по локусу α_{s1} -Сп (Стрекозов Н.И. и др., 1996; Иолчиев Б. С. и др., 2000). К сожалению, до сих пор к качеству молока этих животных в Российской Федерации не предъявляется особых требований, хотя в некоторых странах мира его широко используют при производстве сыров и йогуртов. По данным Международной молочной федерации в Греции 75% этих продуктов производятся с использованием молока мелкого рогатого скота (Alichanidis E., Polychroniadou A.; 1995).

В этой связи сложившаяся ситуация требует изменения в методах и параметрах селекции животных. К классическим методам селекции необходимо добавить новые подходы, связанные с достижениями генетики и биотехнологии животных. Используя полученную научную информацию для селекции животных можно за короткий срок получить желаемый результат.

Одним из первых методов оценки полиморфизма белков был метод их прямого электрофореза. Под электрофорезом понимается перемещение заряженных частиц в электролите под влиянием электрического поля. Метод электрофореза основан на различной скорости передвижения заряженных частиц в электрическом поле при заданной величине рН. В электрическом поле гетерогенная белковая масса при определенных условиях может разделиться на нескольких фракций.

В зависимости от природы используемых поддерживающих средств и аппаратуры существуют различные методы электрофореза. Наиболее эффективный результат получается при использовании в качестве материала-носителя полиакриламидного геля (ПААГ). Полиакриламидный гель при электрофорезе служит не только поддерживающей средой, но и сам принимает активное участие в процессе разделения веществ. Он обладает эффектом молекулярного сита. В полиакриламидном геле анализируемые вещества разделяются на компоненты не только в соответствии с зарядом составляющих элементов, но и с молекулярной массой и формой молекул.

В α_s -Сп-фракции отмечается высокое содержание полярных групп, поэтому ее электрофоретическая подвижность наибольшая из всех фракций. Эта фракция коровьего молока очень чувствительна к ионам кальция. α_s -Сп в свою очередь делится на следующие фракции: α_{s0} -Сп, α_{s1} -Сп, α_{s2} -Сп, α_{s0} -Сп имеет наивысшую электрофоретическую подвижность, α_{s1} -Сп по электрофоретической подвижности располагается после α_{s0} -Сп, затем следует α_{s2} -Сп (Иолчиев Б. С. и др., 2000).

Однако, точность оценки полиморфизма белков на основе их электрофореза недостаточна. В связи с этим в настоящее время основным методом анализа его выявления является ПЦР-ПДРФ. Ниже дана характеристика генетического полиморфизма основных белков молока, а также рассмотрены вопросы их ДНК-типирования на основе методических подходов, разработанных во Всероссийском НИИ животноводства.

Ген CSN3 имеет размер 13 т.п.о. и состоит из 5 экзонов общей длиной 850 п.о. и 4 интронов. Как и другие белки молока, CSN3 встречается в нескольких полиморфных вариантах, выявляемых посредством электрофоретического разделения казеиновой фракции в полиакриламидном геле. Причинами белкового полиморфизма являются

единичные аминокислотные замены (рис.39), приводящие к изменению электрофоретической подвижности.

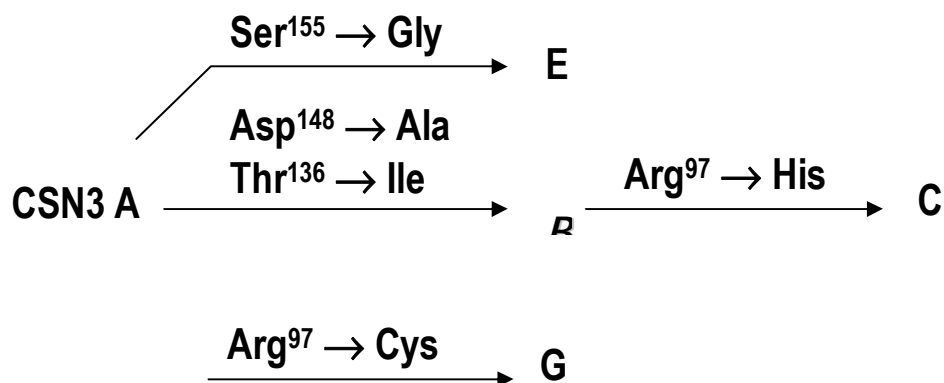


Рис. 39. Белковый полиморфизм CSN3 крупного рогатого скота.

Результаты проведенных нами в ходе выполнения работы популяционно-генетических исследований КРС по вариантам каппа-казеина представлены в таблице 5.

Таблица 5

**Частоты встречаемости аллелей и генотипов гена CSN3 в
исследованных популяциях крупного рогатого скота различных
пород.**

Число голов, n	Частоты аллелей						Частоты генотипов													
	A	B	E	F	C	G	AA	AB	BB	AC	CG	AF	GG	BC	AG	BE	AE	CC	CE	BF
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Черно-пестрая (1) "Дубровицы"																				
60	85,8	14,2					73,3	25,0	1,7											
Черно-пестрая (2) "Пойма", 1999 г.																				
27	83,3	13,0	3,7				66,7	25,9									7,4			
Черно-пестрая (3) "Пойма" 2000 г.																				
47	77,7	20,2	2,1				55,3	40,4									4,3			
Черно-пестрая (4) "Носовичи"																				

31		88,7	4,8				6,5	77,4	9,7					12,9						
Голштинская черно-пестрая, ГПЗ "Московский"*																				
66		87,9	10,6	1,5				80,3	12,1	14,6								3,0		
Ярославская ч/п																				
50		61,0	28,0			3,0	4,0	4,0	44,0	26,0	14,0	2,0	4,0	6,0	2,0	2,0				
Ярославская, Михайловский тип																				
50		68,0	25,0		1,0	4,0	2,0	40,0	50,0		4,0	4,0	2,0							
Бестужевская, ч/п																				
49		81,6	18,4					65,3	32,7	2,0										
Швицкая, молочный тип АО "Пригорское"																				
72		31,2	65,3		0,7	2,1	0,7	9,7	38,9	44,4	2,8			1,4	1,4				1,4	
Красная горбатовская (1), ГПЗ "Зименки", 1997-1999г.																				
187		52,4	38,3	7,2	1,6	0,5		30,0	35,8	16,0				1,1		4,3	9,1		ЕЕ-0,5	
Красная горбатовская (2), ГПЗ "Зименки", 2001 г.																				
79		61,4	26,6	8,8	1,3	1,9		38,0	35,4	5,0		1,3				6,3	10,1	1,3	ЕЕ-0,5	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Костромская чистопородная*																				
86		84,3	15,7					68,6	31,4											
Костромская голштинизированная*																				
192		81,3	16,4	1,0	1,3			67,2	26,0	2,1			0,5			0,5	1,6		2,1	
Айрширская*																				
98		71,2	9,3	14,4	5,1			49,2	13,6			3,4				1,7	27,1		FF-1,7	
Якутская																				
33		56,1	43,9					21,2	69,7	9,1										
Симментальская, ФГУП " Воронежское "																				
23		84,8	15,2					78,3	13	8,7										
Симментальская, СПК "Ленинский призыв"***																				
73		75,3	24,7					56,2	38,4	5,5										
Симментальская чистопородная (республика Башкирия)**																				
4		75,0	25,0					50,0	50,0											
Симментальская чистопородная (ООО "Новокриушанская")**																				
84		63,7	36,3					44,0	39,3	17,0										

Симментальская австрийской селекции (республика Башкирия)**													
43	84,9	15,1					72,1	25,6	2,3				
Симментальская австрийской селекции (ЗАО "Шестаковское")**													
113	77,9	22,1					62,8	30,0	7,2				
Симментальская голштинизированная (республика Башкирия)**													
34	91,2	8,8					82,4	17,6					
Симментальская улучшенная (ГПЗ XVII партсъезда)**													
100	75,5	24,5					55,0	41,0	4,0				

* проводилась диагностика аллелей А, В, Е, F;

** проводилась диагностика только аллелей А и В.

Необходимо отметить, что наибольшая частота встречаемости предпочтительного аллеля В, который, как известно из литературных источников, связан с более высоким содержанием белка в молоке, повышенным выходом сыра, лучшими коагуляционными свойствами, была отмечена в популяции коров швицкой породы и составила 65,3%. Также высокая частота встречаемости аллеля В наблюдается у животных якутской, красной горбатовской породы разных генераций и чистопородных коров ярославской породы – 43,9, 38,3-26,6 и 28% соответственно.

Наиболее генетически гетерогенными оказались животные красной горбатовской, швицкой и ярославской пород, у которых было выявлено по 5 из 6 диагностируемых аллелей гена CSN3.

Редкий аллель Е в гомозиготном проявлении был выявлен только у 1 животного красной горбатовской породы, а в гетерозиготе был обнаружен у животных айрширской, красной горбатовской и черно-пестрой (ГУПНО «Пойма») пород разных лет, а также у коров голштинской и костромской голштинизированной пород, с частотами 14,4%, 8,8-7,2%, 3,7-2,1%, 1,5% и 1,2% соответственно. Аллели С и F были идентифицированы

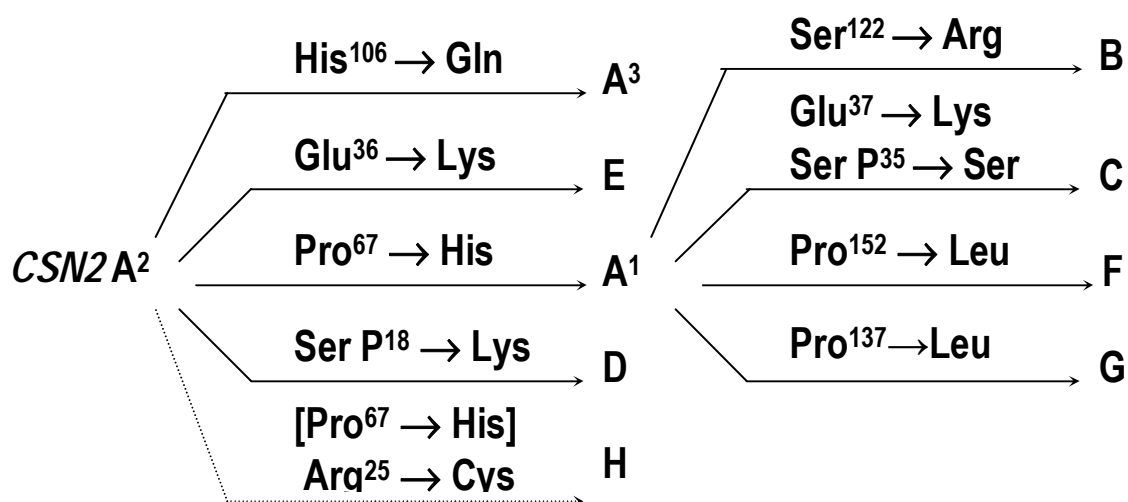
у коров швицкой, ярославской (чистопородных и Михайловского типа) и красной горбатовской пород. В айрширской породе выявлена максимальная частота встречаемости аллеля F ($q_F = 5,1\%$) среди исследованного поголовья КРС. Аллель G диагностировался у коров швицкой, ярославской (чистопородных и Михайловского типа) и одной из популяций черно-пестрой породы («Носовичи», Белоруссия). Наличие аллелей E и G у животных двух популяций черно-пестрой породы связано, по всей видимости, с использованием помесных быков-производителей.

Интерес для селекции коров молочных пород представляет получение животных с генотипом BB гена CSN3. Наибольшая частота встречаемости данного генотипа среди исследованных популяций отмечалась у коров бестужевской породы с менее 50% кровности голштинов (16,7%) и у чистопородных коров ярославской породы (14,0%).

В последние десятилетия в молочном скотоводстве для улучшения экстерьерно-конституциональных характеристик, обильномолочности, технологических свойств вымени широко использовались животные черно-пестрой голштинской породы. Принимая во внимание все преимущества голштинизации для улучшения отечественных пород, следует признать, что с генетической точки зрения использование голштинского скота может быть сопряжено с определенным снижением генетического разнообразия, потерей уникальных, свойственных отечественным породам генотипов, а также внесением в популяции наследственных дефектов.

Ген бета-казеина (CSN2) имеет длину 10338 п.н. и состоит из 9 экзонов (длиной 24-498 п.н.) и 8 интронов и кодирует пропептид длиной 224 аминокислоты. CSN2 состоит из 209 аминокислот и имеет молекулярную массу 23,983 кД. Первичная структура CSN2 была определена в начале 70-х годов. Содержание бета-казеина в молоке коров

составляет 46-61% от общего казеина. CSN2 характеризуется наличием 10 полиморфных вариантов – A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G и H (рис. 40).



Наиболее часто встречающимися являются A1, A2, B и C.

Рис. 40. Белковый полиморфизм CSN2 крупного рогатого скота.

Полиморфизм аллельных вариантов CSN2 обусловлен единичными нуклеотидными заменами. Аллель B отличается от других аллелей точковой мутацией C→G в позиции 8267 в экзоне 7 (генный банк M55158), приводящей к аминокислотной замене Ser→Arg в позиции 122 белковой последовательности.

В таблице 6 обобщены данные о частотах встречаемости аллелей и генотипов гена CSN2 в исследованных популяциях крупного рогатого скота.

Таблица 6

Частоты встречаемости аллелей и генотипов гена CSN2 в исследованных популяциях крупного рогатого скота.

Число голов, n	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
	A	B	AA	AB	BB
Ярославская, чистопородная					
50	64,0	36,0	46,0	36,0	18,0
Ярославская, Михайловский тип					

50	71,0	29,0	50,0	42,0	8,0
Айрширская, чистопородная					
61	98,4	1,6	96,7	3,3	
Костромская чистопородная					
80	66,9	33,1	45,0	43,7	11,3
Костромская голштинизированная					
196	87,5	12,5	82,7	9,7	7,6
Голштинская черно-пестрая					
81	56,8	43,2	48,1	17,3	34,6
Швицкая немецкая					
10	65,0	35,0	30,0	70,0	0,0
Швицкая отечественной селекции					
27	61,1	38,9	44,4	33,3	22,3
Сычевская, чистопородная					
25	76,0	24,0	72,0	8,0	20,0
Сычевская голштинизированная					
22	68,2	31,8	68,2	0,0	31,8
Бестужевская чистопородная					
49	85,7	14,3	79,6	12,2	8,2
Бестужевская голштинизированная					
48	60,3	39,7	41,2	38,2	20,6
Симментальская чистопородная (республика Башкирия)					
5	80,0	20,0	60,0	40,0	0,0
Симментальская чистопородная (ООО «Новокриушанская»)					
85	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0
Симментальская австрийской селекции (республика Башкирия)					
48	62,5	37,5	54,2	16,6	29,2
Симментальская австрийской селекции (ЗАО «Шестаковское»)					
115	96,5	3,5	94,8	3,5	1,7
Симментальская голштинизированная (республика Башкирия)					
34	60,3	39,7	41,2	38,2	20,6
Симментальская улучшенная (ГПЗ XVII партсъезда)					
100	98,5	1,5	97,0	3,0	0,0

Можно отметить, что частоты встречаемости аллелей и генотипов в исследованных популяциях различных пород крупного рогатого скота значительно различались. Вместе с тем следует отметить, что во всех исследованных популяциях скота частота аллеля А была выше по сравнению с частотой встречаемости аллеля В и варьировала от 56,8% у

коров голштинской черно-пестрой породы до 98,4% у коров айширской породы. Доля гомозиготных генотипов АА во всех исследованных популяциях была выше по сравнению с частотой встречаемости генотипа ВВ и варьировала от 30% у коров швицкой породы немецкой селекции до 96,8% у коров айширской породы.

У голштинизированных животных сычевской и бестужевской пород наблюдается уменьшение частоты встречаемости аллеля А по сравнению с чистопородными животными. Коровы Михайловского типа ярославской породы и голштинизированная популяция бестужевской породы, наоборот, характеризуются несколько более высокими частотами встречаемости аллеля А по сравнению с соответствующими чистопородными популяциями.

Ген LALBA расположен на хромосоме 5 q21 и имеет размер 2 т.п.о. и состоит из 4 экзонов и 3 интронов. В настоящее время известно 3 аллельных варианта данного гена – А, В и С. Анализ последовательностей, имеющихся в генном банке, показал, что для разработки тест-системы диагностики полиморфизма гена LALBA следует использовать нуклеотидный полиморфизм в 5'-фланкирующей области гена LALBA.

В таблице 7 представлены результаты анализа животных различных пород по вариантам LALBA.

Таблица 7

Частоты встречаемости аллелей и генотипов гена LALBA в исследованных популяциях крупного рогатого скота

Число голов, n	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
	А	В	АА	АВ	ВВ
1	2	3	4	5	6
Черно-пестрая (1) «Дубровицы»					
59	65,3	34,7	50,8	28,8	20,4
Черно-пестрая (3) «Пойма»					
25	46,0	54,0	12,0	68,0	20,0

Черно-пестрая (4) «Носовичи»					
20	82,5	17,5	65,0	35,0	0,0
Ярославская чистопородная					
50	75,0	25,0	60,0	30,0	10,0
Ярославская, Михайловский тип					
50	73,0	27,0	58,0	30,0	12,0
Бестужевская чистопородная					
49	82,7	17,3	69,4	26,5	4,1
Бестужевская голштиinizированная					
48	93,8	6,2	89,6	8,3	2,1
Красная горбатовская (1), ГПЗ «Зименки», 1997-1999 г.					
103	52,9	47,1	29,1	47,6	23,3
Красная горбатовская (2), ГПЗ «Зименки», 2001 г.					
23	84,8	15,2	78,3	13,0	8,7
Айрширская					
61	75,4	24,6	50,8	49,2	0,0
Костромская чистопородная					
72	56,9	40,3	26,4	61,1	9,7
Костромская голштиinizированная					
210	66,0	34,0	37,6	56,7	5,7
Голштинская черно-пестрая					
73	68,8	31,2	48,6	40,3	11,1
Швицкая немецкой селекции					
19	50,0	50,0	15,8	68,4	15,8
Швицкая отечественной селекции					
29	48,3	51,7	10,3	75,9	13,8
Сычевская чистопородная					
21	78,6	21,4	61,9	33,3	4,8
Сычевская голштиinizированная					
14	67,9	32,1	35,7	64,3	0,0
Симментальская чистопородная (республика Башкирия)					
5	60,0	40,0	40,0	40,0	20,0
Симментальская чистопородная (ООО «Новокриушанская»)					
85	80,0	20,0	60,0	40,0	0,0
Симментальская австрийской селекции (республика Башкирия)					
46	88,0	12,0	80,4	15,2	4,4
Симментальская австрийской селекции (ЗАО «Шестаковское»)					
115	72,6	27,4	52,2	40,9	6,9
Симментальская голштиinizированная (республика Башкирия)					
37	70,3	29,7	45,9	48,7	5,4
Симментальская улучшенная (ГПЗ XVII партсъезда)					
100	87,5	12,5	85,0	5,0	10,0

Наибольшая частота встречаемости аллеля А отмечается у животных бестужевской (82,6-93,8%), красной горбатовской (84,8%) и черно-пестрой (82,5%) пород. Наименьшей частотой встречаемости аллеля А (от 48,3 до 50,0%) характеризовались животные швицкой породы.

Анализ частот встречаемости генотипов гена LALBA показывает, что практически в большинстве исследованных популяций крупного рогатого скота отмечается наибольшая частота встречаемости генотипа AA. Максимальная частота данного генотипа выявлена у коров бестужевской породы с прилитием крови голштинов (89,6%). Наименьшая доля генотипа AA (10,3-15,8%) выявлена у коров швицкой породы.

Ген бета-лактоглобулина (BLG) имеет размер 4662 п.о. и состоит из 7 экзонов и 6 интронов. В настоящее время известно 10 генетически обусловленных аллельных вариантов гена BLG – А, В, С, D, E, F, G, I, J, W (рис. 41). Наиболее часто встречаются четыре аллеля – А, В, С и D, которые отличаются друг от друга аминокислотным составом.

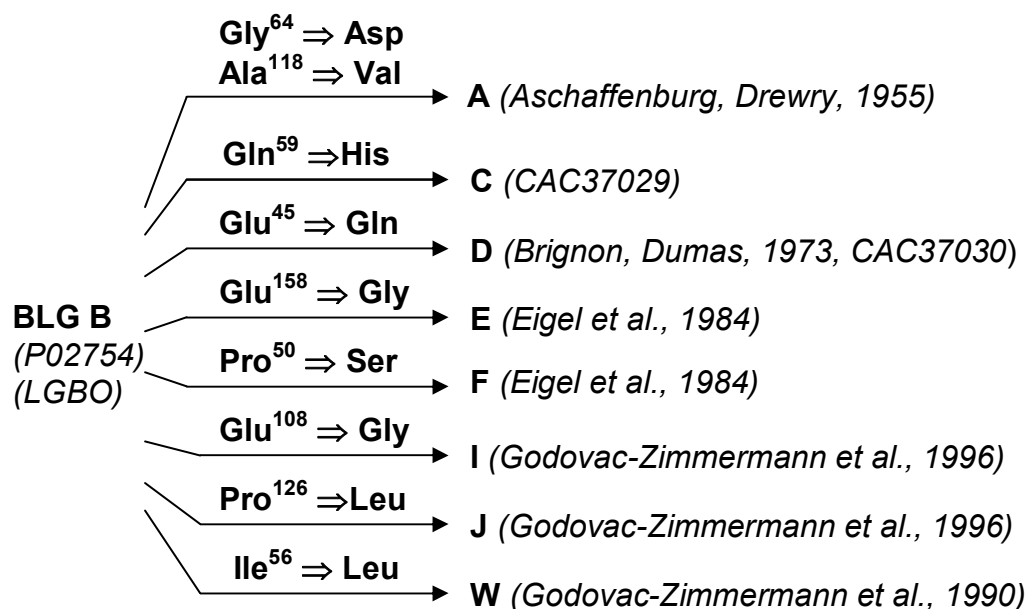


Рис. 41. Белковый полиморфизм BLG крупного рогатого скота.

Исследованием последовательностей аллельных вариантов гена BLG крупного рогатого скота, полученных из генного банка, было установлено, что его полиморфизм обусловлен точковыми мутациями (базовыми заменами) в позициях 2206 в экзоне I, а также в позициях 3065 и 3109 экзона II (генный банк № Z48305). В результате этого редкий вариант D отличается от вариантов A, B и C аминокислотной заменой Glu→Gln в позиции 45. Отличие варианта B выявляется в позиции 64, где в результате мутации второго основания триплета GAT→GGT происходит замена Asp→Gly. Вариант C характеризуется заменой последнего основания в триплете CAG на CAC, что влечет за собой образование His вместо Gln в позиции 59 BLG.

Таблица 8

Частоты встречаемости аллелей и генотипов гена BLG
в исследованных популяциях крупного рогатого скота.

Число голов, n	Частоты аллелей				Частоты генотипов					
	A	B	C	D	AA	AB	BB	BC	AC	CC
Красная горбатовская порода, ГУП “Зименки”, Владимирской обл. 1997-1999 гг.(n=132)										
n					5	55	71	1		
%	24,6	75,0	0,4	-	3,8	41,7	53,8	0,8	-	
Швицкая порода, молочный тип, АО “Пригорское”, Смоленской обл. (n=16)										
n					2	7	5		2	
%	40,6	53,1	6,3	-	12,5	43,7	31,3	-	12,5	
Якутская порода, Республика Саха (Якутия) (n=32)										
n					6	21	5			

%	51,6	48,4	-	-	18,8	65,6	15,6	-	-	
Костромская порода, Ивановской обл. (n=78)										
n						55	6	1	13	3
%	43,6	43,6	12,8		-	70,5	7,7	1,3	16,7	3,8
Черно-пестрая порода (2), ГУП “ПНО Пойма”, Московской обл. (n=25)										
n					4	15	5		1	
%	48,0	50,0	2,0		16,0	60,0	20,0	-	4,0	
Черно-пестрая порода (1), ОПХ “Дубровицы”, Московской обл. (n=43)										
n						29	14			
%	33,7	66,3			-	67,4	32,6	-	-	
Черно-пестрая порода (4), “Носовичи”, (n=48)										
n						36	12			
%	37,5	62,5			-	75,0	25,0	-	-	

Как показано в таблице 8, аллели А и В были выявлены во всех породах, при этом частота встречаемости аллеля А варьировала от 24,6% у коров красной горбатовской породы до 51,6% у коров якутской породы.

Частота генотипа АА, коррелирующего с повышенным содержанием белка в молоке, была наивысшей у якутского скота (18,75%). В двух из трех исследованных популяций черно-пестрого скота и у животных костромской породы данный генотип диагностирован не был. Частота встречаемости гомозиготного генотипа ВВ была максимальной у коров швицкой породы (31,25%), а минимальной – у животных якутской породы (15,62%).

В четырех породах крупного рогатого скота среди варианта В был выявлен аллель С гена BLG. Его аллельные частоты колебались от $q_C = 0,4\%$ у коров красной горбатовской породы до $q_C = 12,8\%$ у коров костромской породы. Черно-пестрая и швицкая породы занимали промежуточное положение ($q_C = 2,0 - 6,3\%$). В красной горбатовской породе аллель С встречался в сочетании с аллелем В и частота генотипа

BC составила 0,8%. Среди животных черно-пестрой породы и молочного типа швицкого скота аллель С всегда встречался в сочетании с А аллелем, и частота генотипа АС находилась в пределах 4,0-12,5% соответственно. В костромской породе, кроме гетерозиготных вариантов АС и ВС, выявлено гомозиготное проявление аллеля С с частотой генотипа СС равного 4%.

Две популяции черно-пестрого скота и популяция скота якутской породы оказались наиболее однородными, с наличием двух основных аллелей гена бета-лактоглобулина и с преобладающим количеством АВ гетерозигот (АВ=65,6-75,0%). Аллель С в данных популяциях выявлен не был. У всех протестированных животных различных пород крупного рогатого скота России отсутствовал редкий аллель D.

Вопросы для самопроверки по теме 7.

1. Факторы, определяющие качество молока.
2. Связь полиморфизма молочных белков с технологическими свойствами молока.
3. Методы выявления полиморфизма молочных белков.
4. ДНК-полиморфизм гена CSN3.
5. ДНК-полиморфизм гена CSN2.
6. ДНК-полиморфизм гена LALBA.
7. ДНК-полиморфизм гена BLG.
8. Породные различия в полиморфизме молочных белков.

Глава 8. Гены, влияющие на репродуктивную функцию у животных

Значение многоплодия в селекции. Функциональные кандидаты на роль маркеров многоплодия у свиней. Полиморфизм генов эстрогенового и пролактинового рецепторов у свиней. BMPR-1R и BMP15 - гены плодовитости у овец. Другие гены-кандидаты для повышения многоплодия овец. Использование полиморфных вариантов главных генов плодовитости в селекции

Одним из критериев увеличения производства мяса и эффективности селекции свиней является повышение продуктивности свиноматок. Учитывая, что продуктивность свиноматки рассчитывается как число живых поросят, полученных от свиноматки в год, то использование в качестве родителей свиней, обладающих повышенным многоплодием, позволит достигнуть желаемого уровня выхода продукции за счет использования меньшего числа родительских пар.

Известно, что прямая селекция свиней на повышение многоплодия характеризуется низкой эффективностью, с одной стороны, вследствие большого влияния на проявление данного признака негенетических факторов (коэффициент наследования многоплодия у свиней, то есть влияние генотипа на фенотипическую изменчивость признака составляет лишь около 0,1), с другой стороны, ограниченного полем его проявления.

Эффективным методом повышения многоплодия свиноматок является использование ДНК-маркеров плодовитости. В настоящее время выявлен целый ряд таких маркеров, в большей или меньшей степени оказывающих влияние на многоплодие свиноматок

В 90-е годы XX века M.F. Rotschild, T.H. Short начали поиски генов, определяющих генетические различия по воспроизводительным качествам у свиней. Учитывая то, что эстрогены оказывают большое влияние на организм самки, вызывая значительные изменения обмена веществ,

стимулируя рост яйцеводов, матки и влагалища, пролиферативные изменения эндометрия, развитие вторичных половых признаков и проявление половых рефлексов, предположили, что изучение структуры генов, кодирующих эти гормоны, даст ключ к решению проблемы. В настоящее время у свиней известен ряд генов представляющих интерес при селекции на многоплодие. В табл. 9 приведен перечень генов кандидатов, влияющих на репродуктивную функцию животных.

Таблица 9

Гены-кандидаты, связанные с репродуктивной функцией животных
(по Зиновьевой Н.А., Эрнсту Л.К., 2004)

Вид животных	Ген	Хромосома	Автор
Свиньи	Рецептор ретиноловой кислоты γ^2 (RARG)	5	Messer et al., 96a Messer et al., 96b
	Фолликулостимулирующий гормон, β – субъединица (FSGB)	2	Zhao et al., 98 Li et al., 98
	Рецептор фолликулостимулирующего гормона (FSHR)	3	
	Рецептор гонадотропин-релизинг гормона (GNRHR)	3	
	Рецептор лютеинизирующего гормона / хоригонадотропина (LH-CGR)	3	
	Коактиватор 1 ядерных рецепторов (NCOA1)	3	Spencer et al., 1997; Nephew et al., 2000
	Ретинол связывающий белок 4 (RBP4)	14	Messer et al., 96c Rothschild et al., 2000
	Эстрогеновый рецептор (ESR)	1	Rothschild et al., 96
	Рецептор пролактина (PRLR)	16	Vincent et al., 96
	Остеопонтин (OPN)	8	
Овцы	Ген рецептора морфогенетического костного белка (BMPR-IB)		Mulsant et al., 2001, Lecerf et al., 2002
	Ген костного морфогенетического белка 15 (BMP15)	X	Galloway et al., 2000, Davis et al., 2001

Rothschild M. с соавторами (1996) выявили полиморфизм гена эстрогенового рецептора (ESR) свиней. Оказалось, что аллельные

варианты маркерного гена различаются полиморфизмом длины фрагмента рестрикции (PFLP) (Зиновьева Н.А., Лобан, 2004; Лобан Н.А., 2004; Chen K.F., 2000; Steinheuer R., 2001). Открытие полиморфизма в гене эстрогенового рецептора свиньи дало возможность использовать его в качестве генетического маркера многоплодия и позволило связать наличие определенного аллельного варианта в генотипе свиньи по гену ESR с увеличенным размером гнезда (Isler B.J., 1999).

Было показано, что гомозиготные матки с генотипом ВВ опытной популяции (с 50% крови китайской породы свиней мейшан) имели размер гнезда в первый опорос на 2,3 поросенка больше, а в среднем по всем опоросам на 1,5 поросенка больше, чем животные с генотипом АА ($p < 0,001$). Кроме того, аллель В, который по всей видимости происходит от китайской породы мейшан, был также идентифицирован в коммерческих североамериканских породах свиней, происходящих от крупной белой. При этом животные с генотипом ВВ превосходили по размеру гнезда животных с генотипом АА по первому опоросу на 1,2 поросенка, а в среднем по всем опоросам – на 0,9 поросенка ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно). Однако пока не ясна физиологическая роль ESR в контроле размера гнезда.

С целью внедрения ДНК-диагностики многоплодия свиноматок, основанной на использовании в качестве маркера гена ESR, были выполнены исследования частот встречаемости аллелей и генотипов данного гена (рис. 42), а также изучено влияние генотипов на многоплодие свиноматок различных пород, разводимых в сельхозпредприятиях России (Зиновьева Н.А. и др., 2005).

Как показано на рисунке 42, прослеживается четкая тенденция связи частот встречаемости аллелей гена ESR с породной принадлежностью свиней: у животных пород сального и мясосального направлений продуктивности частота аллеля В значительно выше по сравнению с

данным показателем у свиней мясных и беконных пород. У свиней трех пород канадской селекции, аллель В выявлен не был. Отсутствие аллеля В в популяциях свиней канадской селекции вполне объяснимо, так как по данным Rothschild с соавторами [1996] данный аллель не был идентифицирован ни у одной из 10-и исследованных ими североамериканских пород свиней. Отсутствие полиморфизма гена ESR не позволяет использовать данный маркер в селекции, направленной на повышение многоплодия, у свиней, завозимых из-за рубежа.

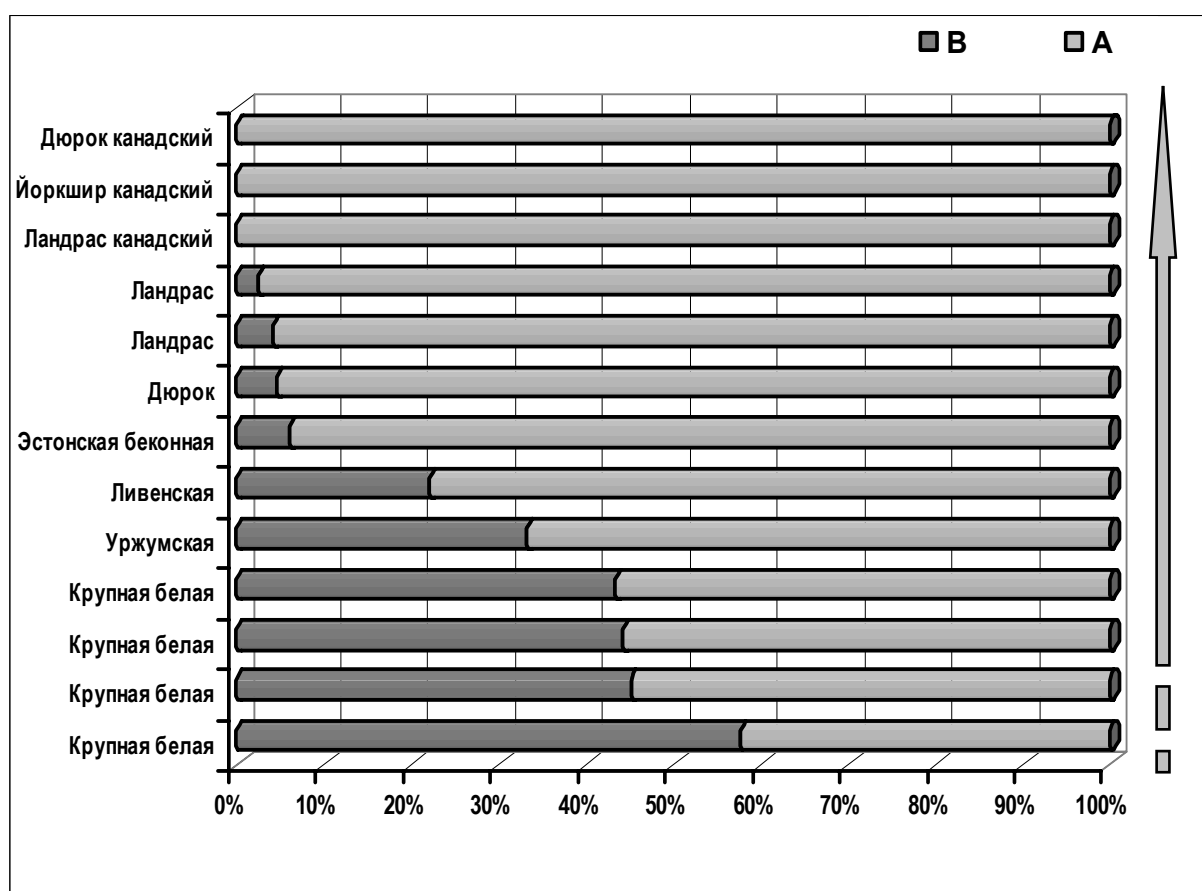


Рис. 42. Распределение аллелей гена ESR у свиней различных пород. Данные представлены в порядке уменьшения частоты встречаемости желательного аллеля В гена ESR.

Однако следует отметить, что увеличение генетического потенциала многоплодия не ограничено только геном ESR. Как будет показано ниже, для повышения многоплодия свиноматок в стадах, в которых отсутствует

желательный аллель В гена ESR, могут с успехом применяться другие маркеры плодовитости.

Таблица 10

**Влияние генотипов гена ESR на многоплодие свиноматок
различных пород.**

Порода	Разница в многоплодии* свиноматок с генотипами АВ и ВВ по сравнению с генотипом АА	
	Генотип АВ	Генотип ВВ
Крупная белая, 1	+0,35	+0,65
Крупная белая, 2	+0,41	+1,39
Дюрок	+0,66	**
Уржумская	+0,59	+1,29

* многоплодие, рассчитанное в среднем по 3-4 опоросам.

** генотип выявлен не был.

Как следует из данных таблицы 10, свиноматки с желательным генотипом ВВ превосходили животных с генотипом АА в среднем по 3-4 опоросам в зависимости от породы на 0,65-1,39 поросенка на опорос. В случае гетерозиготного генотипа превосходство над генотипом АА оставалось существенным и составляло 0,35-0,66 поросенка на опорос. Выявленные закономерности сохранялись и при исследовании числа живых поросят при рождении в группах свиноматок с различными генотипами по ESR.

Приведенные выше данные свидетельствуют о достоверном влиянии генотипа ESR на многоплодие свиней различных пород, что позволяет рекомендовать данный маркер для использования в селекции свиней на повышенное многоплодие, как в пелемпредприятиях (чистопородное

разведение), так и в товарных хозяйствах (скрещивание). Учитывая, что при скрещивании свиней в качестве материнских пород зачастую используются свиньи мясных и беконных пород, которые, как было показано выше, характеризуются низкими частотами встречаемости связанного с повышенным многоплодием аллеля В гена ESR, проведение ДНК-диагностики гена позволит существенно повысить многоплодие материнских пород и помесей первого поколения и, как следствие, увеличить эффективность производства свинины.

Следует сказать отдельно несколько слов о породе ландрас. При исследовании влияния полиморфизма гена ESR на многоплодие у свиноматок этой породы в ряде сельхозпредприятий России нами была выявлена обратная зависимость. Животные с генотипом AA гена ESR достоверно превосходили аналогов с генотипом BB. Эти данные согласуются с результатами, полученными зарубежными авторами при исследовании влияния на многоплодие свиноматок генотипов другого маркера - FSHR. Было установлена отличная от других пород обратная связь между генотипами FSHR и многоплодием свиноматок породы ландрас. По всей видимости, действие аллелей некоторых генов плодовитости проявляется по-разному в окружении аллелей, свойственных определенным породам. Поэтому при внедрении ДНК-диагностики плодовитости необходимо учитывать породную принадлежность животных. Применительно к гену ESR следует отметить, что прежде чем рекомендовать внедрение ДНК-диагностики многоплодия на основе ESR в селекцию, необходимо предварительно провести экспериментальные исследования, направленные на выявление связи между генотипами ESR и многоплодием на животных каждой конкретной породы.

Задача повышения многоплодия свиноматок не всегда может быть решена за счет использования маркера ESR. Так, например, использование дополнительных маркеров плодовитости, в первую очередь, может быть рекомендовано в стадах животных, в которых отсутствует желательный аллель В гена ESR или его частота очень низкая (свиньи зарубежных пород, а также свиньи мясных и беконных пород отечественной селекции), а также в стадах, в которых максимальный генетический потенциал плодовитости с использованием гена ESR.

В 1995 году был обнаружен полиморфизм длины структурного гена, расположенного на второй хромосоме и отвечающего за бета-субъединицу фолликулостимулирующего гормона. FSHB – ген б-субъединицы фолликуло-стимулирующего гормона. FSH стимулирует созревание фолликулов и, тем самым влияет, на многоплодие. С повышенным многоплодием связан вариант В гена. Полиморфизм вызван вставкой нуклеотидов (ретропозон), содержащих 292 основания (Li Ning et al., 2001). Назначение его остается неясным. По данным Li Ning et al. (2001) ретропозон расположен на границе интрона 1 и экзона 2 гена FSH бета-субъединицы. Согласно результатам Zao Y и Li Ning (2001), генотип животных классифицировался тремя видами: два гомозиготных варианта AA, BB, и АВ гетерозиготный вариант.

Как показано на рисунке 43, три из четырех исследованных пород свиней отечественной селекции оказались гомогенными по гену FSHB и имели желательный генотип BB. Доля желательного аллеля В у свиней аналогичных пород канадской селекции была несколько ниже и варьировала в зависимости от породы от 83,9 до 97,2%. У свиней крупной белой породы частота аллеля В составляла 97,2%.

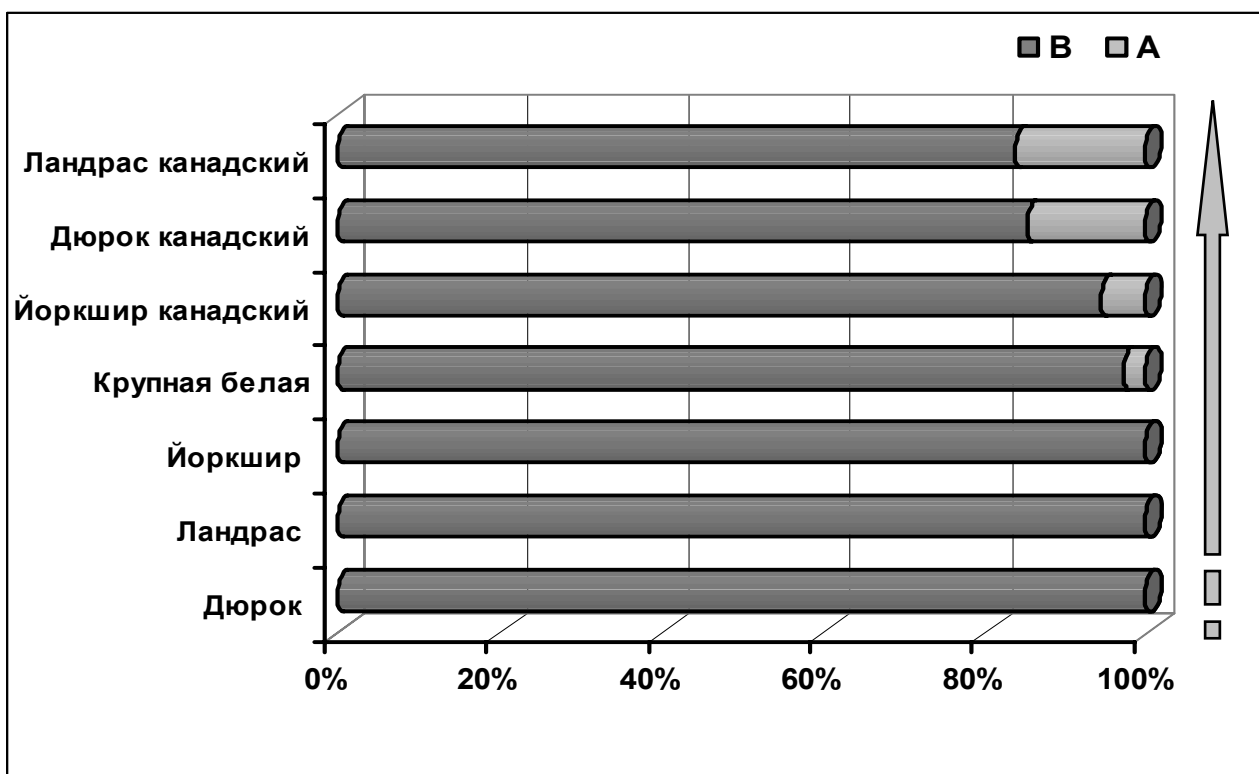


Рис. 43. Частоты встречаемости аллелей и генотипов гена FSHB у свиней различных пород. Данные представлены в порядке уменьшения частоты встречаемости желательного аллеля В гена FSHB.

Исследование влияния генотипов гена FSHB на многоплодие было выполнено на свиноматках ООО «Троснянский бекон» Орловской области и показало стойкое положительное влияние аллеля В гена FSHB, как на число поросят при рождении, так и на число живых поросят .

Меньшие различия между генотипами у свиней породы йоркшир могут быть обусловлены обратным действием аллелей других маркеров плодовитости. Подтверждением данной гипотезы служит тот факт, что в случае генетической однородности изучаемых групп по другим маркерам плодовитости – ESR и NCOA1 (все животные имеют генотипы AA / A1A1) различия в многоплодии свиноматок с разными генотипами по FSHB были более существенные (табл. 11).

Плодовитость свиней трех пород канадской селекции в зависимости от генотипа по FSHB (1-й опорос)

Сравниваемые генотипы	Разница в показателях			
	Дюрок канадский		Йоркшир канадский	
	Число поросят при рождении	Число живых поросят	Число поросят при рождении	Число живых поросят
BB к AB* **	+1,89	+1,96	+0,31	+0,30
BB к AB***	+2,17	+2,36	+1,47	+2,25

* *цит. по Адаменко и др., 2005*

** *с учетом генотипа по ESR (все свиноматки имеют генотип AA);*

*** *с учетом генотипов по ESR и NCOA1 (все свиноматки имеют генотипы AA / A1A1).*

Хотя полученные результаты, несомненно, требуют подтверждения на большем поголовье животных, уже сейчас можно прогнозировать, что ген FSHB может рассматриваться в качестве маркера плодовитости в программах разведения свиней, направленных на селекцию линий, обладающих повышенным многоплодием.

Скорого внедрения в свиноводство России, по нашему мнению, заслуживает ген коактиватора 1 ядерных рецепторов (NCOA1), известный также под названием коактиватора 1 стероидных рецепторов. Комплекс NCOA1 взаимодействует с эстрогеновым рецептором, стимулируя его транскрипционную активность и обуславливая, тем самым, последующий физиологический ответ. Проведенный Melville с соавторами (2002) анализ помесных свиней пород крупная белая и мэйшан показал превосходство свиноматок с генотипом A1A1 над животными с генотипом A2A2 на 1,82

поросенка на опорос. Свиноматки с гетерозиготным генотипом превосходили аналогов с генотипом А2А2 на 0,90 поросенка на опорос.

Результаты исследований О.В. Костюниной, Н.А. Зиновьевой с соавторами (2005) показали, что свиноматки породы йоркшир канадской селекции с генотипом А1А1 превосходили животных с гетерозиготным генотипом как по числу поросят при рождении (+1,00 поросенка на опорос), так и по числу живых поросят (+1,32 поросенка на опорос). Свиноматки крупной белой породы с генотипами А1А1 и А1А2 достоверно превосходили по числу поросят при рождении животных с генотипом А2А2 соответственно на 2,37 и 2,50 поросенка на опорос, а по числу живых поросят, соответственно, на 2,01 и 2,25 поросенка на опорос.

Wilkie V.L. (2005) сообщил о потенциальном QTL на хромосоме 8, влияющем на количество овулировавших яйцеклеток и живую массу поросенка. Rathje N.A. (1997) подтвердил наличие на 8 хромосоме, на некотором расстоянии от указанного Wilkie местоположения QTL, наличие полигенных локусов влияющих на число овулировавших яйцеклеток. Было установлено влияние QTL, описанного Rathje T.A. (1997), на массу поросенка. QTL повышенного числа овуляций представляет интерес в связи с тем, что располагается на хромосоме аналогично гену фертильности *Booroola* у овец. Примечательно, что в той же области 8 хромосомы находится микросателлитный маркер остеопонтина *OPN*, достоверность влияния на размер гнезда которого подтверждена Steinheuer R. (2001) в ходе исследования коммерческих линий свиней.

На 7-й хромосоме находится главный комплекс генов гистосовместимости (*major histocompatibility complex genes*). Были предложены также QTL репродуктивных признаков, располагающиеся на 4, 7, 13 и 15 хромосомах (Rothschild et al. 1994, 1996). В работах Гладырь Е.А., Арсиенко Р.Ю. и других (2001, 2003) была показана связь репродуктивных свойств с другими маркерными генами: *RARG* (γ -

рецептор ретиноловой кислоты) и MTNRIA (мелатониновый рецептор 1A), EGF (эпидермальный фактор роста).

Исследователи штата Айова сообщали о достоверном влиянии гена рецептора пролактина (PRLR, рецептор пролактина) на размер гнезда, подтвержденном по меньшей мере в двух исследованиях.

Есть информация о маркере многоплодия RBP4 (ретинол, связывающий белок 4), связанного с увеличением числа поросят на опорос в среднем на 0,25гол. (Rothschild M.F., 1994, Linville R. C., Pomp D., год , Short T.N. et al. 1997).

Генетические маркеры многоплодия овец.

Поиск и последующее использование генетических маркеров, напрямую или косвенно связанных с многоплодием овец, в последние годы приобретает большое значение в селекции, так как селекция на плодовитость по фенотипу и у овец характеризуется низкой эффективностью, с одной стороны, из-за низкой наследуемости признака, с другой стороны, из-за ограниченного полем его проявления. Феномен повышенного многоплодия некоторых пород овец активно изучается многими лабораториями мира.

Главным считается ген, обуславливающий различия между гомозиготными генотипами не менее $0,5\sigma$. По отношению к степени овуляции это означает, что единичная копия желательного аллеля такого главного гена увеличивает степень овуляции более чем на 0,2.

Существование главных генов плодовитости у овец впервые было доказано у мериносов Борола и овец породы Инвердейл. Позднее аналогичная генетическая структура была выявлена и у овец других пород в Новой Зеландии, Исландии, Франции, Бангладеш, Индонезии и Польше.

В 1980 году на выставке мериносов в Австралии были представлены данные об исключительной плодовитости овец Борола, что, по мнению авторов, является результатом действия одного главного гена или тесно

сцепленной группы генов, влияющих на степень овуляции (Piper и Bindon, 1980). Подтверждение этой гипотезы было получено двумя десятилетиями позже, когда три группы исследователей одновременно показали, что наследование плодовитости, наблюдаемое у мериносов Борола, является результатом точечной мутации (Mulsant et al., 2001, Lecerf et al., 2002, Wilson et al., 2001). Практически одновременно было доказано существование другого главного гена, мутация в котором ответственна за высокую плодовитость овец породы Инвердейл (Galloway et al., 2000).

По всей видимости, сегрегирующие главные гены плодовитости имеются и в целом ряде других многоплодных пород овец, таких как кембриджская (*FecC*), тока (*FecI*), яванезская (*FecJ*), олкуска, белклеяр, лакауна, вудландская (*FecX2*) (Davis, 2005). Данные об открытых и потенциальных главных генах плодовитости овец с указанием действия аллелей на степень овуляции и размер гнезда суммированы в таблице 12.

Австралийские мериносы борола – одна из четырех пород (романовская, финские овцы и д’ман), характеризующаяся исключительной плодовитостью. Как уже отмечалось выше, сегрегационный анализ наследования повышенной плодовитости показал наличие у них главного гена (*FecB*), влияющего на размер гнезда (Davis et al., 1982, Piper, Bindon, 1980).

FecB – аутосомальный ген, локализованный на хромосоме 6 (Montgomery et al., 1994). Мутация плодовитости Борола (*FecB^B*) оказывает кодоминантное действие на степень овуляции и неполное доминантное действие на размер гнезда. Piper с соавторами (1985) установили, что влияние *FecB* на степень овуляции и плодовитость аддитивное, и что каждая копия *FecB^B* увеличивает степень овуляции на 1,5, а плодовитость – на 1,5 ягненка за окот. Согласно мультипликативной модели Davis с соавторами (1999), каждая копия *FecB* увеличивает степень овуляции на 90%.

Открытые и потенциальные главные гены плодовитости овец

Ген	Название	Аллель	Хр.	Эффект на степень овуляции (OR) и размер гнезда (LS)	Исходная порода
BMPR-IB	Борола	<i>FecB^B</i>	6	B+: OR +1,5; LS +1,0 BB: OR +3,0; LS +1,5	Мериносы, гароле и яванезская
BMP15	Инвердэйл	<i>FecX^I</i>	X	I+: OR +1,0; LS +0,6 II: бесплодие (зачаточные яичники)	Ромни-марш
BMP15	Хана	<i>FecX^H</i>	X	H+: OR +1,0; LS +0,6 HH: бесплодие (зачаточные яичники)	Ромни-марш
BMP15	Белклейр	<i>FecX^B</i>	X	B+: OR +1,0 BB: бесплодие (зачаточные яичники)	Белклейр
BMP15	Галвэй	<i>FecX^G</i>	X	G+: OR +0,7 GG: бесплодие (зачаточные яичники)	Белклейр и Кембриджская
BMP15	-	-	X	Неизвестный фенотип	Лакауне
GDF9	высокая плодовитость	<i>FecG^H</i>	5	H+: OR +1,4 HH: бесплодие (зачаточные яичники)	Белклейр и кембриджская
-	Вудландс	<i>FecX2^W</i>	X	W+: OR +0,4; LS +0,25 WW: OR и LS > W+	Купворз
-	Лакауне	<i>FecL^L</i>	11	L+: OR +1,0 LL: OR +2,0	Лакауне
-	Тока	<i>FecI^I</i>	-	I+: OR +1,2; LS +0,7 II: некоторые признаки бесплодия	Исландская
-	-	-	-	Возможные гетерозиготы: OR +1,0; LS +0,6	Олкуска
-	-	-	-	Высокая вариабельность OR (1-8) и LS (1-7), высокая повторяемость OR (0,8)	Белле-Иле

OR – степень овуляции; *LS* – размер гнезда

Экспрессия гена Борола, по всей видимости, ограничена полом, так как рост семенников, их размер и дневная продукция сперматозоидов баранов не отличается от этих показателей у обычных мериносов.

Группы AgResearch в Новой Зеландии, INRA во Франции и Эдинбургского университета в Шотландии независимо друг от друга установили, что высокая плодовитость овец Борола является результатом неконсервативной мутации (Q249R) во внутриклеточном сигнальном домене гена рецептора морфогенетического костного белка IB (VMPR-IB) – члена семейства рецепторов трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) (Mulsant et al., 2001, Wilson et al., 2001, Lecerf et al., 2002).

В норме секреция гранулезными клетками прогестерона, который необходим для их дифференцировки и созревания овуляторных фолликулов, ингибируется двумя природными лигандами VMPR-IB - дифференцирующим фактором роста 5 (GDF5) и BMP4. Было показано, что культивируемые *in vitro* гранулезные клетки, полученные от овцематок с генотипом $FecB^B/FecB^B$, секретировали значительно больше прогестерона, чем клетки от овец с генотипом $FecB^+/FecB^+$ (Mulsant et al., 2001). По всей видимости, клетки $FecB^B/FecB^B$ являются менее чувствительными к ингибирующему действию GDF5 и BMP4, вследствие пониженной функциональности рецептора VMPR-IB, что приводит к дифференцировке гранулезных клеток и усиленному развитию фолликулов у животных, несущих мутацию.

Недавние исследования по выявлению происхождения мутации Борола в гене VMPR-IB привели к идентификации индийской породы овец гароле (бенгальские) как породы, внесшей в конце 18 века аллель $FecB^B$ в австралийскую популяцию мериносов (Davis et al., 2002).

Еще одной локальной породой-носителем гена Борола являются яванезские тощехвостые овцы – многоплодные индонезийские овцы, у которых ген плодовитости ранее был идентифицирован как $FecJ$ (Bradford

et al., 1991). Однако неизвестно, получили ли овцы данной породы аллель $FecB^B$ непосредственно от овец гароле из Индии, или через мериносов из Австралии.

Помимо местных локальных пород Индии и Индонезии, несущих аллель Борола, этот аллель посредством скрещивания с австралийскими мериносами Борола был привнесен в целый ряд других пород, разводимых, по меньшей мере, в 13 странах (Thimonier et al., 1991).

Наличие главного гена плодовитости было доказано у овец Инвердейл ($FecX^I$) - многоплодном семействе Новозеландских овец, берущих свое происхождение от матки породы ромни-марш, принесшей 33 ягненка за 11 ягнений (Davis et al., 1991).

В середине 90-ых годов в стаде овец породы ромни-марш Мак Хана в Вайкато был найден ген ($FecX^H$), проявляющий такой же характер наследования и фенотип, как ген Инвердейл (Davis et al., 2001). Изучение характера наследования аллелей Инвердейл и Хана позволило предположить, что ген плодовитости в обоих стадах был локализован на X хромосоме.

Гетерозиготные овцы-носители аллелей Инвердейл и Хана характеризуются повышенной плодовитостью по сравнению с овцами-носителями (табл. 11), в то время как гомозиготные овцы-носители аллелей $FecX^I$ и $FecX^H$ имеют нефункциональные зачаточные яичники и бесплодны (Davis et al., 1992). Бараны, несущие аллели $FecX^I$ и $FecX^H$, отличаются нормальной плодовитостью.

Ген $FecX$ картирован в регионе 10сМ X хромосомы (Galloway et al., 1999), в котором локализован ген костного морфогенетического белка 15 (BMP15) – член семейства TGF β . BMP15 – это белок, который специфически экспрессируется в ооцитах, с неизвестными до настоящего времени функциями. Было установлено, что мутация в гене BMP15, обуславливающая неконсервативную замену V31D в высоко

консервативном регионе зрелого белка, находится в сцеплении с $FecX^I$ (Galloway et al., 2000). Единичная нуклеотидная замена $C \rightarrow T$ в позиции 67 зрелого белка BMP15 вводит стоп-кодон в аллель $FecX^H$. Доказано, что обе замены приводят к образованию неактивной формы BMP15.

Открытие этих мутаций позволило разработать ДНК-тесты, направленные на выявление овец-носителей аллелей плодовитости $FecX^I$ и $FecX^H$. Проведение такого тестирования в Новой Зеландии с последующим использованием баранов, главным образом, пород тексель и ромни-марш позволило увеличить частоту аллелей плодовитости Инвердейл и Хана в популяциях.

Суммируя, следует отметить, что оба сцепленных с X хромосомой признака плодовитости, а также плодовитость Борола, являются результатом мутаций в генах семейства TGF- β .

Большие фенотипические различия и высокая повторяемость степени овуляции у кембриджских овец Великобритании позволили предположить, что в этой популяции также сегрегирует главный ген плодовитости (Hanrahan, Owen, 1985). Последующие исследования показали, что кембриджские овцы несут мутацию $FecX^G$ в гене BMP15 (Hanrahan et al., 2004). Эта мутация отличается, как от мутации Инвердейл ($FecX^I$), так и Хана ($FecX^H$), однако гетерозиготный фенотип (повышенная степень овуляции) и гомозиготный фенотип (бесплодие с зачаточными яичниками) идентичны аллелям $FecX^I$ и $FecX^H$.

Наряду с этим, данная популяция овец является носителем мутации в аутосомальном гене GDF9 ($FecG^H$), локализованном на хромосоме 5, которая также обуславливает повышенную степень овуляции у гетерозиготных маток и бесплодие гомозиготных носителей.

Исследование характера наследования плодовитости привело к открытию другого локализованного на X хромосоме гена плодовитости - Вудланд ($FecX2^W$) у многоплодного стада купворзских овец (Davis et al.,

2001, Davis et al., 2002). Однако сцепленный с данным признаком плодовитости ген и соответствующая мутация в нем до настоящего времени не идентифицированы.

Три главных гена, влияющих на плодовитость, были найдены в семействе ирландской многоплодной породы овец Белклеър, которое характеризуется очень высокой степенью овуляции, а также частыми случаями стерильности особей (Hanrahan et al., 2004). Две мутации были выявлены в гене BMP15, причем одна из них была аналогична мутации у кембриджских овец ($FecX^G$), а другая ($FecX^B$) – ранее не идентифицирована. Кроме того, мутация гена GDF9, обнаруженная у кембриджских овец ($FecG^H$), присутствовала и у овец семейства Белклеър. Матки, несущие две копии любой из трех мутаций, или одну копию $FecX^G$ вместе с одной копией $FecX^B$, являются стерильными. Гетерозиготные носители $FecX^G$ или $FecX^B$ проявляют аналогичное увеличение степени овуляции, как и овцы, гетерозиготные по $FecX^I$ или $FecX^H$. Влияние одной копии $FecG^H$ проявляется одинаково, как у овец Белклеър, так и кембриджских овец.

Исследование потомства и последующий сегрегационный анализ мясных многоплодных овец породы лакауне во Франции показал наличие локализованного на 11 хромосоме гена плодовитости, характеризующегося аддитивным действием аллелей на степень овуляции (Lecerf et al., 2002). Наличие нескольких овец с очень высокой степенью овуляции позволило Bodin с соавторами (2002) предположить присутствие в исследуемой группе овец нескольких аллелей плодовитости или другого главного гена. Недавно у овец этой породы была выявлена мутация в гене BMP15, отличающаяся от известных мутаций $FecX^I$, $FecX^H$, $FecX^G$ и $FecX^B$ (Bodin, цит. по Davis, 2005).

Скрининг высоко плодовитой линии овец Исландии, выполненный Jonmundsson и Adalsteinsson (1985), показал, что все многоплодные овцы

этой линии берут свое происхождение от одной высоко плодовитой овцы по кличке Тока. Это наблюдение позволило сделать предположение о наличии главного гена (FecI). Сегрегационный анализ данных плодовитости овец семейства Тока в Великобритании показал наличие аддитивного аутосомального главного гена плодовитости (Walling et al., 2002). Хромосомальная локализация гена пока не известна.

Стерильные зачаточные яичники были выявлены у овец, гомозиготных по четырем мутациям гена BMP15 (FecX^I, FecX^H, FecX^G и FecX^B), а также у овец, несущих по одной копии двух любых аллелей. Показана стерильность маток, имеющих по одной копии FecX^I и FecX^H (Davis et al., 2001), а также по одной копии FecX^G и FecX^B (Hanrahan et al., 2004).

Скращивание овец, несущих мутацию BMP15, с овцами несущими мутацию в гене BMPR-1B, показало, что все дочери имели полностью функциональные яичники и характеризовались высокой степенью овуляции (в среднем 4,36) (Davis et al., 1999). Наличие у овец одной копии мутантного BMP15 и одной копии мутантного BMPR-1B характеризуется мультипликативным действием на степень овуляции. Действие BMP15 увеличивает степень овуляции на 44%, а BMPR-1B – на 90%. Исходя из этого, можно предположить, что на действие одного гена присутствие другого не оказывает влияния.

Действие одной копии мутации BMP15 совместно с одной копией мутации GDF9 является эквивалентным. Большинство полученных на сегодня данных показывает аддитивное влияние двух генов на степень овуляции, однако некоторые данные тестирования потомства предполагают несколько меньшее влияние копии GDF9 в случае присутствия мутации BMP15 (Hanrahan et al., 2004). Все полученные на сегодня данные показывают, что индивидуумы с мутациями GDF9 и BMP15 имеют большую степень овуляции по сравнению с животными,

несущими по одной мутации. Дочь, несущая по одной копии каждой из трех мутаций (BMP15, BMPR-1B и Вудланд), полученная скрещиванием потомства барана-носителя аллеля Вудланд ($FecX2^{W/Y}$) с маткой-носителем аллелей $FecX^I$ и $FecB^B$, имела полностью функциональные яичники и характеризовалась степенью овуляции 5 и 8 в возрасте 1,5 лет и степенью овуляции 12 в возрасте 2,5 лет (Davis, 2005).

Вполне вероятно, что причиной высокой плодовитости исконно русской романовской породы овец также является существование одного или нескольких главных генов плодовитости. Исследования генетической обусловленности высокой плодовитости овец романовской породы, как в России, так и во всем мире, пока что носят фрагментарный характер. Надежда установить истинную генетическую природу феноменальной плодовитости романовской породы овец при помощи генов BMP15 и BMPR-1B, предпринятая в ВИЖе, не увенчалась успехом. Это подтверждается и последними исследованиями Davis et al (2006), который исследовал среди многих пород овец и романовскую овцу и не нашел полиморфизма по вышеназванным генам плодовитости. Хотя данная работа и не дала окончательный ответ на вопрос, что же является основной причиной повышенной плодовитости романовской породы овец, она позволила получить достаточно любопытные в научном плане данные, которые непременно следует использовать в дальнейшей работе. Существует надежда, что ген ESR, активно используемый в селекции свиней на повышенную плодовитость, окажется и маркером плодовитости романовской породы овец (Xiao-Dan Bi, 2005).

Создание многоплодных стад овец посредством скрининга многоплодных овец национальных пород является эффективным способом выявления главных генов плодовитости. Такие стада овец в Новой Зеландии, Ирландии и Великобритании явились предпосылкой для открытия мутаций $FecX^I$, $FecX2^W$, $FecX^B$, $FecX^G$ и $FecG^H$. Открытие

главных генов плодовитости с различной степенью влияния на степень овуляции и размер гнезда открыли новые возможности для селекционеров. Преимуществом главных генов является то, что они могут быть введены в новые породы, сохраняя при этом все характеристики таких новых пород. Иллюстрацией этого является введение гена Борола от овец гароле из Индии в стада тонкорунных мериносов Австралии и в последующем в стада длинношерстных ромни-маршей в Новой Зеландии. Проведенные исследования характера наследования и ДНК-тестирования главных генов плодовитости выявили их потенцию значительно увеличивать репродуктивные качества в стадах овец во всем мире, а также привели к получению новых знаний контроля воспроизводства. Однако неконтролируемое введение в стада овец главных генов плодовитости может привести к усилению селекционного давления на другие признаки, что будет способствовать увеличению генетического груза. Поэтому при проведении селекционных мероприятий, направленных на повышение плодовитости овец с использованием ДНК-маркеров, необходимо осуществлять молекулярно-генетический контроль на всех этапах племенной работы.

Вопросы для самопроверки по теме 8.

1. Значение многоплодия в формировании продуктивности
2. Проблемы, встающие при применении традиционных методов в селекции на многоплодие.
3. Гены – кандидаты для селекции свиней на многоплодие.
4. Полиморфизм гена ESR.
5. Полиморфизм гена FSHB.
6. Полиморфизм гена NCOA1.

7. Гены – кандидаты для селекции овец на многоплодие.
8. Полиморфизм гена BMPR-1R.
9. Полиморфизм гена BMP15.
10. Использование полиморфных вариантов генов плодовитости в селекции.

Тема 9. Генетические маркеры, связанные с ростом животных и качеством мяса.

Маркеры роста и качества мяса у свиней и крупного рогатого скота

Одним из основных направлений селекционной работы в свиноводстве является улучшение мясных качеств свиней и повышение выхода мяса. Для решения этой задачи наряду с традиционной селекцией все большее применение находят методы маркерной селекции, предусматривающей использование в селекционных программах ДНК-маркеров, напрямую или косвенно связанных с QTL мясной продуктивности. Сведения о генах- кандидатах на роль маркеров при селекции на мясные качества приведены в таблице 13.

В результате повышенного спроса населения на мясную свинину применяются селекционные программы, направленные на разведение свиней с сильным развитием спинной части и окорока и с одновременным уменьшением содержания жира в туше. Однако оказалось, что селекция на мясность сопровождается определенными негативными последствиями и, в первую очередь, связана с нежелательной повышенной чувствительностью свиней к стрессам, что снижает качество свинины и формирует появление специфического его порока, получившего название PSE (pale – бледный, soft – мягкий, exudative – эксудативный). Установлена положительная корреляция между низким качеством свинины (PSE) и чувствительностью свиней к стрессам (Brenig B., Brem G., 1992).

Fujii с соавторами (1991) установили точковую мутацию в рианодин-рецепторном гене (RYR1), как предполагаемую причину возникновения злокачественной гипертермии. Гипотеза подтвердилась наличием мутации у различных пород свиней (Otsu et al., 1991). В 1993 году Г. Брэм и Б.

Таблица 13

Гены-кандидаты признаков мясной продуктивности у
сельскохозяйственных животных

Вид и ген	Действие	Автор
1	2	3
Крупный рогатый скот: Тиреоглобулин, (TG5)	Тиреоглобулин – гликопротеин и предшественник тиреоидных гормонов трийодотиронина и тетраiodотиронина, которые участвуют в образовании жировых клеток и формировании мраморности.	Barendse et al., 1999
Крупный рогатый скот: Диацилглицерол О-ацил-трансфераза (DGAT)	DGAT катализирует последний этап синтеза триглицеридов. Замена аланина на лизин в белке гена DGAT приводит к увеличенному образованию ацетил-коэнзима А.	Grisart et al., 2002; Winter et al., 2002
Крупный рогатый скот и свиньи: Лептин (LEP)	Мутация С73Т Замена аргинина на цистеин ассоциируется с содержанием жира в туше и уровнем лептин-мРНК (аллель С ассоциируется с высоким, аллель R с низким содержанием жира в туше).	Buchanan FC, et al., 2002
	Мутация С528Т Гомозиготные по алелю Т животные характеризуются повышенными содержанием лептина в сыворотке, толщиной шпика и мраморностью мяса, а также лучшими показателями потребления корма, скороспелости и живой массы к моменту убоя.	Nkrumah JD et al., 2005
	Мутация С1759G GG-животные отличаются повышенным потреблением корма, скороспелостью и большей живой массой.	
	Нарушение баланса энергии, изменение толщины шпика у свиней	Jiang, Gibson, 1999

1	2	3
Крупный рогатый скот и свиньи: Миостатин (GDF8)	Миостатин – ингибитор мышечного роста. Любые мутации в этом гене приводят к ухудшению его регуляторной функции и, соответственно, к увеличению развития мышцы. В породе Бельгийская голубая мутация в этом гене приводит к чрезвычайной мышечной гипертрофии, в других европейских породах (Пьедмонтезская, Каролас и Мен-Анджой (Maine-Anjou)) также показано наличие мутаций, повреждающих, но не выключающих работу гена и приводящих к умеренной гипертрофии мышц.	Kambadur et al., 1997, Grobet et al., 1998
Крупный рогатый скот Калпаин/ Калпастатин	Калпастатин – ингибитор активности калпаина, участвует в процессе протеолиза при созревании мяса. Мутация гена калпаина, картированного на хромосоме 29 КРС, представлена полиморфизмом 2 нуклеотидов, обуславливающим аминокислотную замену (глицин/аланин) и приводящему к более высокой нежности мяса по сравнению с глициновой аллелью (> 30 %).	Page B. T et al., 2002 Cullen et al., 2003
Свиньи: Аминопептидаз а N (ANPEP)	Влияние на с/сут привес через переваримость олигопептидов	Nielsen et al., 1996
Гормон роста (GH)	Темпы роста, жирность туши	Nielsen et al., 1995 Knorr et al., 97
Свиньи: Миогенин (MyoD)	Развитие мышц, вес при рождении, рост, вес мяса	Te Pas et al., 1996, 1998, Soumillion et al, 1997
Свиньи: Инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1)	Скорость роста, изменение состава туши, нарушения в развитии мышечной массы	Casas et al., 1997

1	2	3
Свиньи: Инсулиноподобный фактор роста (IGF-2)	Содержание мяса и жира в туше у пород кр. бел., ландрас и диких свиней	Nezer et al., 1999 Jeon et al., 1999
Свиньи: PIT1	Вес при рождении, темпы роста, состав туши	Yu et al., 1995, 1996 Stancekova et al., 1999
Свиньи: Меланокортин-рецептор 4 (MC4R)	Изменение роста, жирности, использования корма	Nezer et al., 1999
Свиньи: Рианодиновый рецептор (RYR1)	Чувствительность к стрессу, нарушенная регуляция освобождения Ca ²⁺ из саркоплазматического ретикулума	Fujii et al., 1991 Brem, Brenig, 1992 Brenig, Brem, 1992 Nakajima et al., 1996
Свиньи: Белок, связывающий жирные кислоты, сердца (H-FABP)	Различия в содержании внутримышечного жира	Gerbens et al., 1997, 1998
Свиньи: Белок, связывающий жирные кислоты адипоцитов (A-FABP)	Различия в содержании внутримышечного жира у свиней породы дюрок	Gerbens et al., 1998
Свиньи :х 3 субъединица протеинкиназы (PRKAG3)	Повышенный уровень гликогена в мясе, низкое качество продуктов переработки у свиней породы гемпшир	Milanet al., 2000

Преимущество ДНК-технологии заключается в том, что с помощью ПЦР-анализа можно обнаружить данную мутацию на генном уровне у животных в любом возрасте, в том числе у новорожденных поросят. Материалом для анализа служат микроколичества любых тканей. Возможны массовые обследования животных.

Результаты анализа позволяют точно установить, является ли подопытное животное стрессрезистентным или стрессчувствительным по RYR-гену. Это отличает результаты нового молекулярно-генетического метода от результатов галотанового теста, не позволяющего установить истинную частоту мутантного аллеля в популяции. Простая, надежная и достоверная диагностика генотипа может быть использована для выбраковки племенных животных по этому признаку.

Практическое использование метода ген-диагностики ведет к снижению падежа животных и улучшению качества свинины. В первую очередь использование теста рекомендуется для местных специализированных пород свиней, где проблемы стрессустойчивости являются наиболее острыми (Калашникова Л.А. и др., 1997).

Исследования нескольких пород свиней России и Беларуси по вариантам RYR1 позволили установить относительно низкий процент особей, несущих чувствительный к стрессам аллель *p* (Зиновьева и др., 2002).

Низкая частота встречаемости, а также отсутствие чувствительных к стрессам животных с генотипом *pp* позволяет сделать вывод о том, что для товарного свиноводства России, базирующегося в основном на крупной белой породе, нет необходимости в проведении молекулярной генной диагностики стрессовой чувствительности. С целью исключения появления стресс-чувствительных животных в крупной белой породе достаточно проведения MHS-диагностики только среди племенных хряков. У мясных пород, в случае относительно высокой частоты встречаемости

аллеля *n* среди хряков (<10%), следует проводить диагностику и среди племенных свиноматок.

Анализ данных мировых информационных ресурсов и опыта зарубежных коллег позволил выявить ряд генов (маркеров), оказывающих влияние на качество свинины и выход продукции: лептин, LEP (SSC18); рецептор лептина, LEPR (SSC6); белки, связывающие жирные кислоты, H-FABP (SSC6) и A-FABP (SSC4); белок, обуславливающий дифференцировку адипоцитов, ADFP (SSC1); белки, связывающие энхансер CCAAT, C/EBP α (SSC2 или SSC 6), C/EBP β (SSC17) и C/EBP γ ; белок, связывающий элемент циклического АТФ ответа, CREB (SSC3 или SSC15); инсулиноподобный фактор роста 2, IGF2 (SSC2); гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисомы, PRARV (SSC13); гамма-субъединица протеинкиназы A, PRKAG3 (SSC15); фактор 1 детерминации и дифференцировки адипоцитов, ADD1 (SSC12); E1-альфа пируватдегидрогеназа, PDHA1 (SSCX); аполипопротеин E, APOE (SSC6); миоденин, MYOD1 (SSC2); миостатин, MSTN; гипофизарный транскрипционный фактор 1, PIT1 (SSC13).

Из спектра вышеназванных генов нами были выбраны два маркера, для которых было доказано достоверное влияние на признаки мясной продуктивности свиней – PRKAG3 и IGF2.

Был проведен анализ наиболее значимых, с селекционной точки зрения мутаций. Установлено, что точечные мутации в гене PRKAG3 (RN-гене), приводящие к аминокислотным заменам T30N, G52S, I199V и R200Q, оказывают положительное влияние на наращивание мышц, но в то же время являются причиной отрицательных перерабатывающих свойств мяса. Предпочтительными, с точки зрения селекции аллелями, являются аллели 30T, 52G, 199I и 200R.

Для разработки системы выявления носителей мутаций RN-гена использовали последовательность PRKAG3-гена (генный банк, №

AF214521). В ВИЖе были созданы две системы диагностики. Первая система позволяет выявлять аллели T30N, G52S. Вторая система позволяет определять аллели I199V и R200Q.

Сравнение результатов тестирования свиней по RN-гену с использованием системы на основе пиросеквенирования с данными, полученными с использованием системы на основе ПЦР-ПДРФ анализа, разработанной нами ранее, выявило полное совпадение генотипов исследуемых животных. Таким образом, предлагаемая нами система анализа RN-гена с применением технологии пиросеквенирования может быть с успехом использована для скрининга QTL мясной продуктивности свиней в рамках проведения маркерной селекции.

Вторым геном, представляющим интерес для зоотехников-селекционеров, является ген IGF2. Выявлено, что регуляторная мутация G3072A в интроне IGF2 оказывает влияние на скорость роста свиней и наращивание мышечной массы. Причем желательным генотипом является вариант QQ.

В настоящее время в литературе имеются сообщения о нескольких маркерных генах, связанных с липидным метаболизмом и влияющих на мясные качества крупного рогатого скота: тиреоглобулин (TG5), диацилглицерол О-ацилтрансфераза (DGAT), лептин, миостатин, калпаин и калпастатин.

Тиреоглобулин контролируется геном, находящимся в области центромеры 14 хромосомы КРС и отвечающим за выработку тиреоглобулина, он отмечен в качестве позиционального и функционального гена-кандидата QTL мраморности мяса. Тиреоглобулин (Thyroglobulin) – гликопротеин, предшественник тиреоидных гормонов трийодотиронина (Т3) и тетрайодотиронина (Т4), участвующих в образовании жировых клеток и формировании мраморности (Smas und Sul, 1995). Ген тиреоглобулина КРС был секвенирован Parma et al, 1987,

наличие различных аллелей выявлено Georges et al., (1987). Ассоциативная связь мраморности с маркером CSSM66, расположенным на хромосоме 14 КРС, показана Barendse et al. (1997).

Точный механизм влияния полиморфности гена на формирование качественных признаков мясной продуктивности еще неизвестен, но установлена связь его вариантов, обусловленных SNP в 5'-нетранслируемой области гена TG5 с мраморностью, в частности, показателем IMF в длиннейшей мышце спины (патент WO 99/23248). Гомозиготный или гетерозиготный по дельта-тимин аллелю (ТТ или СТ) скот отличается более высокой мраморностью, чем гомозиготный по дельта-цитозин аллелю (СС). Исследования проводились в группах КРС ангусской и шортгорнской пород, результаты подтверждены также в коммерческих линиях и породе Wagyu (для этой породы разница в степени мраморности между гомозиготными вариантами может достигать 14 % - 20 %). (Barendse et al., 1997)

На рынке представлен коммерческий тест мраморности GeneSTAR[®], основанный на полиморфизме гена тиреоглобулина. Апробация проведена на поголовье более 3500 голов КРС с учетом породы и системы кормления. Самой высокой частотой встречаемости желательного аллеля характеризуется японская порода КРС Wagyu (76%), которая, как известно, отличается чрезвычайно высокой мраморностью мяса.

Разница по степени мраморности при откорме групп скота между альтернативными гомозиготами составила 3,5% IMF (СС-генотип) к 11% (ТТ-генотип). Достоверного влияния на другие признаки мясной продуктивности выявлено не было.

В исследованиях на большем поголовье скота Ангусской и Шортгорнской породы (1750 быков) выявлена достоверная связь вариантов гена тиреоглобулина с мраморностью мяса, отмечены

небольшое увеличение привесов (+50г) и отсутствие влияния на другие признаки продуктивности (Barendse et al., 1999).

Содержание внутримышечного жира у крупного рогатого скота обуславливает мраморность мяса и, в конечном счете, влияет на качественные показатели мясной продуктивности. Диацилглицерол О-ацилтрансфераза (Diacylglycerol O-Acylltransferase 1, DGAT) катализирует ацилкоэнзим А-зависимое ацилирование sn-1,2-диацилглицерола (sn-1,2-diacylglycerol) для синтеза триацилглицерола (TAG). Роль DGAT в липидном обмене заключается в участии фермента в процессе преобразования углеводов в жиры и сохранению их в жировых депо.

Ген DGAT картирован, также как и ген тиреоглобулина, на 14 хромосоме крупного скота, то есть варианты этих генов наследуются совместно. (G. Thaller et al., 2003) Аллели, идентифицированные Grisart et al., (2002), представляют собой динуклеотидную замену (AA/GC) в начале экзона VIII (6 829 bp) в гене диацилглицерол О-ацилтрансферазы. Мутация приводит к неконсервативной замене лизина (К) на аланин (А). (Kühn et al., 2004) Имеются данные о положительной корреляции показателей активности фермента DGAT и IMF в длиннейшей и полусухожильной мышцах в породах голштино-фризская и каролас: у животных с желательным генотипом КК активность DGAT была более чем в 5 раз выше по сравнению с АК и АА. (B. Sorensen et al., 2005). Thaller *et al.* (2003) сообщают о достоверном влиянии полиморфизма этого гена на содержание внутримышечного жира. Winter et al. (2002) в исследованиях показали, что животные-носители К-аллеля имеют более высокие показатели содержания молочного жира как в общем количестве, так и в процентном отношении по сравнению с АА-гомозиготными животными (разница между гомозиготами - до 51%). (S. Moore et al., 2003)

В группах коров пестрой и голштинской пород немецкой селекции проведены исследования оценки частоты встречаемости аллелей и влияние

полиморфности гена DGAT на показатели молочной продуктивности. Частота встречаемости аллеля, кодирующего лизин-вариант, составила 0,072 для пестрой и 0,548 для немецкой голштинской породы. Разница по показателям молочной продуктивности для КК-животных по сравнению с АА-гомозиготами составила для коров пород черно-пестрая и голштинская соответственно: содержание жира – 0,35 и 0,28 %, содержание белка – 0,10 и 0,06 %, удой за три лактации – 242 к 180 кг и 260 к 320 кг, молочный жир – 7,5 к 14,8 кг и 7,6 к 10,7 кг, белок – 3,6 к 0,2 и – 4,8 к 5,2 кг.

В результате исследований на двух поколениях скота пород голштино-фризская и каролас установлена достоверная связь генотипов по DGAT с показателем IMF в длинной и полусухожильной мышцах. Частоты встречаемости аллелей Т гена TG5 и К гена DGAT составили 0,25 и 44,6% и 24,1 и 11,1% для обеих пород соответственно, частоты гаплотипов желательных аллелей Т и К составили 7,4% для КТ, 37,0% для КС, 16,7% для АТ в породе голштино-фризская и 8,0% для КС и 22,0% для АТ в породе каролас. Вследствие различия частот аллелей исследуемых генов, предпочтительных с точки зрения селекции на мраморность мяса, численность животных с совокупными гаплотипами 2-х локусов по группам является породоспецифичным признаком. Для TG5 и DGAT генов доказан рецессивный характер наследования. Показано, что как в группе пестрых пород, так и у большинства европейских мясных пород, соответственно, предпочтительные генные варианты встречаются достаточно редко. (G. Thaller et al., 2003).

Лептин – 16-kDa-гормональный продукт гена тучности, участвует в контроле питания, расхода энергии, регулировании массы тела млекопитающих, воспроизводства и определенных функций иммунной системы. (Friedman, Halaas; 1998) Синтезируется в основном в адипоцитах и при увеличении массы тела возрастает, соответственно, его периферийная концентрация. (Hossner, 1998) Лептин – возможно, один из

лучших маркерных генов, характеризующих липидный обмен у животных и человека. Jolanta Oprzadek (2005), Geary et al. (2003) сообщают о положительной корреляции ($P < 0.01$) концентрации лептина в сыворотке крови с мраморностью мяса ($r = 0,35$ и $0,50$) в коммерческих кроссбредных линиях КРС.

Buchanan et al. (2002) идентифицировали полиморфизм в кодирующей области гена лептина крупного рогатого скота в позиции 73 от старта экзона 2: замена цитозина (С) на тимин (Т), кодирующая замену аминокислоты аргинин на цистеин (С/Т, Arg25Cys). Приводятся сведения об ассоциативной связи мутации гена лептин быка с содержанием жира в туше и уровнем лептин-мРНК. В исследованиях на 4-х породах КРС показана связь аллеля Т с высоким и аллеля С – с низким содержанием жира в туше, выявлена связь с повышенным жиротложением у мясного и с увеличенным надоем у молочного скота (Buchanan FC, et al., 2002).

Сообщается о большой частоте встречаемости предпочтительного аллеля Т у британских пород, тогда как континентальные породы характеризуются преобладанием в генотипе аллеля С. Гомозиготные по тимину животные отличаются повышенным уровнем лептин-мРНК. Это позволяет предположить, что при добавлении Т-аллелем дополнительного цистеина к белку происходит частичная потеря его биологической функции и, следовательно, мутация является причинной.

Были проведены исследования полиморфности гена лептина в пяти генетических линиях коммерческого мясного скота. Различия в росте, потреблении корма и его усвояемости для животных с гетерозиготными генотипами не были существенны ($P > 0,10$), гомозиготные по тимин-аллелю особи отличались более высоким потреблением корма (+ 0,19 кг), гомозиготные по цитозину животные характеризовались пониженным потреблением корма (-0,18 кг). Показано преимущество Т-аллеля в толщине шпика ($P = 0,06$), животные имеют также более высокие значения

содержания жира в туше ($P = 0,005$), подкожного жира в поясничном отделе ($P = 0,07$) и в районе грудной кости ($P = 0,01$). Связь различных генотипов и мраморности длиннейшей мышцы не доказана ($P > 0,10$). (J. D. Nkrumah et al., 2003)

В двух независимых популяциях австралийского скота общей численностью 3129 животных была произведена проверка ассоциативной связи мутации в позиции 73 гена лептин крупного рогатого скота с показателями мраморности мяса: визуальный внутримышечный жир (оценка по системе AUS-MEAT), внутримышечный жир (оценка методом инфракрасной спектрофотометрии), толщина шпика и общее содержание жира. Установлено соответствие частот встречаемости аллелей и генотипов в изученных породах данным, полученным в других исследованиях. Корреляция аллельных вариантов гена лептин ни с одним рассматриваемым признаком качественных показателей мясной продуктивности найдена не была, несмотря на почти в 20 раз большее количество генотипированных животных по сравнению с исследованиями Buchanan et al. (Barendse et al., 2004)

Eenennaam Alison Van et al. (2004) отметили высокие значения показателей качества мяса и снижение продуктивности у скота, гомозиготного по ТТ-аллелю и обратная зависимость этих факторов у СС-гомозиготных животных. В породах КРС молочного направления коровы с генотипом ТТ по гену лептина отличаются большим удоем (на 3,3 л/д) по сравнению с СС животными.

Taniguchi et al. (2002) была секвенирована промоторная область гена лептин быка (No. AB070368). Nkrumah et al. (2005) идентифицировали SNP в 5'-нетранскрибируемой области промотора – замена цитозин/тимин обнаружена в позиции 528 гена лептин КРС. Исследования проводились в трех группах коммерческих синтетических линий КРС общей численностью 150 животных, установлены ассоциации между более

высокими концентрацией лептина в сыворотке, ростом, приемом и усвояемостью корма и предубойной массой. Показано, что животные с генотипом T/T характеризуются 48 и 39%-м увеличением концентрации лептина в сыворотке ($P < 0,001$), 39 и 31%-м увеличением толщины шпика ($P < 0,001$) и 13 и 9%-ого увеличением мраморности мяса ($P = 0,01$), по сравнению с C/C и C/T, соответственно. Также животные с генотипом T/T отличаются значительно более высоким потреблением корма ($P < 0,001$), темпом роста и живой массой к моменту убоя ($P < 0,10$).

Nkrumah JD et al. (2005) обнаружена замена цитозин/гуанин (C/G) в положении 1759 в области промотора гена лептин быка. Животные с генотипом G/G характеризуются более высоким потреблением корма ($P = 0,001$), темпом роста ($P < 0,10$) и массой ($P < 0,01$). Аллель тимина и аллель гуанина ассоциируются с повышенным приемом корма ($P < 0,05$), возможна их связь с другими признаками, например молочной продуктивностью рогатого скота.

Вопросы для самопроверки по теме 9.

1. Традиционные подходы к селекции по мясной продуктивности.
2. Основные проблемы использования маркеров в селекции по признакам мясной продуктивности.
3. Гены – кандидаты для селекции крупного рогатого скота по мясной продуктивности.
4. Негативные последствия односторонней селекции на примере свиней.
5. Роль генетических маркеров в улучшении мясной продуктивности.
6. Полиморфизм генов RYR1 и RN.

Глава 10. Применение ДНК-диагностики для выявления летальных рецессивных мутаций

Врожденный иммунодефицит крупного рогатого скота (BLAD-синдром). Комплексный порок позвоночника (CVM) и др.

Врожденные заболевания иммунной системы широко распространены среди домашних животных. Остановимся лишь на некоторых из них.

В 1973 г. МакГюр и Поппи описали у лошадей заболевание, названное Severe combined immunodeficiency disease (SCID). Оказалось, что этот дефект наследуется по аутосомному рецессивному типу. Данная мутация встречается у арабской лошади с частотой от 0,0018 до 0,042.

В результате молекулярно-генетического анализа мутации, вызывающей SCID, было показано, что заболевание обусловлено делецией 5 п.н. в гене каталитической субъединицы ДНК-протеин киназы, локализованном на 6 хромосоме лошади.

В 60–80-е годы двадцатого столетия у крупного рогатого скота, кошки и норки было выявлено наследственное заболевание, получившее название CHS – синдром Чидайк-Хигаши (Кунида и др. 2000). Аналогичное заболевание известно у человека и грызунов (мышь, крыса). Это рецессивная аутосомная болезнь, обусловленная мутацией гена кодирующего полипептид, принимающий участие в везикулярном транспорте. У крупного рогатого скота этот ген локализован на 28 хромосоме, а у человека и мыши на длинном плече хромосомы 1 и 13.

У человека в гомозиготном состоянии эта мутация летальна. Заболевание сопровождается иммунодефицитом, обусловленным отсутствием натуральных киллеров, пониженной свертываемостью крови, наличием аномальных гранул в лейкоцитах, частичным альбинизмом и нарушениями со стороны нервной системы. Аналогичная клиническая

картина наблюдается и у мышей. У крупного рогатого скота картина иммунной недостаточности и патологических изменений нервной системы выражена незначительно.

В начале 80-х годов у крупного рогатого скота было описано наследственное заболевание, получившее название синдрома гранулоцитопатии, болезни Такахаши-Хагемозера или дефицита лейкоцитарной адгезии – BLAD (Bovine Leucocyta Adheasion Deficiancy). Заболевание обусловлено точковой мутацией в гене, кодирующем бета-субъединицу бета-два интегрина (CD18), состоящей в замене кодона аспаргиновой кислоты в позиции 128 на триплет, кодирующий глицин. Интегрины являются поверхностными клеточными белками, запускающими процесс адгезии. Лейкоцитарные интегрины обеспечивают процессы миграции, регенерации, дифференцировки и иммунного ответа.

Мутация, затрагивающая CD18 и получившая обозначение D128G, в гомозиготном состоянии приводит к резкому снижению устойчивости телят к бактериальным инфекциям. Впервые это заболевание было зарегистрировано у прямых потомков выдающихся быков голштинской породы. Быка голландского происхождения Особорндейл Айвенго 1189870, родившегося в 1952 г., считали выдающимся производителем. Когда, спустя 40 лет, стало известно, что он является носителем гена BLAD, его потомство оказалось широко распространенным в черно-пестрых и красно-пестрых породах скота.

В таблице 14 приведены данные о распространении BLAD-синдрома у скота черно-пестрого корня в ряде стран мира. Наибольшая частота встречаемости BLAD-синдрома отмечена в Дании, и хотя в данном случае был обследован только молодняк, данная цифра свидетельствует о широкой распространенности этой мутации в стадах. Второе место по распространению гена дефицита лейкоцитарной адгезии в этом списке

занимают США. Среди красно-пестрого скота эта аномалия встречается реже: 1,9 % среди 484 исследованных быков.

Таблица 14

Частота встречаемости ген BLAD в популяциях черно-пестрого скота по ряду стран мира (по В.М.Игнатьеву, 1999)

Страна	Половозрастная группа	Исследовано животных	Частота носительства (%)
Германия	быки	3076	6,4
Дания	телята	1991	22,6
США	быки	2025	14,1
	коровы	1559	17,0
Чехия	быки	377	4,0
	коровы	61	6,0
Польша	быки	1680	5,0
Украина	быки	190	3,0
Россия	быки	161	5,6
	коровы	15	6,7

В силу малой изученности поголовья на носительство BLAD, цифры, полученные по Украине и России, позволяют дать лишь предварительную оценку. Но и они указывают на опасность распространения аллеля D128G в стадах этих стран. Подтверждением этому служит тот факт, что в 2000 г. в России зарегистрированы новые случаи носительства BLAD среди дочерей потомка Особорндейл Айвенго 1189870 – быка Жодана 48 (Шитов М.Ю., 2001).

В результате генеалогического анализа было установлено, что основным распространителем BLAD в мире, в том числе на Украине и в России, оказался голштинский бык американского происхождения, внук Особорндейл Айвенго 1189870 – Карлин М. Айвенго Белл 1667366, занимавший 12 место в сотне лучших быков США. В.М. Игнатьев (1999) на основании анализа родословных носителей BLAD установил, что в Россию мутантный ген был занесен через потомков Карлин М. Айвенго

Белла. Два из них Билл 187 и Диез 1843 были его сыновьями, а Жордан 48 и Сад 11 внуками через Билл Тройя 1882797 и Джесона 1842389. К линии Особорндейл Айвенго 1189870 относится и Шейх 15632, унаследовавший мутантный ген через отца Ю.М. Георга 338561. Носителями VLAD оказались и представители линий Силинг Траджуп Роккита 252803 – Жест 759 и Уес Идеала 933122 – Код 189.

Жест 759 родился 1 августа 1983 в ФРГ от Жеста 502259 и Никол 3265711. Удой матери Жеста 759 за 305 дней лактации составил 9518 кг при жирномолочности 4,19 %. Удой ее матери - Нини 534969 составил 7891 кг при 4,47 % жира. Отец матери - Пенстейт Айвенго Стар 1441440 является прямым потомком Особорндейл Айвенго 1189870 и носителем VLAD.

Бык Код 189 родился в Канаде 11 июня 1984 г. Его отец – Литфильд Колумбус ET 172657 происходил из линии Бутмейкера и являлся лидером в списке 100 лучших быков. Индекс его племенной ценности превышал 500 кг. Мать – Эден Дейри Гламорас Айви 9696068 – имела продуктивность за 305 дней лактации 11399 кг и 4,1 % жира. Отцом ее был Особорндейл Айвенго 118970. Код 189, как и Жест 759 унаследовал ген VLAD от Особорндейл Айвенго 1189870 по материнской линии. Таким образом, все зарегистрированные в России случаи VLAD имеют общий корень.

В результате испытания по качеству потомства в России Код 189 отнесен к категории B1, а Билл 187 к A2. Остальным быкам присвоена категория A1. Все это указывает на определенную зависимость между носительством VLAD и продуктивностью.

Комплексный порок позвоночника (CVM) — широко распространенный рецессивный генетический недостаток голштинского и голштинизированного скота. Скрытые носители CVM внешне ничем не отличаются. Однако 25% стельностей, полученных в результате

спаривания таких животных друг с другом, заканчиваются абортами или рождением мертвых телят, а половина появившихся на свет живыми — скрытые носители порока. Лишь четверть стельностей завершается рождением свободного от SVM потомства.

Анализ 62062 осеменений с использованием быков — скрытых носителей SVM — и их дочерей, проведенный под руководством Nilesen, показал, что до 77% плодов резорбируются или погибают до 260-го дня стельности, причем аборт могут происходить в любой период. Остальные стельности заканчиваются появлением мертворожденных телят обычно на одну – две недели раньше ожидаемого срока. Лишь небольшой процент из них выживает, однако погибает вскоре после рождения. Характерные признаки телят — носителей SVM — общая недоразвитость, укороченная шея, слившиеся и деформированные позвонки, сколиоз. Один из симптомов — деформация суставов передних и задних конечностей. К действию этого рецессивного гена относятся также пороки сердца, которые выявляются у родившихся в срок мертвых телят (рис.44).

Agerfolm с соавторами (2004) провели детальный анализ абортированных на поздних стадиях и мертворожденных телят — носителей SVM. У 62 из них с использованием радиографии установили повреждения позвоночника (98,4%), выявили пороки ребер (93,5%). Пороки сердца, главным образом в форме дисплазии, обнаружили в 15 случаях (24,2%). Билатеральную симметричную изогнутость запястных и пястных суставов нашли во всем исследуемом материале. Поздний артрит выявлен в 54 случаях (87,1%), дефект перегородки желудочков сердца — в 33 (53,2%), причем зачастую в сочетании с другими кардиальными пороками.

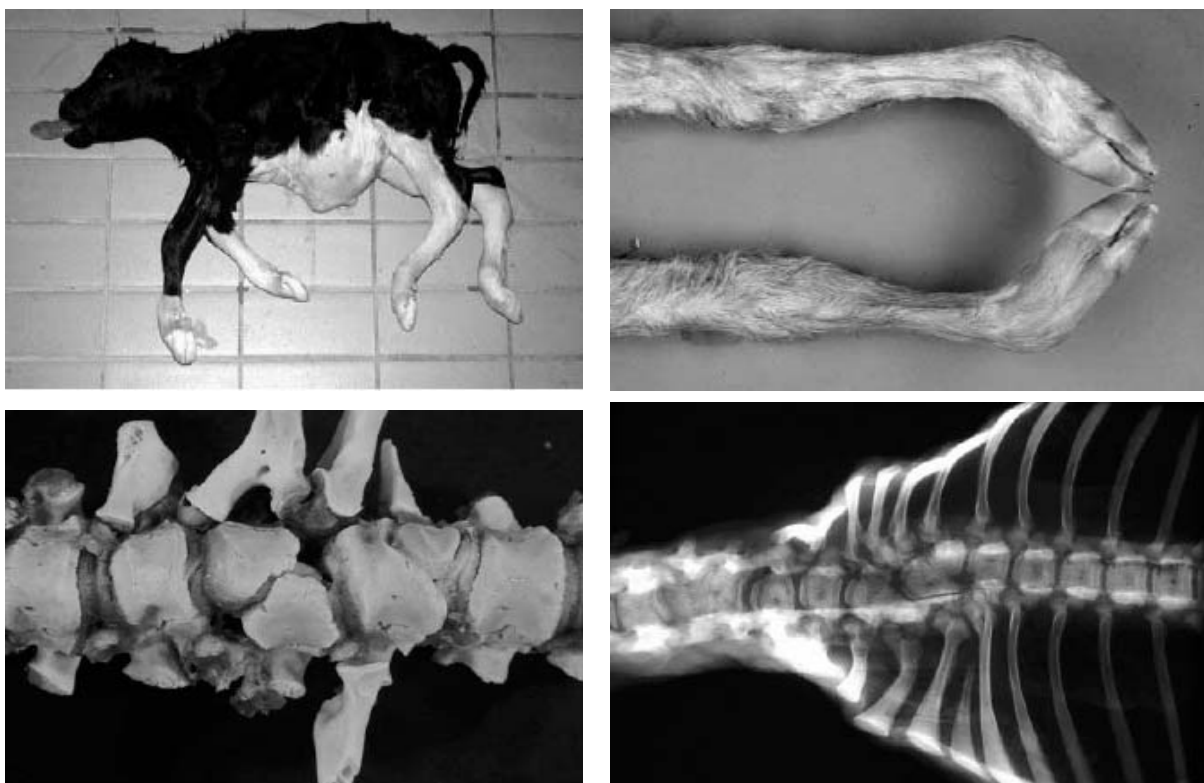


Рис. 44. Признаки комплексного порока позвоночника, CVM (фотографии с официального сайта журнала ветеринарно-диагностических исследований, <http://jvdi.org/cgi/reprint/13/4/283>). а) Внешний вид теленка, больного CVM; б) Симметричное сокращение суставов и выворот фалангов; в) Многократные уродства позвоночника; г) Рентгеновский снимок изменений позвоночника.

Обусловленные CVM физические дефекты могут быть выражены слабо, поэтому точный диагноз, как правило, требует проведения некроскопии или аутопсии для выявления ненормальной изогнутости спины, сросшихся позвонков и сросшихся или отсутствующих ребер. Позвоночные аномалии также сильно варьируют, поэтому для окончательного диагноза могут понадобиться радиографические исследования или анатомия позвоночника. Мертворожденных телят с комплексным пороком позвоночника, особенно тех, кто появляется на свет раньше срока, зачастую относят к обычным случаям недоразвитости и не регистрируют как носителей CVM. В результате между появлением в

стадах данного наследственного дефекта и идентификацией кодирующего его гена прошло более 30 лет.

О комплексном пороке позвоночника впервые сообщили датские исследователи в 2000 г. В дальнейшем появление случаев этой аномалии подтвердили ветеринары США. Однако тип наследования на тот момент не установили. Но в 2001 г. голландские исследователи показали, что SVM вызывается единичным рецессивным геном.

В 2000 г. при проведении оценки по потомству быка Kol Nixon датские ученые открыли ген, обуславливающий развитие SVM. В 2002 г. они же идентифицировали мутацию, вызывающую это заболевание, и разработали генетический тест для выявления скрытых носителей SVM. Проведенные сразу после разработки теста молекулярно-генетические исследования показали, что в Голландии и во Франции около 40% быков-производителей — скрытые носители SVM, в США — 20%, в Италии — 15%, в Канаде — 6% и в Германии — 7%. Полный список быков — скрытых носителей SVM — можно найти на сайте североамериканской ассоциации голштинского скота <http://www.holstein.com>.

Широкое распространение SVM среди голштинского скота позволило предположить, что аллель CV положительно коррелирует с признаками продуктивности, используемыми в качестве критериев в селекционных программах. Для подтверждения или опровержения этой гипотезы ученый Кие с соавторами в 2005 г. изучили влияние носительства SVM на некоторые селекционнозначимые признаки продуктивности (удой, содержание жира и белка в молоке, длительность сервис-периода). Для этого исследовали около 3 млн. записей продуктивных параметров 1,7 млн. дочерей быков с известными генотипами по SVM. Использовали линейную модель, учитывающую влияние стада, года, сезона, способности к получению потомства, возраста первого отела, SVM-статуса быка, условий окружающей среды. У дочерей

— скрытых носителей — удой за лактацию был выше в среднем на 160 кг, выход молочного жира и белка — соответственно на 4 и 5 кг, а сервис-период — длиннее на два дня по сравнению с коровами — не являвшимися носителями этого порока. Таким образом, установили положительную связь аллеля CV со всеми изучаемыми признаками.

Проведенный по племенным записям анализ более 500 тыс. коров показал, что от быков — скрытых носителей SVM — рождалось на 5,83% меньше живых телят, чем от свободных от этого порока. Кроме того, каждый из 38 быков — скрытых носителей — характеризовался меньшим числом живых телят в среднем на корову по сравнению с любым быком — не носителем. SVM широко распространился среди голштинов, потому что этот генетический недостаток оказался у выдающегося быка-производителя К.М. Белла 1667366, который одновременно был носителем другого наследственного порока — дефицита лейкоцитарной адгезии (BLAD). В настоящее время установлено, что К.М. Белл унаследовал это заболевание от своего отца Penstate Ivanhoe Star 1441440, а тот в свою очередь — от матери Penstate Lucifer Anna Star 3279562.

Только в США от К.М. Белла было получено более 79 тыс. дочерей, оцененных по продуктивности, и более 1200 сыновей, оцененных по дочерям. Широкое распространение заболевания произошло не только потому, что от К.М. Белла было получено много дочерей, скрытыми носителями SVM оказались и его выдающиеся сыновья, которые произвели распространившихся по всему миру потомков. Носителями комплексного порока позвоночника были и такие выдающиеся быки, как T Klassy, KOL Nixon, T Burma, Etazon Lord Lily и др. Носителей SVM принято маркировать генетическим кодом CV, а не носителей — TV. Код ставят после индивидуального номера животного.

Высокий процент скрытых носителей SVM в поголовье скота за рубежом грозит распространением этого дефекта и в России. К сожалению,

в нашей стране длительное время ДНК-диагностику заболевания сдерживало то, что патент на мутацию, обуславливающую SVM, был у датских ученых. И только в 2005 г. ВГНИИЖ приобрел лицензию на проведение этой диагностики. Ученые института разработали собственную методику анализа, которая позволяет достоверно выявлять носителей и скрытых носителей SVM. Было изучено распространение SVM среди быков-производителей, использующихся на племпредприятиях России, а также проанализировано происхождение таких животных. Для этого в 2005–2007 гг. из 40 племенных предприятий по искусственному осеменению и племенных заводов России получили пробы спермы или крови 1095 быков-производителей. ДНК выделяли по стандартной схеме. Для диагностики мутации в гене, обуславливающим SVM, использовали методику Центра биотехнологии ВГНИИЖ. Результаты этого исследования приведены в таблице 15.

Таблица 15

Результаты исследования быков племенных предприятий России на SVM

Год исследования	Исследовано племенных предприятий России	Исследовано быков	Выявлено скрытых носителей SVM	
			n	%
2005	14	356	18	5,1
2006	11	245	14	5,7
2007	30	464	7	1,5
Итого		1065	39	3,7

Полученные данные свидетельствуют, что доля быков — скрытых носителей SVM — на племпредприятиях России составляет 3,7%. Это означает, что в среднем 1 из 27 производителей, используемых в системе

искусственного осеменения —скрытый носитель этого наследственного дефекта.

Анализ линейной принадлежности 24 быков — скрытых носителей SVM — показал, что большинство из них относятся к линии Монтвик Чифтейна 95679 (70,8%). В таблице 7 приведены быки-производители из этой линии, сыгравшие роль в распространении SVM в России.

Проникновение SVM в Россию по линии Монтвик Чифтейна 95679 происходит через сыновей К.М. Белла 1667366: Белтона 1892913, С.Б.К. Билл Босса 1882141 CV, Барлея 1964484, К.Б. Джуриста 1875356, а также внуков К.М. Белла 1667366: Боудевайна 829877874 CV, унаследовавшего аллель CV от отца Wardin Bell Gene 1887096, А.П. Хунтера, унаследовавшего аллель CV от отца Art_Acres Bell Pontiac_ET 1878472 CV, и Р. Илтон Дюрхема, унаследовавшего аллель CV от отца Emprise Bell Elton 1912270 CV.

Таблица 16

**Быки линии Монтвик Чифтейна 95679, являющиеся
распространителями SVM в России**

Кличка, № быка, SVM-статус	Страна происхождения
Холим Боудевайн (Holim Boudewijn 829877874 CV)	Голландия
К.Б. Джурист (Kashome Bell Jurist Twin 1875356 CV)	США
Р. Илтон Дюрхем (Regancrest Elton Durham ET 2250783 CV)	США
А.П. Хунтер (Ameldin II Pontiac Hunter 2094527 CV)	США
С.Б.К. Билл Босс (Stan-Bitzie Kirk Bell Boss 1882141 CV)	США
Барлей (Southwind Bell of Bar-Lee 1964484 CV)	США
Белтон (Ca Lill Beltone 1892913 CV)	США

Кроме того, носители аллеля CV были найдены в четырех других линиях: Рефлекшн Соверинга 198998, Говернера 882933, Уэс Идеала 933122 и В.Б. Айдиала. Анализ показал, что проникновение заболевания в Россию происходит главным образом за счет завоза быков-производителей, их спермы или нетелей из Голландии и США, в меньшей степени — из Германии и Канады.

В линии Говернера 882933 SVM распространяется через внука К.М. Белла 1667366 — Дельта Клейтуса 2247419 CV, унаследовавшего аллель CV от своей матери Farlows Bell Rosebud 11202086.

В линии Уэс Идеала 933122 носителем SVM оказался правнук К.М. Белла 1667366 — Ньюхаус Сники 777434192 CV, который, по всей видимости, перенял аллель CV от отца Etazon Jintown ET 2247435, получившего его в свою очередь от дочери К.М. Белла 1667366 Ruann Apples Sauce 10878466.

Интенсивное использование быков — скрытых носителей SVM — в России началось в конце 80-х — начале 90-х годов прошлого века, что позволяет сделать вывод о наличии относительно большого процента скрытых носителей порока среди племенного поголовья, в том числе среди быкопроизводящей группы животных. Это подтверждают результаты исследования дочерей двух быков — скрытых носителей SVM.

От этих быков было получено 216 725 доз семени и 35 541 потомок, в том числе 18 523 сына и 17 023 дочери. Молекулярно-генетическое исследование в случайной выборке из 23 дочерей этих быков показало, что 7 из них (30,4%) оказались скрытыми носителями SVM. Следует отметить, что животных — скрытых носителей SVM — и в настоящее время продолжают завозить в нашу страну из-за рубежа.

Для предотвращения дальнейшего распространения SVM в России и контроля над скрытыми носителями заболевания на станциях искусственного осеменения необходимо проводить тестирование всех

быков-производителей и спермы, а также коров быкопроизводящей группы (около 12 тыс. голов в год).

Применение в селекционных программах быков — скрытых носителей SVM, выявленных в результате такого тестирования, возможно, однако необходимо соблюдать серьезные меры предосторожности. Не оплодотворять, например, их семенем коров, в родословных которых встречаются быки — скрытые носители SVM. Более действенная мера предосторожности — тестирование всего маточного поголовья на SVM. На современном этапе необходимо срочно провести тестирование на SVM всех быков-производителей и коров быкопроизводящей группы, в первую очередь чистопородных голштинских животных. Сложившаяся ситуация нашла понимание в Минсельхозе России, который настоятельно рекомендовал всем племпредприятиям России провести тестирование племенных животных на SVM.

Еще раз подчеркнем, что массовое прилитие крови голштинского скота таит огромную генетическую опасность неконтролируемого распространения SVM у животных черно-пестрой породы, определяющей параметры развития отечественного молочного скотоводства. Кроме того, голштинские быки названных линий работают на ярославской, костромской и других породах, что сопряжено с риском привнесения в них данного дефекта. Поскольку различия между дочерьми скрытых носителей и не носителей незначительные, исключение аллеля CV из популяции голштинского скота существенно не повлияет на продуктивность животных.

Риск же широкого распространения этих и других рецессивных мутаций связан с тем, что для сельскохозяйственных животных характерна полигамия, находящая наибольшее выражение при использовании искусственного осеменения. Средняя нагрузка на производителя в молочном скотоводстве составляет 1000-1500 маток в год. Отсюда

очевидно, что в случае появления носителя мутации среди производителей, вероятность закрепления ее в породе практически равна единице.

Это положение можно в принципе распространить на произвольное число генов. Действительно, помимо рассмотренных выше мы знаем еще множество примеров влияния выдающихся производителей на становление породы. Но, к сожалению, любая медаль имеет обратную сторону. Столь же хорошо известна и роль отдельных производителей в распространении наследственной патологии.

В результате селекции мясного скота на сбитость туловища в США в популяциях был закреплен рецессивный ген карликовости, который широко распространился в Новой Зеландии среди герефордского и ангусского скота. Источником этой мутации были четыре быка, импортированные из Америки. Аналогично несколько быков явились источником распространения среди скота в Новой Зеландии синдрома «волчьей пасти» (расщепленное небо). В 1971 г. в США у джерсейских телят была выявлена полулетальная аномалия, названная «размягчение конечностей» (Лэмб и др., 1976).

Телята-гомозиготы при этом заболевании слабо контролируют движения и не могут встать на ноги, дефект связан с аномальным развитием суставов. Аномалия распространилась в стадах от быка Фаворита Командо и его дочери Марлоу Миледи, оказавшихся гетерозиготами по данному гену. Среди 11 потомков Марлоу Миледи не было ни одного гомозиготного животного. Но у ее дочери, Марлоу Миледи Фейшон Плейт, гетерозиготными были 2 сына, 6 внуков и 2 правнука.

В конце 80-х годов у крупного рогатого скота был выявлен генетический дефект, связанный с повышением эмбриональной смертности. В результате биохимических исследований было показано, что он обусловлен мутацией, нарушающей работу фермента

уридинмоносинтетазы, и получил обозначение DUMS (дефицит по уридинмоносинтетазе). Экономический эффект, наносимый этим заболеванием настолько велик, что международные организации по племенной работе стали в обязательном порядке включать сведения о наличии DUMS у животных в племенные каталоги.

Вопросы для самопроверки по теме 10.

1. Врожденные иммунодефициты у животных
2. Генетическая природа BLAD.
3. Распространение BLAD по странам мира и в России.
4. Распространение BLAD среди голштинской породы.
5. Связь BLAD с продуктивностью .
6. Множественный порок позвоночника (CVM) у крупного рогатого скота.
7. Генетическая природа CVM.
8. Распространение CVM по странам мира и в России.
9. Распространение CVM среди голштинской породы.
10. Связь CVM с продуктивностью .
11. Роль производителей в распространении BLAD, CVM, DUMS и других рецессивных мутаций.
12. Методы профилактики. Проблемы связанные с диагностикой рецессивных мутаций.

Глава 11. Прионные болезни

Классификация, этиология, распространение и механизм развития прионных болезней. Генетический полиморфизм прионового гена. Видовые и породные различия. Анализ генетической устойчивости на примере скрепи.

В последние два десятилетия во многих странах мира внимание исследователей было приковано к проблеме заболеваний, первоначально получивших название вялотекущих или «медленных инфекций». Эти болезни характеризуются длительным латентным периодом от 1 года до 30 лет, медленным течением, отсутствием признаков воспаления и иммунного ответа и неизбежным летальным исходом. Вялотекущие «инфекции» относятся к нейродегенеративным заболеваниям, сопровождающимся сходными дегенеративными изменениями в головном мозге. В результате дегенерации и вакуолизации нейронов серое вещество мозга приобретает губкообразную структуру. В связи с этим данные заболевания относят к трансмиссионным губкообразным энцефалопатиям – TSE (transmissible spongiform encephalopathies). Принято различать инфекционную, наследственную и спорадическую формы TSE. В таблице 17 приведены некоторые клинические характеристики ряда трансмиссионных энцефалопатий, встречающихся у разных видов животных и человека.

С болезнями этого типа человечество знакомо давно. Наиболее известна TSE овец – скрепи или почесуха. Первые упоминания о скрепи в Великобритании относятся к 1732 г. К трансмиссионным энцефалопатиям у животных относят TSE норок, губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота (BSE - bovine spongiform encephalopathy), хроническую изнуряющую болезнь оленей и лосей, губкообразную энцефалопатию кошек и энцефалопатию экзотических копытных (куду, ньяла и др.).

Таблица 17

Инкубационный период и продолжительность TSE у разных видов
в естественных условиях (по В.Г. Орлянкину, 1998)

Название болезни	Вид-хозяин	Инкубационный период (мес.)	Продолжительность болезни (мес.)	Исход
Скрепи	Овцы, козы	24-60	2-6	Летальный
Трансмиссионная энцефалопатия норка	Норка	7-12	1-2	Летальный
Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота	Крупный рогатый скот	36-96	2-4	Летальный
Куру	Человек	60-360	3-12	Летальный
Болезнь Кретцфельда-Якоба	Человек	18-360	1-55	Летальный

BSE впервые диагностирована в Англии в 1986 г. К середине 1997 года (Орлянкин В.Г., 1998) было зарегистрировано 1683036 подтвержденных случаев болезни. Пораженными оказались 67 % ферм молочного и около 16 % ферм мясного скота. В Ирландии было зарегистрировано 188 случаев заболевания, 228 – в Швейцарии, в Португалии – 61, во Франции – 28, 5 – в Германии, по 2 – в Италии, Голландии, Омане и по 1 случаю в Дании, Канаде и на Фолклендских островах. Более 100 случаев отмечено у животных в зоопарках. В рамках борьбы с эпидемией уничтожено 1,3 миллиона голов крупного рогатого скота. Однако, несмотря на это в мире продолжают регистрироваться

случаи BSE. Ряд новых случаев этого заболевания был зарегистрирован в конце 1999 г. и начале 2000 г. во Франции.

К концу 2000 года эта проблема остро встала перед Западноевропейскими странами, в том числе только в Германии в целях профилактики BSE подлежит уничтожению несколько десятков тысяч голов скота. Столь жесткие карантинные меры связаны с высокой устойчивостью патогенного начала к внешним факторам. Продукты, полученные от больных животных, сохраняют патогенные свойства даже после длительного автоклавирования. Единственный известный надежный способ профилактики TSE у животных – полное уничтожение трупов.

Известны эти заболевания и у человека. К ним относятся куру, болезни Кретцфельда-Якоба, Герстмана-Штройслера-Шайнкера и летальная семейная бессонница.

Длительное время этиология TSE оставалась неясной. В частности, в отношении природы скрепи был выдвинут ряд гипотез: паразитарная, генетическая, вирусная, вириодная, белковая, полисахаридная, мембранная и др. Приоритет, отдаваемый гипотезам об инфекционной природе скрепи, обусловлен тем, что в ряде экспериментов была показана возможность передачи болезни овцам и козам.

Гипотеза о вирусной природе базировалась на таких данных, как малые размеры возбудителя, фильтруемость, инфекционная активность и неспособность расти на питательных средах. Возражения против гипотезы были основаны на высокой устойчивости инфекционного агента к ультрафиолетовым лучам, ионизирующей радиации и нуклеазам.

Вириодная гипотеза была высказана после открытия нового класса инфекционных агентов – вириодов. Отличительной чертой вириодов является то, что они представляют односпиральную кольцевую форму РНК длиной от 246 до 375 нуклеотидов, некодирующую собственный белок и размножающуюся за счет клеточной ревертазы. Однако эта

гипотеза входила в противоречие с тем фактом, что возбудитель скрепи очень устойчив к действию рибонуклеаз.

Остальные гипотезы носят умозрительный характер и противоречат положениям молекулярной биологии. Вместе с тем очевидно, что возбудитель скрепи отличается от всех инфекционных агентов. В 1982 г. американский исследователь Прушинер выдвинул гипотезу, что TSE у человека и животных вызываются прионами – белковыми инфекционными частицами (proteinaceous infectious particles), не содержащими нуклеиновой кислоты. Казалось, что взгляды Прушинера идут в разрез со всеми представлениями современной биологии. Неслучайно многие ученые отнеслись к прионной концепции скептически. Но эти предположения базировались на объективных данных.

К началу 80-х годов Прушинер предложил довольно простой метод выделения инфекционного агента скрепи. После обработки суспензии мозга сирийских хомячков, зараженных скрепи, нуклеазами, протеазами и очистки был выделен агент, вызывающий данное заболевание. В последующем этот фактор был выделен практически в чистом виде. Оказалось, что большая часть инфекционной фракции состоит из одного белка с молекулярной массой 27-30 килодальтон (кД), обозначенного как прионный белок (PrP – prion protein).

Электронно-микроскопическими исследованиями удалось выявить в очищенных препаратах палочковидные структуры длиной 100-200 и диаметром 10-20 нм, состоящие примерно из 1000 молекул PrP. Все попытки обнаружить в этих препаратах нуклеиновую кислоту оказались безрезультатны, и вместе с тем данная фракция обладала инфекционностью, т.е. свойством, присущим только способным к размножению и, главное, к передаче своих качеств живым организмам.

Так что же такое прионы: организмы без нуклеиновых кислот или белок способный к саморазмножению? Снова замаячило на горизонте

облачко, грозящее обратиться в бурю. Возникло явление, которое могло поставить под сомнение не только справедливость центральной догмы, но и многих положений современной генетики. Однако новое в науке никогда не отменяет полностью старого. Дальнейшее изучение прионов позволило понять их место в системе современных взглядов на наследственность.

Решающим в понимании природы прионов явился тот факт, что эти белки были обнаружены во многих органах и тканях человека и животных. Преимущественно же они выявляются в центральной нервной системе. И что самое интересное – у всех особей. Методами молекулярного анализа было показано, что длина молекулы прионного белка составляет у различных представителей отряда грызунов 254 аминокислотных остатка, у овец и норок – 256, у свиней – 257 и 264 – у крупного рогатого скота. Оказалось что прионы, вернее прионоподобные белки, синтезируются на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума и быстро транспортируются в секреторных везикулах на наружную мембрану клетки.

В процессе транспортировки происходит созревание (процессинг), в ходе которого от белка отщепляется сигнальная N-концевая последовательность и к двум аминокислотным остаткам присоединяются олигосахаридные цепочки. Отщепляется и C-концевая последовательность, замещаясь на гликозилфосфатидилинозитол, который и удерживает зрелый белок на наружной клеточной мембране. Эти белки обозначили как PrP^C, а белки, выявляемые у больных особей – PrP^{Sc}.

Но какова же биологическая роль этого соединения? Ответ на этот вопрос дало изучение мутантной линии мышей, у представителей которой прионы не синтезируются. Оказалось, что у безприонных мышей нарушаются циркадные (околосуточные) ритмы и сон. Картина течения болезни у них напоминает клиническое проявление летальной семейной

бессонницы у человека. Полагают, что прионы обеспечивают функционирование синапсов нейронов.

Расшифровка аминокислотных последовательностей N-концевого участка прионного белка позволила синтезировать зонд для выявления прионного гена. Ген PrP^{Sc} оказался локализован на 20 хромосоме у человека, 2 – у мыши и 14 – у серебристо-черной лисицы, и 13 – хромосоме крупного рогатого скота, у остальных видов его хромосомная локализация пока неизвестна.

Размер PrP-гена составляет примерно 16 т.п.н. Ген содержит 3 экзона и 2 интрона. В зависимости от вида длина экзонов составляет соответственно 19-47, 98 и 2000 п.н. Первый и второй экзоны не кодируют синтеза белка и образуют 5'-нетранслируемую лидерную последовательность зрелой мРНК. Третий экзон содержит открытую рамку считывания длиной 762 п.н., короткая 5'- и длинная 3'-концевые области этого экзона не транслируются. Промотор не содержит ТАТА-последовательность («ящик Хогнесса»), а включает GC- богатые последовательности и сайты связывания с белковыми факторами транскрипции.

Открытие гена, кодирующего прионоподобные белки, позволило объяснить существование наследственно обусловленных форм TSE. У человека было выявлено более 20 мутаций этого гена. Оказалось, что мутация 102 кодона, приводящая к замене пролина на лецитин, приводит возникновению болезни Герстмана-Штройслера-Шайнкера. Установлено, что это заболевание также связано с мутациями 117 кодона с заменой аланина на валин, 198 с заменой фенилаланин - серин и 217 с заменой глутамин – аргинин.

В основе наследственно обусловленных форм болезни Крейтцфельда-Якоба лежат три мутации: кодонов 178 с заменой аспаргиновой кислоты на аспаргин; 208 аргинин – гистидин и 210 валин – изолейцин. У пациентов с

наследственной болезнью Кретцфельда-Якоба наряду с точковыми мутациями обнаружены и вставки, обеспечивающие кодирование от двух до девяти повторов из восьми аминокислотных остатков.

Интересно отметить, что мутация в кодоне 178 приводит к болезни Кретцфельда-Якоба, если 129 триплет кодирует валин, а в случае мутации этого кодона, приводящей к замене валина на метионин, развивается семейная летальная бессоница. Таким образом, полиморфизм 129 триплета влияет на развитие наследственного заболевания. У человека также выявлен полиморфизм нормального прионного гена, связанный с мутациями триплетов 171 (аспарагин или серин) и 219 (глутаминовая кислота или лизин).

В процессе изучения этиологии TSE обнаружился интересный факт: оказалось, что полиморфизм прионного гена влияет не только на характер клинического проявления болезни, но и на устойчивость организма к прионной инфекции. Выявленный у овцы PrP^C полиморфизм, обусловленный точковыми мутациями, затрагивает семь кодонов: 112, 136, 137, 141, 154, 171 и 211. Наиболее интересными из них оказались случаи полиморфизма, затрагивающие 136 (валин или аланин) и 171 (глутамин или аргинин) триплеты. Оказалось, что овцы с генотипом 136 (валин/аланин) и 171 (глутамин/глутамин) высокочувствительны к возбудителю скрепи. Животные с генотипами 136 (аланин/аланин), 154 и 171 (аргинин/аргинин) наиболее резистентны к скрепи. Менее чувствительны к этому заболеванию и овцы генотипа 171 (аргинин/глутамин). Полиморфизм по кодонам 136 и 171 выявлен в популяциях овец Великобритании, Франции, Голландии и Японии.

У коз полиморфизм затрагивает кодоны 142 (изолейцин или метионин), 143 (гистидин или аргинин) и 240 (серин или пролин). У гетерозигот по 142 триплету, в сравнении с гомозиготами 142

(изолейцин/изолейцин), наблюдается удлинение инкубационного периода после заражения их BSE и скрепи.

Скрепи – медленно прогрессирующая болезнь овец и коз, протекающая с симптомами поражения центральной нервной системы и развитием в головном мозге изменений, характерных для губкообразной энцефалопатии. Это одна из старых медленно текущих инфекций, вызываемая прионом и относящаяся к группе заболеваний под общим названием «трансмиссивные губкообразные энцефалопатии» (TSE).

Чтобы подтвердить наличие заболевания у овец и коз, имевших при жизни симптомы Скрепи в виде поражения центральной нервной системы и убитых в терминальной стадии болезни проводят гистологическое исследование головного мозга животных (Методические указания по патогистологической диагностике прионных инфекций животных, - Минсельхозпрод России, Деп. Ветеринарии. - 06.05.1997, N. 13-17-2/939). Для проведения прижизненной диагностики патогенного приона, персистирующего в организме животного или находящегося в клеточных культурах, применяют метод диагностики с использованием иммуноблотинга и иммуногистохимии на скрепи-ассоциированные фибриллы (SAF), аллель-специфической гибридизации к иммобилизованным ПЦР продуктам, с использованием метода дот блот гибридизации с ³²P мечеными пробами. Возбудитель болезни – инфекционный белок «прион»–специфический сиалогликопротеин, образующий в головном мозге бляшки скрепиассоциированных фибрилл, отличается чрезвычайно высокой устойчивостью к действию физических и химических факторов (Методические указания по патогистологической диагностике прионных инфекций животных, 1997. №13-17-2/939) Прионы не способны вызвать острую форму инфекции, что связано, видимо, с медленным процессом «перерождения» в зараженном организме неинфекционного клеточного белка PrPC (C от англ. cell – клетка) –

нормального компонента тканей млекопитающих (в том числе и человека) – в инфекционный прионный белок PrP^{Sc} (Sc от англ. scarpie – названия наиболее распространенной в природе прионной инфекции овец и коз) (Prusiner S., 1991; Hunter N., 1997).

Диагностика указанной инфекции основана на гистологическом исследовании головного мозга животных, имевших при жизни симптомы поражения центральной нервной системы и убитых в терминальной стадии болезни (Методические указания по патогистологической диагностике прионных инфекций животных, 1997).

Прижизненную диагностику патогенного приона, персистирующего в организме животного или находящегося в клеточных культурах возможно проводить с использованием иммуноблотинга и иммуногистохимии на скрепи-ассоциированные фибриллы (SAF) (vanKeulen, L. J. M., et al., 1996; Buschmann A., et al., 2004). Данный способ констатирует факт наличия или отсутствия самого прионового белка, его тканевую локализацию, и определяет уровень его экспрессии.

Для диагностики устойчивости овец и коз к скрепи можно использовать анализ аминокислотных последовательностей гена прионового белка – нормального компонента клеток млекопитающих. Ген прионового протеина (PrP) расположен на 13 хромосоме овец, имеет белоккодирующую область в 3 экзоне, состоящую из 768 нуклеотидов, что соответствует 256 аминокислотам (Basler K., et al., 1986; Westaway D., et al., 1994; Lee I.Y., et al., 1998). Данный способ диагностики основан на выявлении мутаций в трех наиболее значимых кодонах (136, 154, 171), ассоциированных с устойчивостью или, наоборот, чувствительностью животных к скрепи (Goldmann W., et al., 1990; Goldmann W., et al., 1991; Goldmann W., et al., 1994; Baylis M., et al., 2004).

Известен также способ диагностики устойчивости овец к скрепи на основе полиморфизма гена прионового протеина с использованием

денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE) (Laplanche J.L., Chatelain J, et al., 1993). К недостаткам этого метода относится использование дорогостоящего оборудования и токсичных для здоровья человека реактивов.

Во многих лабораториях мира диагностируют скрепи на основе стандартного метода полимеразной цепной реакции с последующим определением полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) (Belt P.V., et al., 1995; Yuzbasian-Gurkan V., et al., 1997; Lockley A.K., et al., 2000; Lühken G., et al., 2004), на основе аллель-специфической гибридизации к иммобилизованным ПЦР продуктам (Hunter N., et al., 1997), с использованием метода дот-блот гибридизации с ^{32}P мечеными пробамми (Ishiguro N., et al., 1998).

Для диагностики устойчивости овец к скрепи применяют и анализ секвенированных последовательностей гена прионового белка (Junghans F., et al., 1998). Данный способ наряду с высокой точностью является очень трудоемким и дорогостоящим. Точный результат секвенирования возможен лишь при наличии высокомолекулярной ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты – носителя наследственной информации), современного оборудования и высококвалифицированного персонала.

Метод пиросеквенирования является одним из самых современных методов диагностики точковых мутаций. Нами предложена методика выявления полиморфизма гена прионового протеина с последующей идентификацией группы устойчивости животного к патогенному приону на базе метода ПЦР с последующим пиросеквенированием (рис.. 45).

Прибор, позволяющий выполнять пиросеквенирование, компактен, прост и надежен в управлении разработан фирмой Pyrosequencing AB. Технология пиросеквенирования базируется на детекции светового сигнала, появляющегося в результате каскада ферментативных реакций

при включении каждого следующего нуклеотида в одноцепочечную ДНК матрицу. Данный способ позволяет проводить генотипирование и анализ мутаций в режиме реального времени, исключая использование рестриктаз

Однако наличие мутантных форм, т.е. собственно прионов, казалось бы, все равно, не может объяснить инфекционной природы прионных болезней. Объяснение этого феномена было получено в результате изучения конверсии (перестройки) третичной структуры PrPC белка при его контакте с инфекционным прионом (PrPSc-форма).

При изучении третичной структуры PrPC и PrPSc оказалось, что PrPC форма содержит в основном α -спирали, тогда как для патогенной формы характерно большое количество β -складчатых структур. Бутлер и другие (1992, 1996) установили, что конверсия прионов является постранслационным процессом, включающим глубокие конформационные изменения, лежащие в основе размножения прионов. Сущность этих изменений заключается в следующем: β -складчатая структура PrPSc связывается с первой и второй α -спиральной областью PrPC, образуя PrPSc/PrPC комплекс. К комплексу присоединяется белок X, который может действовать как молекулярный шаперон и участвовать превращении α -спирали в β -складчатые структуры. Полученный PrPSc прион взаимодействует со следующей PrPC молекулой, превращая ее в инфекционную форму, т.е. процесс образования инфекционного белка идет по типу цепной реакции. Но синтез PrPC в инфицированной клетке не нарушается, так как сама ее генетическая программа остается без изменения.

Полагают, что возникновение эпидемии BSE в Великобритании было обусловлено скармливанием мясокостной муки, полученной от использования боенских отходов овец, больных скрепи. Факт межвидовой передачи прионных болезней был подтвержден экспериментально на лабораторных животных (Прушинер и др., 1993, 1994; Вейсманн, 1996).

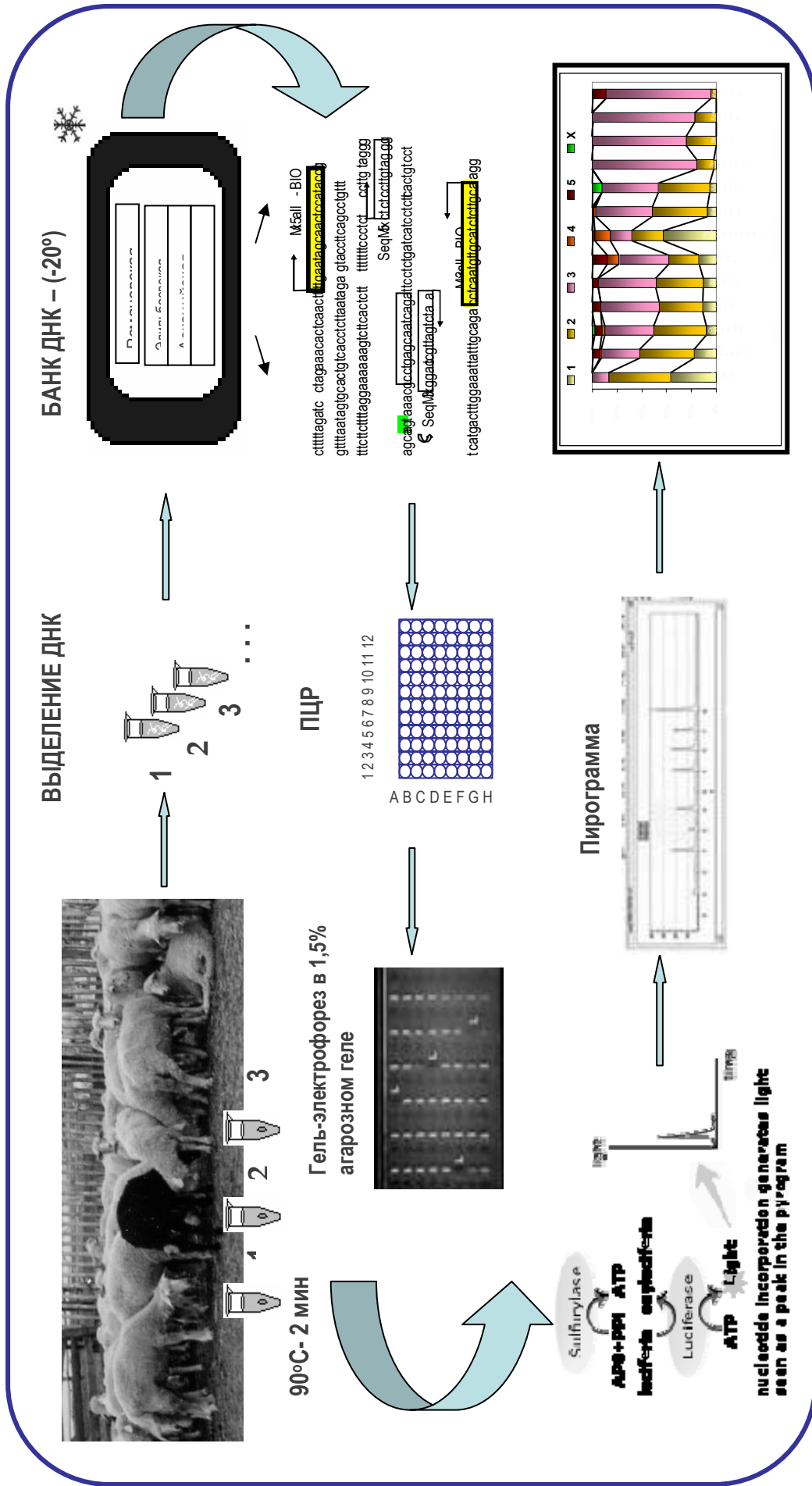


Рис. 45. Схема диагностики полиморфизма PRNP овец с использованием технологии пиросеквенирования.

Установлено, что чем больше гомология в участке прионного белка между 90 и 130 аминокислотными остатками у «вида-донора» и «вида-реципиента», тем интенсивнее происходит конверсия под влиянием инфекционного белка. Показано, что новая форма болезни Крейтцфельда-Якоба и BSE вызываются одним штаммом приона. К 2000 г. в Скандинавии уже выявлены случаи TSE у человека, предположительно связанные с использованием в пищу мяса больных коров. Официальные сведения об инфицировании людей BSE в России отсутствуют.

В ряде случаев конверсия может происходить спонтанно. Очевидно, провоцирующим фактором здесь могут выступать природные β -складчатые структуры, встречающиеся в небольшом количестве (3 %) среди PrPC форм. Однако вероятность этого составляет всего лишь 0,5-1 случаев на миллион особей.

Таким образом, в результате работ Прушинера, отмеченных в 1997 г. Нобелевской премией по физиологии и медицине, было дано объяснение этиологии наиболее странных и опасных болезней из числа известных человеку. Возможность участия измененных белков в качестве инфекционного агента была высказана в конце 60-х лет Гриффитом и Аплером с соавторами (1967). Не является феноменом и факт горизонтальной (инфекционной) и вертикальной (от родителей к детям) передачи одного и того же заболевания. Основная заслуга Прушинера, отмеченная Нобелевским комитетом – это доказательство прионной природы TSE.

Вопросы для самопроверки по теме 11.

1. Общие особенности прионных болезней
2. История вопроса.
3. Распространение прионных болезней.

4. Этиология прионных болезней
5. Что такое прионы? Их свойства.
6. Механизм прионной инфекции.
7. Факторы риска при межвидовом заражении.
8. Генетическая предрасположенность к развитию прионной инфекции.
9. Методы диагностики.
10. Методы профилактики.

Глава. 12. Применение генетических маркеров I и II типа в филогенетических исследованиях

Анализ генетической близости видов. Анализ дивергенции пород. Генетические расстояния. Кластерный анализ.

Попытки использовать различные генетические подходы в систематике последовали сразу же, как только появилась возможность реально оценить уровень генетического сходства или различия видов. К решению задачи об оценке степени генетического сходства или дивергенции таксономических групп был привлечен ряд подходов от изучения сходства тотальной ДНК разных видов, до анализа нуклеотидных замен в ядерных или митохондриальных генах.

В основе первого метода получение гибридных молекул ДНК разных видов и оценка степени их гомологии. Однако данный подход характеризует лишь общую степень сходства или различия видов, но не позволяет конкретизировать: за счет чего произошла дивергенция видов или наоборот, что является общим для геномов этих видов. Кроме того, данный метод не позволяет установить, чем именно обусловлены эти различия в наследственном материале: генными мутациями, рекомбинацией наследственного материала или сочетанием этих факторов.

Для сравнения нуклеотидных последовательностей гомологичных генов был разработан мощный математический аппарат (Ратнер В.А. и др., 1985). Но возможности его также ограничены, ибо он не учитывает различия, связанные с рекомбинацией генетического материала.

К концу прошлого столетия были накоплены данные, свидетельствующие о наличии определенного сходства в организации генных порядков (групп сцепления и их сочетаний) у разных видов. В связи с чем возникла необходимость количественной оценки этого сходства.

Для оценки меры сходства организации геномов Захаровым И.А. с соавт. (1991) была предложена комбинаторная мера сходства. В основу этой меры положено соотношение между числом пар сцепленных генов и общим числом пар генов у сравниваемых видов [12.1]:

$$S=m/n [12.1],$$

где m - удвоенное число сцепленных пар, а общее число пар у двух сравниваемых видов.

При известном порядке расположения генов на хромосоме уравнение [1.1] принимает следующий вид:

$$s=S(m_i-1)/S(n_j-1) [12.2],$$

где m_i - число генов в i -группе сцепления, n_j - число генов, принадлежащих к j -хромосоме.

В том случае, если порядок генов не известен, выражение [12.1] принимает следующий вид:

$$s=S m_i(m_i-1)/S n_j(n_j-1) [12.3].$$

Позднее Кленовицким П.М. и Марзановым Н.С. (1996,1997) была предложена информационная мера генетического расстояния, позволяющая учесть роль перестроек как отдельных хромосом, так и внутри хромосом с учетом принадлежности генов к хромосомным структурам. Например, можно провести расчет с учетом принадлежности генов к определенным плечам хромосом. Критерий расстояний в данном случае выводится из симметризованного информационного коэффициента связи (Елисеева И.И. и Рукавишников В.О., 1977) и имеет следующий вид:

$$S=[H_a(b) + H_b(a)] / [H(a) + H(b)] [12.4].$$

В таблице 18 данные об уровне различий генных порядков для трех наиболее исследованных видов полученные Марзановым Н.С. и Кленовицким П.М. (1997). Эти данные свидетельствуют о высокой

степени сходства организации геномов у сравниваемых видов. Аналогичные результаты были получены И.А.Захаровым и др. (1996).

Таблица 18

Рекомбинантные генетические расстояния

Сравниваемые виды	Овца	Свинья	Мышь	Человек
Бык	0,065	0,188	0,303	0,172
Овца	-	0,133	0,262	0,198
Свинья	-	-	0,279	0,173
Мышь	-	-	-	0,383

Приведенные в таблице 18 материалы указывают на то, что в организации геномов разных видов млекопитающих прослеживается зависимость аналогичная закону гомологичных рядов Н. И. Вавилова. В основе ее лежит обусловленный особенностями строения хромосомной ДНК запрет на случайную рекомбинацию между негомологичными хромосомами.

Хотя позднее в основу оценки сходства организации геномов были положены методы, основанные на хромосомном пайнтинге, работы И.А. Захарова и его последователей сохраняют свою значимость. То связано с тем, что, хотя использование многоцветного мечения хромосом наглядно подтверждает высокий консерватизм генных порядков у разных видов, этот метод является качественным и не позволяет оценить степень сходства геномов у разных видов.

Мы рассмотрели здесь методы оценки генетической близости видов, однако, необходимо отметить, что для решения этой задачи на уровне пород и стад необходимы другие подходы.

В генетике домашних животных вопрос об оценке генетического сходства наиболее детально разработан на основе иммуногенетических

маркеров. Подробный обзор по этому вопросу приведен в монографии Марзанова Н.С. (1991).

Эти методы основаны на сравнении генных частот и в подавляющем большинстве случаев не приемлемы для характеристики межвидовых различий. Использование анонимных нуклеотидных последовательностей также дает в этом плане весьма ограниченную информацию, так как эти маркеры характеризуются высокой видовой специфичностью и могут быть использованы лишь при сравнении близкородственных видов (Кленовицкий П.М. и др., 2004). Но и иммуногенетический и молекулярно-генетический методы оказались достаточно эффективными при решении вопросов осуществления генетического контроля над селекционным процессом.

В том числе для решения задачи оценки генетического сходства стад в пределах породы, а также различных пород. Традиционный зоотехнический подход, основанный на генеалогическом анализе структуры, является довольно эффективным приемом контроля селекционного процесса, но при этом отсутствует количественная оценка сходства разных стад.

Использование различных полиморфных систем позволяет контролировать генетическую структуру популяций, пород и стад и оценить степень их генетического сходства. Тем самым в руки селекционера дается инструмент, позволяющий оценить влияние систем разведения животных на генетическую структуру стад. Разумеется, сравнение генетической структуры разных групп животных не является самоцелью: в совокупности с анализом динамики продуктивных качеств оно служит критерием выбора селекционной стратегии.

Рассмотрим основные методы сравнения генетической структуры популяций. В простейшем случае, когда число генов и их аллелей невелико (примером чему может служить белковый полиморфизм), анализ

может быть ограничен прямым сравнением аллельных частот. Но при сравнении структур популяций по большому числу генов и их аллельных форм такой подход к решению данной задачи трудоемок.

В этом случае пользуются интегральными показателями, основанными на использовании аллельных частот. В качестве таких показателей предложен целый ряд коэффициентов генетического сходства или различия (Марзанов Н.С., 1991). В зависимости от отсутствия или наличия генетического сходства между сравниваемыми группами величина всех этих критериев лежит в интервале от 0 до 1.

Мы разберем лишь два из них: коэффициенты генетического сходства Серебровского и Нея. Подробное описание критериев, предложенных для этой цели другими авторами, и их анализ даны в монографии Н.С. Марзанова (1991).

Первым расчет метода оценки генетического сходства разработал А.С. Серебровский (1970). Им было предложено два критерия для оценки генетического расстояния между популяциями, основанных на сравнении частот аллелей:

$$d^2 = Sd^2/m \quad [12.5] \text{ и}$$

$$d = (Sd^2/m)^{1/2} \quad [12.6], \text{ где:}$$

m – число аллелей по которым идет сравнение;

$d = (x_i - y_i)$, а x_i и y_i – частоты i -того аллеля в сравниваемых популяциях.

Формула генетического сходства по Серебровскому имеет следующий вид:

$$r = 1 - d \quad [12.7].$$

В 1972 г. М. Ней предложил для оценки генетического сходства использовать следующую формулу:

$$I = I_{xy} / (I_x I_y)^{1/2} \quad [12.8], \text{ где:}$$

$$I_{xy} = \sum x_i y_i, \quad I_x = \sum x_i^2, \quad I_y = \sum y_i^2,$$

а x_i и y_i имеют тоже значение, что
и в формуле Серебровского.

Генетическое расстояние по Нею находится по формуле:

$D = -\ln I$ [12.9], где:

$\ln I$ – натуральный логарифм от I .

Несмотря на простоту расчетов по формуле Серебровского [12.6], при малых значениях частот она дает смещенную оценку генетических расстояний. Поэтому для практических целей лучше всего использовать формулу Нея [12.9].

В том случае, если число сравниваемых групп или пород превышает 2, прибегают к построению схем генетической соподчиненности или дендрограмм. В основе этого построения лежит метод кластерного анализа, сущность которого сводится к последовательному поиску максимально сходных между собой групп.

Проиллюстрируем сущность данного метода на примере анализа рекомбинантных генетических расстояний между видами (табл. 18).

Сначала находим наименьшее значение генетического расстояния. В данном случае это расстояние между крупным рогатым скотом и овцами, оно равно 0.065. Объединяем эти группы в единый кластер – А. Далее рассчитываем среднее расстояние между новым и оставшимися видами. Исключаем из анализа соответствующие строки и столбцы, относящиеся к крупному рогатому скоту и овцам, и вводим вместо них в качестве новой группы кластер – А. Расстояние между новым кластером и остальными видами равно среднему арифметическому между ними и видами, вошедшими в этот кластер. Для удобства расчетов может быть построена вспомогательная таблица, включающая новый кластер и оставшиеся виды.

Повторяем все процедуры, описанные выше. Минимальное расстояние в данном случае равно 0,1605 – кластер – А и свинья.

Объединяем их во второй кластер – В и строим новую вспомогательную таблицу в соответствии с указанными выше правилами. Число столбцов и строк в таблице с каждым шагом уменьшается на единицу. При этом необходимо помнить следующее: расстояния, характеризующие кластер, рассчитывают как среднее по всем входящим в него группам (табл.10).

Получаем, что наиболее близок к кластеру – В человек и наиболее удалена мышь. Расстояние между кластером – В и человеком равно 0,181. Объединяем их в кластер – С. Продолжаем расчеты, чтобы определить насколько от кластера – С удален оставшийся вид – мышь. Находим, что это расстояние равно 0,2315. В результате расчетов мы имеем следующий ряд генетических расстояний: крупный рогатый скот и овца – 0,065 (кластер – А), кластер – А и свинья – 0,1605 (кластер – В), кластер – В и человек – 0,181 (кластер – С), наконец кластер – С и мышь – 0,2315. На основании полученного ряда генетических расстояний строится дендрограмма – графическое отображение генетической близости сравниваемых групп животных.

Мы рассмотрели простейший пример, когда кластеры образуются путем последовательного объединения групп. Возможна и более сложная структура массива, характеризующаяся наличием нескольких центров. В этом случае после выявления первого кластера выделяется одна или несколько независимых от него пар пород (популяций). В связи с трудоемкостью подобных расчетов разработан ряд компьютерных программ для кластерного анализа.

Результаты кластерного анализа могут быть использованы для оценки расхождения различных популяций под давлением селекционного процесса и естественного отбора, а также в изучении породобразовательного процесса.

Первые работы по использованию генетических маркеров для анализа филогенеза домашних животных связаны с именем А.С.

Серебровского, исследовавшего с сотрудниками в 20 – 30-е годы XX века ряд популяций кур России, Украины и Кавказа. На основании анализа архивных материалов экспедиций А.С. Серебровского и собственных исследований А.А. Никифоров (1999) пришел к выводу, что большинство старых пород кур, разводимых на территории бывшего СССР, могут быть объединены в четыре генетически изолированные группы. Первая – породы центральной нечерноземной зоны России. Вторая – породы, разводимые на Украине, в Северной Осетии и Южном Дагестане. Третья – породы Закавказья, Северного Кавказа и Средней Азии. Особняком от всех пород стоят куры Башкирии.

Основываясь на этих данных, А.А. Никифоров пришел к заключению, что популяции кур на обследованных территориях испытали, как минимум, два миграционных влияния: со стороны Азиатского центра породобразования через Среднюю Азию и Кавказ и со стороны Средиземноморского региона Европы. Азиатское влияние более древнее и значительнее, чем европейское, что отразилось на генетических особенностях старых отечественных пород кур.

Еще один пример. Э.П. Каннинхем с сотрудниками (1999) на основании анализа полиморфизма сателлитных и митохондриальных ДНК, а также хромосомных маркеров ,пришли к выводу, что африканский крупный рогатый скот является продуктом гибридизации европейского (*B.taurus*) и азиатского скота (*B.indicus*). Причем компоненты ядерной наследственности по своей генетической структуре близки к *B.indicus*, а структура митохондриальной ДНК соответствует таковой у *B.taurus*.

Авторы связывают формирование современного африканского скота с двумя моментами: 1) мусульманской экспансией XIV века, вследствие которой мигранты из Азии способствовали появлению в Африке скота, происходящего от *B.indicus*. 2) устойчивостью этого скота к

кровопаразитарным заболеваниям, широко распространенным в ряде ее районов.

Очевидно, что в исследованиях по филогенезу при интерпретации результатов необходима определенная осторожность, поскольку генетическая структура стад и пород определяется действием всего комплекса рассмотренных выше факторов, и, базируясь только на анализе генетических расстояний, без знания истории формирования стад и пород можно прийти к ошибочным выводам. В двух приведенных выше примерах авторы использовали комплексный подход, основанный на использовании генетико-популяционных и историографических данных. Но не исключено, что дальнейшие исследования данного вопроса могут внести определенные коррективы в представления о путях формирования этих массивов домашних животных.

В заключение необходимо остановиться на следующем моменте. Хотя использование генетических маркеров при филогенетических построениях практикуется довольно широко, необходим крайне осторожный подход при использовании этих методов при сравнении различных таксономических единиц.

Сейчас, спустя почти полтора столетия после работ Дарвина, очевидна необоснованность многих его параллелей между процессами видообразования и становлением различных культурных форм животных и растений. Между микро- и макроэволюцией знак равенства отсутствует. Ясно, что процессы, протекающие в популяциях, не выходят за рамки генного гомеостаза, подтверждением чему служит в частности существование гомологических рядов изменчивости.

Сущность генного гомеостаза заключается в том, что единица наследственности, кодирующая определенный продукт, консервативна и сохраняет свою физиологическую роль вне зависимости от наличия мутационных изменений в ее нуклеотидном составе. Доказательство тому

то, что одни и те же гены даже у таксономически далеких групп, вне зависимости от степени своего консерватизма, контролируют продукт, всегда выполняющий одну и ту же функцию или комплекс сходных функций.

Один простой пример. Последовательность гена 18S рРНК наиболее консервативна в пределах рибосомного повтора млекопитающих. Ген 18S рРНК человека состоит из 1870 п.н., и только на 0,45% эта последовательность отличается от аналогичной последовательности у крысы и на 0,37% у мыши. У всех изученных видов из 1870 п.н. варьирует только 432 п.н.. Оставшиеся 1438 п.н. высоко консервативны (Гоголевская И.К., 1992).

Последовательность гена 28S более вариабельна как по длине, так и по нуклеотидному составу. Установлено, что изменение размера происходит из-за увеличения или сокращения вариабельных последовательностей в 10 – 12 специфических точках внутри молекулы 28S рРНК (Otsuka et al., 1983). И вместе с тем у всех видов оба эти гена кодируют одни и те же продукты – два класса рибосомной РНК и ничего другого.

Можно, конечно, возразить на это, что отбор, отмечая нежелательные мутации, изменяет генетическую структуру популяций. Это совершенно верно, но и только. Главная роль отбора, проявляющаяся на молекулярном уровне, и состоит лишь в сохранении генного гомеостаза. Все известные мутации, закрепленные отбором, являются аллельными вариантами известных генов, а не новыми генами.

Вопросы для самопроверки по теме 12.

1. Селекционный процесс и изменение генетической структуры стада.
2. Методы оценки генетической структуры стада: генетическое сходство и генетические дистанции.

3. Метод Серебровского.
4. Метод Нея.
5. Кластерный анализ.
6. Дендрограммы.
7. Использование генетических маркеров для анализа филогенетических связей.

Глава 13. Генетический контроль в селекции на основе маркеров I и II типа

Генетическая сертификация племенных животных: оценка достоверности происхождения; генотипирование по QTL, главным генам и на носительство рецессивных мутаций. Анализ генетической структуры стад и контроль селекционного процесса.

Генетический контроль селекционного процесса – одна из старых, но не утративших своего значения проблем прикладной генетики. История ее во многом связана со становлением и развитием иммуногенетики животных. Первоначально эта проблема сводилась к генетической экспертизе происхождения и исключению ложных родителей. Поясним суть этого процесса на примере несколько далеком от животноводства, но достаточно наглядном.

У человека карий цвет глаз доминирует над голубым, и, следовательно, у голубоглазых родителей не может родиться кареглазый ребенок. Этот факт столь широко известен, что А. Кристи использовала его в одном из своих детективов. Но вот в обратном случае сделать столь категоричный вывод невозможно. Кареглазые родители могут нести доминантный ген как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии и их ребенок может иметь другой цвет глаз.

Здесь мы сталкиваемся с проблемой зависимости точности экспертного заключения от числа генетически детерминированных признаков. Очевидно, что чем больше генов и их аллельных форм вовлечено в экспертную систему, тем точнее результат экспертизы. В связи с тем, что число генетически детерминированных признаков с четко выраженными фенотипическими различиями у животных не велико, до разработки методов иммуногенетической паспортизации эта проблема в животноводстве оставалась открытой. Однако, несмотря на то, что эксперт оперирует десятками аллелей, иммуногенетический подход, не обладает

стопроцентной точностью, т.к. тот или иной аллель характерен не для отдельной особи, а для группы животных, поэтому более информативными являются редкие и уникальные аллели. Интерес в этом плане представляют не только группы крови, но и другие высокополиморфные системы, в том числе сателлитные ДНК.

Хотя при решении прикладных задач в животноводстве этого порой и достаточно, но с развитием молекулярной биологии появились методы, позволяющие дать индивидуальную характеристику генотипа. Речь идет о так называемой генетической дактилоскопии (фингерпринт или по-русски «отпечатки пальцев»). Как для каждого человека, исключая однояйцевых близнецов, неповторим папиллярный узор на пальцах, так для каждой особи типичен свой генетический «узор», выявляемый методом фингерпринта, причем каждый элемент этого узора генетически детерминирован и пришел от одного из родителей, что позволяет использовать его, в частности, при оценке достоверности происхождения.

Если при использовании классических признаков за основу берется либо внешнее проявление контролирующих их аллелей, либо индикация их с помощью специфических реагентов (выявление групп крови) или же, в случае полиморфизма сателлитов, наработка специфических нуклеотидных последовательностей и анализ их методом электрофореза, то при фингерпринте мы имеем дело не с генами как с таковыми.

В данном случае характер полиморфизма связан с особенностями нуклеотидного состава всей ДНК, содержащей определенные последовательности, узнаваемые различными ферментами рестрикции (рестриктазами), разрезающими в этих зонах молекулу ДНК. Число таких зон (сайтов или точек) рестрикции и их положение в результате мутаций меняются.

Поскольку даже при низком мутационном давлении на единичный ген в одном поколении за время существования видов накопилось

огромное число мутаций, особенно в зонах молчащей ДНК, для каждой особи характерен свой рисунок рестрикции. Следовательно, в основе метода генетической дактилоскопии лежит полиморфизм длин рестриктных фрагментов (ПДРФ), связанный с индивидуальными особенностями расположения точек рестрикции. Для выявления этого полиморфизма используют электрофорез.

Одним из первых методов молекулярно-генетического определения родства был метод фингер-принтинга. Но от него отказались, поскольку он был очень трудоемким и менее точным: выделялись слишком крупные фрагменты ДНК. В связи с тем, что проведение классического фингерпринта и его анализ достаточно сложный и дорогостоящий процесс, в практике используют упрощенные варианты ПДРФ.

Позднее был разработан более простой метод, основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР) и получивший название ПДАФ (полиморфизм длин амплифицированных фрагментов). В его основе лежит использование различных маркеров — «вешек», определенных для каждой хромосомы. Для определения биологического родства берется кровь у матери, отца и ребенка. Выбирают не менее 6 маркеров и сравнивают в них количество повторов. А оно строго индивидуально. Например, у папы в одной паре хромосом может быть 10 и 12 повторов, а у мамы — 6 и 8. У ребенка, следовательно, должно быть 10 и 6, или 10 и 8, или 12 и 6, или 12 и 8 повторов. Только эти варианты возможны у ребенка, если мужчина действительно приходится ему отцом.

Феномен ПДАФ проявляется в том, что в случае ПЦР-амплификации гипервариабельных мини- и микросателлитных генетических матриц (локусов), присутствующих в геноме каждого человека, в ходе реакции образуются фрагменты ДНК, которые у разных людей имеют различную длину и потому оказываются индивидуально специфичными. Эти полиморфные по длине фрагменты, по сути представляющие разные

аллельные варианты полиморфных локусов геномной ДНК, становятся доступными для сравнительного анализа в качестве индивидуализирующих личность признаков. Важно отметить, что в ряду поколений каждый вариант ПДАФ наследуется как простой менделевский кодоминантный признак.

Есть часто и редко встречающиеся маркеры. Если совпадение происходит по редко встречающимся маркерам, вероятность стопроцентна. Если идет совпадение по частым маркерам, желательно увеличить их количество. Вероятность максимальна, если отцовство подтверждается с использованием 6-12 маркеров.

Сейчас на Западе стали применять микрочиповую диагностику, когда на маленькой пластинке (из пластика или другого материала) собраны почти все гены человека. Это похоже на своеобразный генетический «паспорт». У плода будут брать кровь или амниотическую жидкость, выделять ДНК и гибридизировать папин и мамин микрочип. Вначале такие микрочипы будут делать для наследственных заболеваний, а в качестве побочного продукта — для определения отцовства. Собственно говоря, современные методы ДНК-диагностики, используемые в медицине, позволяют не только подтвердить родство, но и определить его степень.

Выше мы упоминали о дактилоскопии, остановимся еще на одном интересном методе генетической экспертизы - дерматоглифтическом. В основе этого метода лежит изучение кожных узоров у животных, главным образом носового зеркала. Оказалось эти узоры также индивидуальны, как отпечатки пальцев человека, причем их элементы обусловлены генетически.

В связи со всем сказанным невольно напрашивается вопрос. Столь ли важно знать точное происхождение животных и исключать ложное родство?

Оказывается, что чем выше доля ошибочных данных, тем сильнее отклоняется оценка производителя по потомству от истинной. Букаровым Н.Г. и др. (1998) было показано, что процент ошибочных записей влияет на оценку уровня наследуемости признака у крупного рогатого скота. Таким образом, ошибки в записях о происхождении оказывают отрицательное влияние на эффективность селекции. Разумеется, влияние доли ошибочных записей на эффективность селекции носит нелинейный характер, т.к. помимо этого на нее влияет различие в продуктивности истинных и ложных потомков, приписываемых тому или иному предку.

Но нельзя ли решить эту проблему чисто организационными мерами, не прибегая к затратам на генетическую экспертизу? Из теории управления известно, что чем сложнее система, т.е. чем больше различных элементов она в себя включает, и разнообразнее связи между этими элементами, тем выше вероятность возникновения ошибок в результате ее деятельности. Неслучайно в сложных технических системах предусматривается дублирование основных узлов и цепей. Но в селекционном процессе этот принцип неосуществим в силу уникальности составляющих его элементов, поэтому его составным элементом является система генетического контроля, одним из элементов которого является выявление генов, ответственных за формирование отдельных признаков животных (в том числе и генетических болезней). Характеристика мутаций в этих генах, влияющих на выражение признака, и изучение распространения таких мутаций у животных разных популяций является актуальной фундаментальной проблемой современной биотехнологии и генетики сельскохозяйственных животных.

В России мобилизация, сохранение и использование генофонда животных с хозяйственно ценными признаками отнесены к приоритетным направлениям развития науки и техники (Пр-577 от 30 марта 2002 г.). Учитывая, что в повышении и эффективном использовании генетического

потенциала сельскохозяйственных животных важную роль играет изучение генетической обусловленности хозяйственно-полезных признаков, генодиагностика была включена в перечень критических технологий Российской Федерации (Пр-578 от 30 марта 2002 г.).

Решение поставленных задач осуществляется молекулярно-генетическими методами анализа, включающими в себя разработку и экспериментальную апробацию аналитических моделей анализа генома по комплексу ДНК маркеров на базе методов ПЦР-ПДРФ, аллельспецифической ПЦР, пиросеквенирования и секвенирования.

Следующее направление, связанное с использованием генетических маркеров в животноводстве – это генетический контроль селекционного процесса. Для его осуществления используют маркеры I и II типов. Из маркеров I типа в подавляющем числе случаев для этой цели используют группы крови и или полиморфные белки крови, но могут быть использованы и другие структурные гены.

Проиллюстрируем использование генетических маркеров для оценки селекционного процесса следующим примером. В стаде племзавода «Пролетарий», разводящего костромскую породу, было изучено последствие влияния интродукции генетического материала и отбора на генетическую структуру стада. Анализировалась частота различных аллелей эритроцитарной В-системы (ЕАВ-антигены) до (1-й период) и после (2-й период) использования в стаде швицких быков американской селекции. Рассчитав, воспользовавшись формулой Нея, насколько изменилась после начала использования швицких быков генетическая структура стада по аллелям В-локуса, рассмотрим, связано ли как-то ее изменение с продуктивными качествами коров.

Всего было изучено 16 аллельных вариантов ЕАВ. Оказалось, что коэффициент генетического сходства между исходным стадом

костромских коров и стадом после интродукции швицких генотипов составляет всего 0,37, а $D=0,99$.

На основании анализа частот антигенов было показано, что результатом интродукции швицкой крови явилась элиминация 8 аллелей В-системы и нарастание концентрации остальных аллелей. Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что в современном стаде костромских коров ГПЗ «Пролетарий» превалируют аллели В-системы, внесенные с кровью швицких быков.

В той же работе Н.А. Поповым с соавторами (1998) показано, что средний уровень молочной продуктивности в группе коров, несущих исчезающие аллели, составил 3633 ± 76 кг при среднем проценте жира равном $3,90\pm 0,02$. У коров, имевших в своем генотипе интродуцируемые аллели, средний удой равен 4530 ± 69 , а средний процент молочного жира – $4,14\pm 0,02$. Эти данные наглядно иллюстрируют связь динамики генетической структуры стада с селекционным улучшением молочной продуктивности коров. Аналогичная картина отмечена при использовании голштинских быков на коровах черно-пестрой породы в ОПХ «Дубровицы» и НПО «Пойма» (Попов Н.А. и др., 1998).

Примером использования групп крови для сравнения генетической структуры стад служит работа П.И. Люцканова (1998) по изучению различных популяций каракульских овец в Молдавии и Узбекистане. На основании анализа встречаемости антигенных вариантов 7 эритроцитарных систем им было показано, что молдавские популяции каракульских овец наиболее близки между собой. Генетическое расстояние между ними составляло 0,27, тогда как популяция каракульских овец Узбекистана имеет своеобразную генетическую структуру. Генетическая дистанция между молдавской и узбекской популяциями в среднем равнялась 0,38.

В качестве примера генетической паспортизации по маркерам первого типа можно рассмотреть данные о распространении различных аллелей гена прионового протеина у овец. Проведенные в ВИЖе исследования показали, что в большинстве изученных пород (в 16-ти из 18-ти), выявлены животные со скрепи резистентным генотипом ARR/ARR, относящиеся к G1 классу устойчивости к скрепи. Данный факт является необходимым условием для проведения дальнейшей селекционной работы в рамках повышения естественной, генетически обусловленной резистентности овец к скрепи. Максимальное процентное соотношение животных с данным классом генотипов было выявлено 3 породах – атырауской, русской длинношерстной и асканийской, что составило 50,00; 42,55 и 36,67% соответственно. В таких породах, как казахская курдючная и манычский меринос, частота встречаемости наиболее желательного генотипа ARR/ARR составила 34,48 и 33,33% соответственно. Далее по частоте встречаемости идет каракульская порода казахской селекции с частотой встречаемости генотипа ARR/ARR на уровне 20,13% в среднем по 5-ти популяциям с вариациями от 3,31% в популяции черного каракуля до 33,33% в казахском суре. В 4-х породах (советский меринос, грозненская, волгоградская, цигайская) число животных, относящихся к первому классу, находилось на уровне 10-18%. У овец ставропольской породы и ромни-марш данный показатель составил чуть больше 7%. Число животных G1 класса в российской популяции каракульской породы, романовской и эдильбаевской породах было минимальным (4,72; 3,08 и 1,96% соответственно), а в таких породах, как калмыцкая и кучугуровская, не было выявлено вовсе. Число животных, относящихся к предпочтительным классам генотипов устойчивости к действию патогенного прионового протеина и объединенных в классы G1 и G2, непосредственно используемые в воспроизводстве, было максимальным в асканийской породе и составляло 86,67%. В большинстве пород этот

показатель был выше 45%. Из грубошерстных овец лишь в стадах животных каракульской породы по сумме двух классов был превышен 45% рубеж (46,45%).

Было показано, что в 9-ти породах: трех тонкорунных (асканийская, северокавказская и маньчешский меринос) и шести грубошерстных (каракульская, эдильбаевская, калмыцкая, кучугуровская, атырауская и казахская курдючная) отсутствуют животные с нежелательными генотипами, которые относят к группам G4 и G5. В этих породах 100% поголовья овец имеют генотипы, относящиеся к первым трем классам G1, G2 и G3. Число животных с редкими генотипами, устойчивость которых к скрепи неизвестна и которые вынесены нами в группу GX, составило 1,94% в ставропольской породе и 7,88% в каракульской, российская селекция.

Наибольшее число животных с аллелем ARR было детектировано в породах овец, относящихся к группам тонкорунных и полутонкорунных направлений продуктивности. Частота встречаемости аллеля ARR варьировала от 61,67% в асканийской до 28,23% в грозненской породах. Среди грубошерстных пород овец максимальная частота встречаемости желательного аллеля ARR была отмечена у овец каракульской и романовской пород., и составила 27,17 – 15,46% соответственно. В остальных грубошерстных породах данный аллель встречался менее чем в 12% случаев.

Наименьшая частота встречаемости данного аллеля была отмечена у овец эдильбаевской и кучугуровской пород – по 8,82-8,66%.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что различные породы овец имеют индивидуальный потенциал резистентности к патогенному прионовому белку. По результатам наших исследований наиболее устойчивыми к скрепи оказались овцы следующих пород: асканийской, северокавказской, кучугуровской, каракульской российской

и казахской селекции, казахской курдючной, атырауской, эдильбаевской, калмыцкой пород и породы манычский меринос.

В качестве примера использования полиморфизма структурных генов для контроля селекционного процесса рассмотрим данные о частотах аллелей гена эстрогенового рецептора в различных стадах свиней, использование этих данных для анализа взаимоотношений между анализируемыми породами (рис. 46).



Рис. 46. Дендрограмма, характеризующая близость пород свиней по встречаемости аллелей гена ESR

Наиболее близки между собой в этом случае оказались свиньи крупной белой породы из ГПЗ «Талдом» и ЗАО «Нарцизово» ($d=0,0019$), образующие первый кластер. Совместно с Заднепровской популяцией ($d=0,0020$) они образуют второй кластер, к которому наиболее близка популяция свиней из ГПЗ «Никоновское» ($d=0,0019$, третий кластер). К третьему кластеру примыкает популяция свиней уржумской породы ($d=0,0049$, четвертый кластер).

Близость свиней уржумской и крупной белой породы связана с тем, что разведение и совершенствование последней наложило неизгладимый отпечаток на весь породообразовательный процесс свиней в нашей стране.

Для животных входящих в эту группу характерна высокая частота встречаемости аллеля В: от 0,41 в ГПЗ «Никоновское» до 0,48 в ГПЗ «Мухинский» - в среднем по группе она была равна 0,44. Известно, что при создании крупной белой породы свиней, участвовали и китайские свиньи (Кабанов В.Д., 2001), у которых широко распространен В-аллель гена ESR.

Во вторую группу входят свиньи пород ландрас, дюрок и синтетической популяции. Хотя последние и превосходят по частоте аллеля В свиней, входящих в единый с ними кластер пород в среднем в 2,5 раза, но расстояние между этой популяцией и породами, входящими в четвертый кластер, выше, чем между ней и породами седьмого кластера. Из четвертого кластера наиболее близки к свиньям синтетической популяции свиньи из ГПЗ «Никоновское» – 0,0905. Расстояние же между ними и наиболее удаленной популяцией свиней седьмого кластера (ландрас, ПЗ им. Цветкова) составило 0,0124.

Генетическое расстояние между этими группами значительно превышает генетические расстояния внутри групп. Это свидетельствует об их относительно высокой генетической изолированности. Причина этого, однако, скорее всего, связана не столько с различием в происхождении пород, сколько с различиями в направлении селекционного процесса.

Животные первой группы принадлежат к породам отечественной селекции. При их создании и разведении значительное внимание уделялось отбору по многоплодию, что, несомненно, повлияло на закрепление в них желательных аллелей, влияющих на данный признак. Свиньи западного корня (ландрас и дюрок) длительное время селекционировались без учета репродуктивных показателей. Односторонняя ориентация на мясную

продуктивность могла привести к значительной утере из пород животных, несущих аллель В. Эти породы, очевидно, оказали большее влияние на генетическую структуру синтетической популяции свиней.

Таким образом, мы видим, что для контроля селекционного процесса в животноводстве могут быть привлечены разные генетические маркеры. При этом выбор маркеров должен определяться рядом моментов, исходя из цели исследования, доступности используемых маркеров и эффективности их использования для решения поставленных задач.

Вопросы для самопроверки по теме 13.

1. Оценка происхождения по маркерам I типа.
2. ДНК-фингерпринт и оценка родства.
3. ПЦР-ПДРФ и ПДАФ методы в генетической паспортизации.
4. Использование генов продуктивности для генетической сертификации.
5. Контроль селекционного процесса с использованием анонимных ДНК-маркеров.
6. Контроль селекционного процесса с использованием групп крови и белкового полиморфизма.
7. Контроль селекционного процесса с использованием ДНК-полиморфизма структурных генов.

Глава 14. Методы ДНК-диагностики в ветеринарии

Молекулярно-генетическое типирование возбудителей болезней животных. ПЦР-диагностика. Преимущества применения ПЦР-метода. Диагностика вирусных и бактериальных инфекций и зоонозов. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота.

Применение методов молекулярно-генетической диагностики возбудителей инфекционных болезней домашних и диких животных является одним из актуальных направлений современной ветеринарии. Основными методами молекулярно-генетической диагностики в исследованиях инфекционных агентов является применение ДНК- или РНК- зондов и метод полимеразной цепной реакции.

Использование данных методов при выявлении инфекционного начала, тесно связано с проблемой типирования возбудителей болезни, изучением их генетического полиморфизма и создания генно-инженерных вакцин.

Для диагностики инфекционных агентов используется бактериофаг М13, в том числе его гипервариабельный участок, выявляемый у многих организмов, принадлежащих к таксономическим группам, входящим в разные царства, что позволяет использовать его в качестве достаточно универсального диагностического зонда.

К преимуществам этого метода относятся следующие моменты. Во-первых, возможность родо- и видоспецифической диагностики микроорганизмов. Во-вторых, определение сродства между патогенными и непатогенными штаммами. В-третьих, использование генной дактилоскопии при изучении географического распространения разных штаммов.

Применение этого метода позволяет выявлять популяционную структуру возбудителя в очаге, определять штамм возбудителя и тем самым способствовать организации наиболее эффективной профилактики и лечения.

Метод ПЦР в диагностике инфекций используется в двух направлениях: выявление и типирование возбудителя. Относительная простота, чувствительность и высокая воспроизводимость метода сделали его одним из наиболее перспективных диагностических приемов.

Многие традиционные методы диагностики основаны на выявлении белковых маркеров возбудителя, тогда как ПЦР позволяет по наличию в пробе специфической ДНК указать на присутствие возбудителя инфекции. Следующее преимущество – это высокая чувствительность метода порядка 10% клеток в пробе. Это делает возможность выявлять патогенные начала даже в тех случаях, когда обнаружение их классическими методами невозможно. Преимуществами ПЦР-метода являются его высокая специфичность и быстрота. Так, диагностика хламидиоза методом ПЦР занимает около 3-х часов. К положительным сторонам следует отнести возможность работы с любым биологическим материалом (кровь, сыворотка, смывы, слюна, биопсийный материал и другие источники). Метод позволяет одновременно определять в одной пробе различных возбудителей. Но самым главным преимуществом является безопасность метода, т.к. он позволяет работать с убитым материалом. Это особенно важно при работе с такими особо опасными зооантропонозами как сибирская язва, туберкулез и бруцеллез или грипп птиц.

С использованием метода ПЦР-анализа разработана диагностика ряда вирусных инфекций у животных. Таких как болезнь Ньюкасла. Изучены различные парвовирусы у гусей. Разработаны методы диагностики болезни Ауэски, классической чумы свиней.

Разработан высокоэффективный способ прижизненной диагностики туберкулеза у домашних животных, многократно превосходящий по эффективности классические методы. Во Всероссийском НИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов накоплен большой опыт по диагностике ПЦР-методом хламидиоза, бруцеллеза, туберкулеза, микоплазмоза, сальмонеллеза и других инфекций. Уже в 2000 г. существовали тест-системы более чем для 3-х десятков болезней животных бактериальной и вирусной природы. ДНК-диагностика нашла свое применение и для выявления болезней вызванных простейшими, в частности бабезиоза собак, ставшего в последние годы бичом для этого вида животных.

Поиск эффективных путей преодоления проблемы повсеместного распространения такого заболевания крупного рогатого скота, как лейкоз ВЛКРС, является одной из важнейших задач не только ветеринарной медицины, животноводства, но и биотехнологии. Наличие у вируса лейкоза КРС близкого морфологического и эволюционного родства с вирусом Т-клеточного лейкоза человека, способность некоторых онкогенных вирусов преодолевать межвидовые барьеры, а также устойчивая тенденция роста выявления этих заболеваний, делает актуальным поиск высокочувствительных методов диагностики вируса в крови не только взрослых животных, но и телят, а также в молоке лактирующих коров, для обеспечения биологической безопасности жизнедеятельности человека.

Разработка высокоэффективного метода диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота ВЛКРС, повсеместно распространенного в стадах коров в РФ, является непременным условием решения данной задачи.

В настоящее время для диагностики лейкоза КРС используются несколько методов.

Реакция иммунной диффузии (РИД) — основной утвержденный метод диагностики лейкоза КРС. Метод основан на выявлении антител к вирусу, прост и доступен для применения в полевых условиях (Гулюкин, 2000, 2005; Джапаралиев, 2000), и обладает, при высокой специфичности, довольно низкой чувствительностью. Не всегда удается выявить всех зараженных животных, невозможно исследовать молодняк до 6-месячного возраста и глубоко стельных коров и нетелей.

Иммуноферментный анализ (ИФА), введенный в диагностическую практику с 1980 года, по сравнению с РИД обладает большей чувствительностью (Van, 1982; Portelette, 1983; Klintevall, 1991; Иванова, 1986, 1996; Арутюнян, 1992), но, как и РИД, выявляет антитела в сыворотке крови, молока и моче лишь через 1,5 — 2 месяца после заражения.

Гематологическому исследованию подвергают животных, в сыворотке крови которых методами РИД или ИФА обнаружены специфические антитела к вирусу лейкоза КРС. Данным методом дифференцируют больных животных среди вирусоносителей.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — современный прямой метод диагностики многих инфекций, в том числе лейкоза. Этот метод обладает максимальной чувствительностью и высокой специфичностью (Abbot., 1988; Beier, 1992; Agresti, 1993; Klintevall., 1994; Kuzmak, 1995; Licursi, 2002; Nagy, 2003; Fechner, 2003; Бусол, 1999; Гладырь, 2001; Двоеглазов, 2004; Чичина, 2004). Возможно обнаружение вируса в материале уже через 1 — 2 недели после заражения и у молодняка младше 6-ти месяцев. Многочисленные сравнения вышеприведенных методов между собой, выполненные как в России, так и доказывают наивысшую специфичность метода ПЦР анализа для диагностики вируса лейкоза крупного рогатого скота. Таким образом, провирусную ДНК в лимфоцитах периферической крови можно диагностировать только при помощи ПЦР,

которая позволяет с высокой достоверностью выявлять животных на самых ранних стадиях заболевания.

В этой связи на протяжении последних нескольких лет предпринимается множество попыток разработки высокочувствительных систем ПЦР-анализа, позволяющих выявлять наиболее полно всех вирусносителей. Наиболее перспективным подходом является проведение двойной ПЦР с разными парами праймеров, повышающими чувствительность и специфичность метода. Возможность успешного использования “nested-PCR” для диагностики ВЛКРС была продемонстрирована рядом исследователей (Marlsolalais, 1994; Kuzmak, 1995; Markiewicz, 2003; Чичина, 2004). В частности, Marlsolalais (1994), проведя вторичный цикл амплификации gag гена с помощью “nested-PCR”, повысил специфичность метода и выявил на 31% больше позитивных животных по отношению к первой ПЦР. Kuzmak (1995) дополнительно получил 11% положительных результатов среди 72 голов, показавших после первого ПЦР отрицательный результат. Rulka (2003) методом “nested-PCR” выявил 100% позитивных результатов в пробах крови и 80% в пробах молока, из которых 95% были подтверждены ИФА. Markiewicz с коллегами из университета Вармья и Мазура (Ольстина, Польша) разработали систему для диагностики фрагмента env гена вируса лейкоза крупного рогатого скота в трех стабильных клеточных линиях и одной рекомбинантной клеточной линии, и крови крупного рогатого скота различных пород. Из 58 протестированных животных 3 были позитивными и 8 сомнительными после первого цикла ПЦР, а после второго ПЦР этот показатель повысился до 21 головы.

Несмотря на заметные достижения в области разработки молекулярной технологии раннего выявления вируса лейкоза в крови и молоке крупного рогатого скота, сегодня не существует универсальной методики, позволяющей надежно и воспроизводимо диагностировать

вирус в крови недельных телят и в молоке коров не только индивидуально, но и на основании исследования средней групповой пробы, полученной, например, из молочного танка, цистерны и т.п. Разработка и обоснование универсальной ДНК-технологии, позволяющей проводить ПЦР анализ без учета возраста, пола животного, анализируемого материала (кровь, молоко), а также исследование проб сборного молока, поступающего в танк, цистерну для охлаждения, является необходимой предпосылкой для повышения биобезопасности продукции молочного скотоводства.

Учитывая, что вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) сильно мутирует, был проведен мониторинг мировых генных баз данных EMBL и GenBank, содержащих на сегодня 70 и 52 варианта ВЛКРС соответственно. Для исследований был выбран участок ДНК вируса, характеризующийся наибольшей консервативностью для всех описанных на сегодня типов.

Несмотря на ряд технических проблем, требующих решения, ПЦР является современным надежным методом прямой диагностики многих инфекций, в том числе лейкоза. Этот метод обладает максимальной чувствительностью и высокой специфичностью. Возможно обнаружение вируса в материале уже через 1 — 2 недели после заражения. Кроме того, данный метод применим для молодняка старше 15-дневного возраста. Таким образом, ПЦР позволяет с высокой достоверностью выявлять животных на самых ранних стадиях заболевания.

Для решения этой задачи необходимо провести ряд исследований по разработке комплексной ДНК-технологии, основанной на определении фрагмента гена *env* ВЛКРС. Система базируется на проведении так называемой двойной ПЦР («Nested-PCR») сначала с наружными, а затем с внутренними праймерами. Использование принципа двойной ПЦР позволяет повысить чувствительность метода в несколько тысяч раз. При проведении ПЦР-анализа на наличие ВЛКРС также предусмотрено

проведение ПЦР контрольного гена, что исключает наличие ложноотрицательных результатов, вызванных плохим качеством ДНК.

При проведении ПЦР-анализа важным моментом является ранняя диагностика вируса у телят с 10-дневного возраста, идентификация вируса в молоке коров как индивидуально, так и в средней пробе из танка, для предотвращения передачи его от животных к человеку.

В Центре биотехнологии и молекулярной диагностики ВИЖ было исследовано 1250 проб крови крупного рогатого скота с 4-х ферм экспериментального хозяйства «Кленово-Чегодаево».

Среди исследованного поголовья животных ОНО «Кленово-Чегодаево» было выявлено 228 вирусоносителей, причем коров, в крови которых диагностировался вирус, было примерно на 3% больше, чем телят.

Телки, достигшие 6-ти месячного возраста и отрицательные по ПЦР, были проверены во Всероссийском институте экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко (ВИЭВ) на носительство ВЛКРС с использованием РИД.

При сравнении по данным РИД аналогичных периодов 2004/2005 годов, произошло снижение инфицированности 6-ти месячного молодняка ОНО «Кленово-Чегодаево» вирусом лейкоза в 6,5 раза, что говорит о высокой эффективности ранней диагностики вируса лейкоза в крови телят. Наличие ПЦР-отрицательных животных среди РИД-положительных коров и телок старше 6-ти месяцев на сегодня с точки зрения научных исследований не находит объяснений. При этом следует отметить, что подобные результаты описаны в литературных источниках. Имеются также данные, что лейкоциты животных РИД+/ПЦР- по своим свойствам аналогичны свойствам здоровых животных. Одной из возможных причин такого феномена может быть наличие мутаций в амплифицируемой

области, которые влияют на свойства вируса, однако, не затрагивают его антигенные детерминанты.

Таким образом, применение ПЦР в комплексе противолейкозных мероприятий обеспечивает более раннее и полное выявление зараженных животных и сокращает сроки оздоровления стада.

Вопросы для самопроверки по теме 14.

1. Метод молекулярно-генетического типирования возбудителей болезней у животных.
2. Задачи, решаемые с применением молекулярных зондов.
3. ПЦР- диагностика.
4. Преимущества применения ПЦР- метода.
5. Диагностика вирусных и бактериальных инфекций и зоонозов.
6. Методы диагностика лейкоза крупного рогатого скота.
7. Сравнение РИД и ПЦР диагностика лейкоза крупного рогатого скота.

Глава 15. Основы цитогенетики животных

Видовые различия хромосомных наборов. Типы хромосомных перестроек.

Кариотипическая эволюция.

Цитогенетика – это область генетики, изучающая строение и функционирование хромосомного аппарата, роль хромосом в хранении, передаче и рекомбинации генетического материала, роль хромосомных различий в видовой изоляции, а также влияние хромосомных нарушений на развитие и жизнеспособность организма.

Хромосомы – это специализированные структуры клеточного ядра, обеспечивающие хранение, передачу, рекомбинации наследственного материала и реализацию генетической программы.

Морфологическое строение хромосом наиболее четко выражено в стадии метафазы. В этот период хромосома состоит из двух нитей – хроматид, интенсивно окрашивающихся основными красителями. В определении формы хромосом большое значение имеет положение ее обязательного структурного элемента – первичной перетяжки, в районе которой расположена центромера – специальная структура, управляющая передвижением хромосомы. Центромерный район делит хромосому на два плеча равной или различной длины. В зависимости от его положения определяют три типа хромосом (рис.47): метацентрические или равноплечие хромосомы; субметацентрические (хромосомы с четко выраженным неравенством плеч); у акроцентрических хромосом центромерный район расположен очень близко к одному из концов хромосомы или терминально. К акроцентрическим хромосомам принято относить хромосомы, имеющие центромерный индекс менее 12,5%, у субметацентриков он находится в интервале 12,5-37,0, а у метацентриков

от 37,0 до 50,0. Иногда выделяют группу субтело - или субacroцентриков с центромерным индексом от 12,5 до 25,0 %.

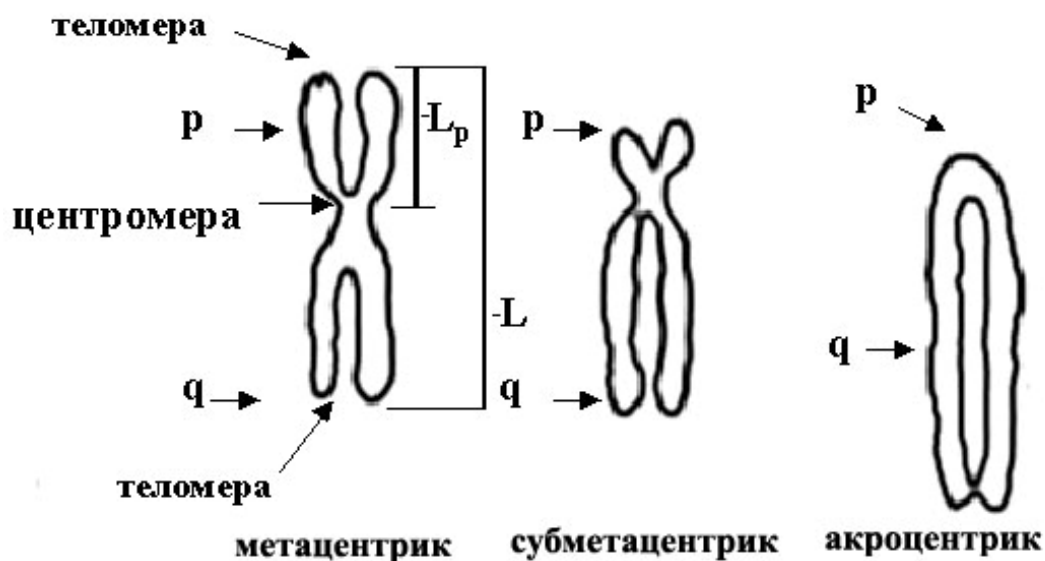


Рис. 47. Морфологические типы хромосом.

Центромерный индекс находят как отношение длины короткого плеча к длине хромосомы и выражают его в процентах. При описании хромосом короткое плечо обозначают буквой **p**, а длинное – **q**. К морфологической характеристике относят также наличие у хромосом вторичных перетяжек, соответствующих зонам ядрышковых организаторов.

Каждая хромосома гаплоидного (присущего половым клеткам) набора характеризуется своим, присущим только ей набором генов. Для каждого вида характерен свой набор хромосом, характеризующийся их числом, размерами и морфологией, т.е. свой уникальный вариант упаковки наследственной информации, сохранение, которого является необходимым условием, обеспечивающим нормальное развитие и жизнедеятельность организмов данного вида. Совокупность хромосом, присущую для организмов определенного вида, принято обозначать термином «кариотип». При этом подразумевается использование этого термина в

широком смысле. Данный термин идентичен редко используемому термину «кариом». Одной из основных цитогенетических характеристик вида является диплоидное число хромосом (хромосомное число), обозначаемое символом $2n$. Помимо хромосомного числа для цитогенетической характеристики часто используют число плеч хромосом и обозначают эту величину **NF** (*nombre fondamental* – основное число, франц.).

Рассмотрим в качестве примера характеристики кариотипов основных видов сельскохозяйственных животных. На рис. 48 показан кариотип крупного рогатого скота.

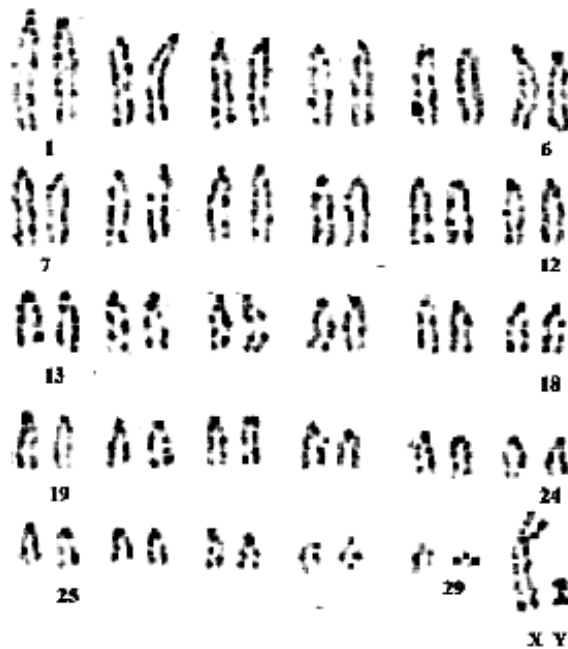


Рис. 48. Кариотип крупного рогатого скота. Бык. Предобработка с 5-бром-дезоксисуридином и бромистым этидием. Окраска по Романовскому-Гимза.

Кариотип крупного рогатого скота является сложным для анализа: он содержит 29 пар акроцентрических аутосом, образующих по своей величине плавно убывающий ряд, крупную субметацентрическую X-хромосому и Y-хромосому (мелкая хромосома субметацентрической формы), диплоидное число равно 60. Точная идентификация хромосом

возможна только на основе анализа дифференциальной окраски. Для хромосом *B.taurus* L. характерно более равномерное чередование G-положительных и негативных полос по длине хромосом.

Хромосомный набор домашней овцы содержит 27 пар, в том числе 3 пары крупных метацентрических аутосом, 23 пары акроцентрических аутосом и половые: X – крупный акроцентрик и Y – самая мелкая хромосома набора метацентрической формы (рис. 49).

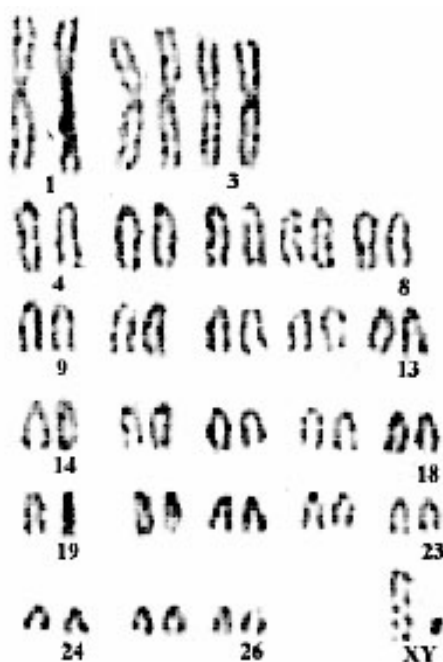


Рис. 49. Кариотип домашней овцы Самец. Предобработка с 5-бром-дезоксигуанидином и бромистым этидием. Окраска по Романовскому-Гимза

По характеру дифференциальной исчерченности кариотип овцы сходен с кариотипом крупного рогатого скота. Это связано с тем, что кариотипы полорогих произошли от общей предковой формы и различия в числе хромосом обусловлены серией центрических слияний, что подтверждается картиной дифференциальной исчерченности хромосом у этих видов. Анализ дифференциальной структуры хромосом овцы свидетельствует, что хромосома 1 пары у *O.aries* соответствует 1 и 3, 2 - 2 и 8 и 3 - 5 и 11 парам хромосом *B.taurus* и *S.hircus* (Яковлев А.Ф., 1989).

Кариотип домашней свиньи состоит из 12 пар двухплечих хромосом и 6 акроцентриков, средней по размерам субметацентрической X-хромосомы и мелкой двухплечей Y-хромосомы. Диплоидное число хромосом у свиней равно 38 (рис. 50).

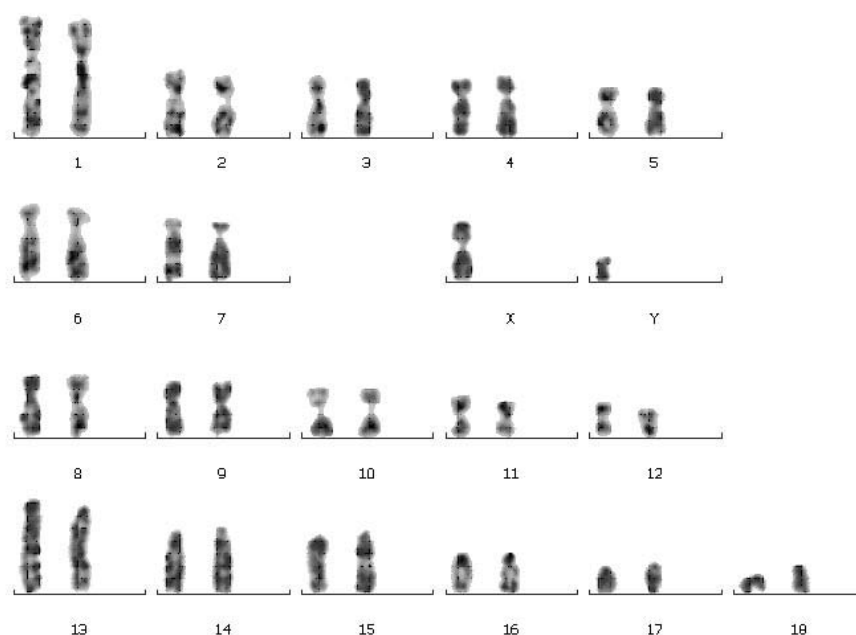


Рис. 50. Кариотип домашней свиньи. Хряк. Предобработка с 5-бромдезоксисуридином и бромистым этидием. Окраска по Романовскому - Гимза.

В соответствии с принятой стандартной номенклатурой в кариотипе свиньи принято выделять 4 морфологические группы аутосом и группу половых хромосом. В первую группу входят 5 пар субметацентрических хромосом, во вторую – 2 пары субметацентриков с резкой асимметрией плеч, в третью – 5 пар метацентрических хромосом, в четвертую – 6 пар акроцентрических хромосом, половые хромосомы XX у самки и XY у самца. При монохромной (рутинной) окраске в кариотипе свиньи достоверно идентифицируются максимум 5 пар аутосом: 1 пара крупнейший субметацентрик набора, 6 и 7 пары – субметацентрики с резко выраженной асимметрией плеч, 10 пара – мелкая метацентрическая

хромосома со вторичной перетяжкой, в ряде случаев 8 хромосома – средний метацентрик со вторичной перетяжкой, 13 пара – крупнейший акроцентрик набора и Y-хромосома.

Кариотип домашней лошади содержит 32 пары хромосом. 13 пар аутосом двухплечие, 18 – акроцентрики. X-хромосома метацентрическая, а Y – мелкий акроцентрик (рис. 51)

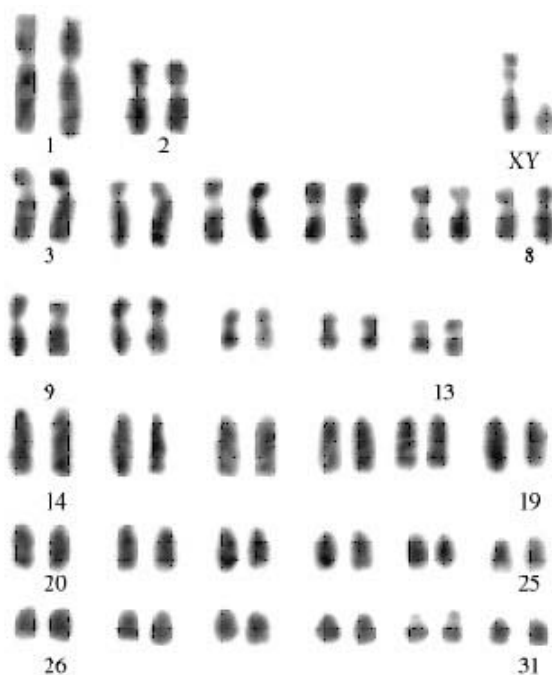


Рис. 51. Кариотип лошади. Жеребец. Монохромная окраска.

Для хромосом лошади характерно относительно равномерное чередование темно- и светлоокрашенных полос. Маркерные блоки можно выявить лишь в коротком плече X-хромосомы, на коротких плечах 4 пары и в дистальном районе длинных плеч хромосомы 13. Идентификация остальных хромосом в пределах морфологических групп осуществима по размерам и общему характеру рисунка.

При описании дифференциально окрашенных хромосом на плечах хромосом принято выделять блоки. Блоки и полосы внутри них нумеруют в направлении от центромеры к теломере. Группировка хромосом при кариотипировании проводится в соответствии с принятым в цитогенетике

принципом (от большего к меньшему, начиная с двухплечих хромосом, если они есть) и со стандартным кариотипом. Половые хромосомы независимо от морфологии выделяются в отдельную группу. Выбор гомологов ведется по морфометрическим характеристикам и характеру рисунка хромосом.

В основе эволюционных изменений, обеспечивших кариотипическую дивергенцию видов, лежат различные хромосомные перестройки.

Инверсии возникают в результате двойного разрыва хромосомы и поворота ее участка на 180° с последующим воссоединением разорванных участков. Если инверсия происходит в одном плече хромосомы, то положение центromеры не меняется и такая инверсия называется **парацентрической**. В том случае, когда точки разрывов приходятся на разные хромосомные плечи, инверсия называется **перицентрической**. Если точки разрыва локализованы асимметрично относительно центromеры, перицентрическая инверсия приводит к изменению морфологии хромосомы (рис.52).

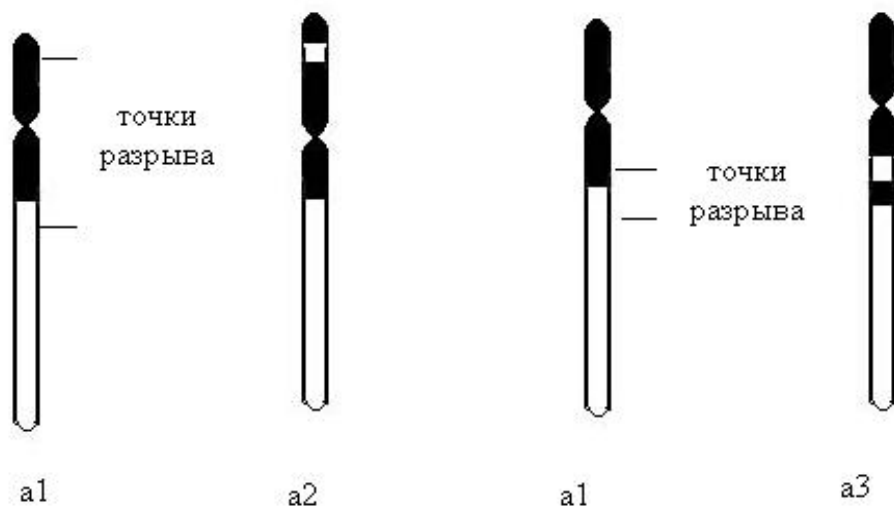


Рис. 52. Хромосомные инверсии – inv: а) перицентрическая; б) парацентрическая; а1 – исходная хромосома, а2 и а3 –измененные в результате инверсии.

Классическим примером изменения морфологии хромосом в результате перичентрической инверсии является видовой полиморфизм X-хромосомы у полорогих.

Участок одной хромосомы может быть перенесен на другую. В этом случае говорят о **нереципрокной транслокации** (рис.53).

Для ее возникновения необходимы три разрыва и три воссоединения. Нереципрокные транслокации могут быть легко выявлены и при монохромной окраске митотических хромосом. В их результате в одной из хромосом возникает делеция, а во второй – инсерция или вставка. Инсерции всегда являются результатом нереципрокных транслокаций.



Рис. 53. Нереципрокная транслокация – *t*, инсерция – *ins* и делеция – *del*: a1 и b1 – исходные хромосомы; 1, 2, 3 – точки разрыва хромосом; a2 и b2 – измененные в результате транслокации.

Описано несколько случаев инсерции в хромосому 16 у коров породы шароле в Бразилии. Фенотипический эффект не изучен.

Иначе обстоит дело в отношении делеций. Делеции, связанные с потерей хромосомного материала, а не с переносом его на другую хромосому, достоверно идентифицируются при некоторых аномалиях кариотипа человека, связанных с врожденными уродствами.

У крупного рогатого скота известен случай делеции X-хромосомы, сопровождавшийся снижением плодовитости. Делеции хромосом описаны и у домашнего кролика.

У остальных видов домашних животных сведения о подобных аномалиях кариотипа отсутствуют.

Две хромосомы могут обмениваться между собой сегментами (рис. 54). Такая перестройка называется **реципрокной транслокацией**. Для ее реализации необходимо два разрыва и два соединения участков хромосом.

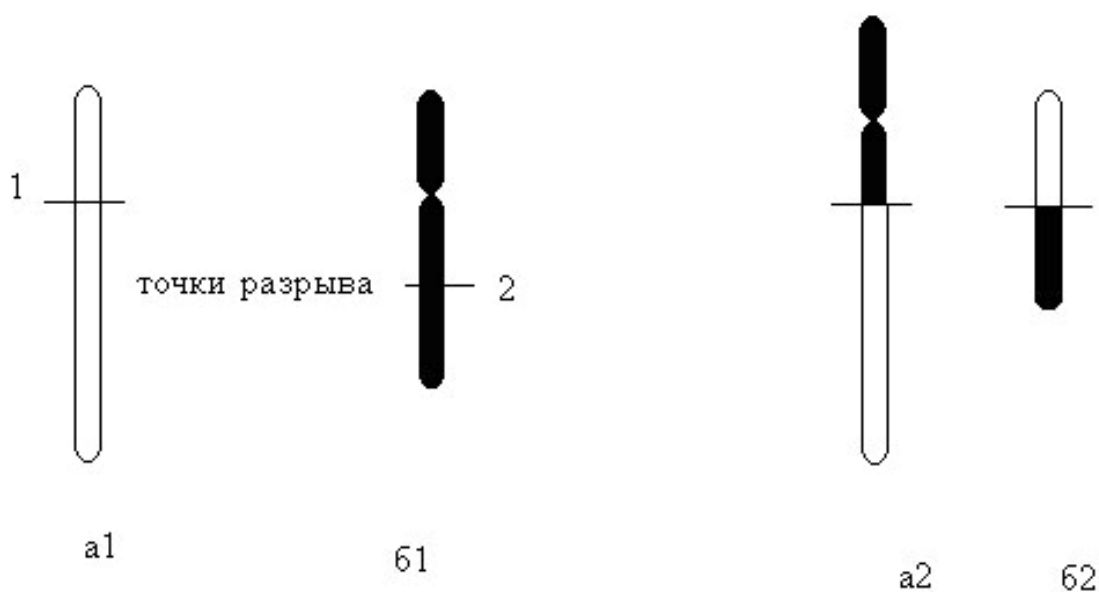


Рис. 54. Реципрокная транслокация – гср: a1 и b1 – исходные хромосомы; a2 и b2 – измененные в результате транслокации.

Следующие типы хромосомных перестроек затрагивают помимо морфологии, как диплоидное число, так и **NF**. К ним относятся тандемные транслокации, впервые описанные во второй половине 70-х годов текущего столетия. До этого полагали, что нормальная сегрегация транслоцированных хромосом возможна лишь в том случае, если транслокационный сегмент не содержит центромеры. В противном случае считалось, что наличие у хромосомы, возникшей в результате перестройки, двух центромер приводит к возникновению в процессе деления

хромосомного моста, препятствующего ее нормальному расхождению. Однако у ряда видов были обнаружены различия в хромосомном наборе, которые можно было объяснить слиянием хромосом без утери одной из центромер. Вместе с тем функционально активной при этих перестройках оказывалась одна центромера, а вторая находилась в инактивированном состоянии. Перестройки такого типа получили название **тандемных транслокаций** (рис. 55). В цитогенетике эту аномалию принято обозначать символом *tnt*.

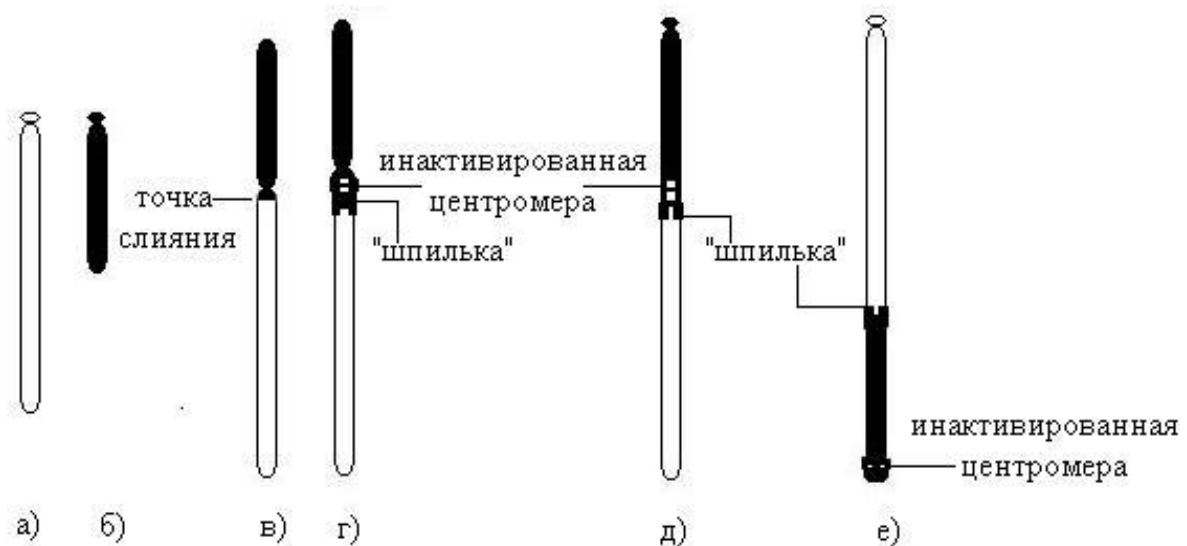


Рис. 55. Робертсоновские – Rt и тандемные транслокации - *tnt*

а) и б) – исходные хромосомы; в) робертсоновская транслокация, возникшая в результате разрыва в прицентромерных районах; г) робертсоновская транслокация, возникшая в результате слияния коротких плеч по типу тандемной; д) тандемное слияние теломерно-центромерного типа; е) тандемное слияние теломерно-теломерного типа.

Тандемные перестройки играли существенную роль при видовой дивергенции кариотипов во многих отрядах млекопитающих (Орлов В.Н., Булатова Н.Ш., 1982; Дзюев Р., 2000).

К изменению морфологии и числа хромосом приводят и **робертсоновские транслокации** или **центрические слияния**,

закрывающиеся в том, что две акроцентрические хромосомы сливаются короткими плечами (рис. 45) в результате чего возникает новая метацентрическая или субметацентрическая хромосома, а диплоидное число хромосом уменьшается на единицу, но, в отличие от анеуплоидии и ряда вариантов тандемных транслокаций, **NF** в этом случае остается постоянным. Считают, что Робертсоновские транслокации являются одним из механизмов эволюционного изменения кариотипа.

Возможны два механизма возникновения центрических слияний. В первом случае объединению акроцентрических хромосом предшествуют разрывы коротких плеч в центромерном районе с утерей одного из кинетохоров, во втором – объединение хромосом происходит в результате слияния коротких плеч с сохранением обеих центромер. Показано, что одна из центромер в таком случае теряет свою функциональную активность, т.е. в данном случае робертсоновская транслокация является вариантом тандемной.

В эту же группу входит еще один тип мутаций, обратный робертсоновским и тандемным слияниям – «фрагментация», описанный Тодд Н. (по Дзуеву Р.И., 1998) и связанный с разделением одной хромосомы на две в области центромеры или слияния открытых теломер, т.е. палиндромном участке. Существование подобных мутаций может быть легко объяснено наличием в хромосомах «молчащих» центромер, которые в определенных условиях могут восстанавливать свою активность (рис. 56, а).

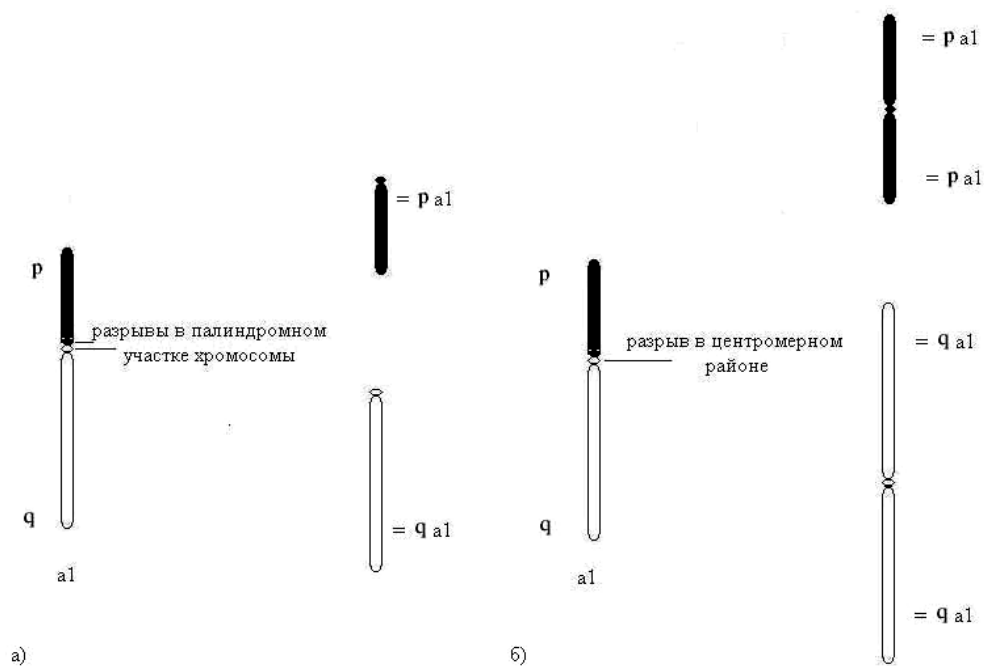


Рис. 56. Аберрации, приводящие к увеличению хромосомного числа: а) диссоциация; б) возникновение изохромосом; a1 - исходная хромосома; pa1 и qa1 – новые хромосомы

Завершая описание различных вариантов структурных аномалий, необходимо упомянуть о так называемых изохромосомах (рис. 46, б). Эта мутация в чем-то сходна с фрагментацией метацентрических хромосом, т.к. возникает в результате центрального разрыва, но не между плечами хромосомы, а между хроматидами. Вследствие чего вместо одной двухплечей хромосомы в кариотипе появляются две метацентрические хромосомы, причем оба плеча таких метацентриков абсолютно гомологичны. Очевидно, в связи с тем, что подобные перестройки приводят к полной дупликации значительного количества генетического материала они, по всей видимости, летальны. В литературе не описано ни одного случая подобных мутаций у животных, нет и фактов, подтверждающих участие их в кариотипической дивергенции видов, хотя в отдельных клетках возможно появление таких аномалий. В отличие от различных вариантов слияний или компаунд-хромосом,

сопровождающихся уменьшением хромосомного числа, последние два варианта aberrаций имеют своим следствием увеличение числа хромосом.

В заключение кратко рассмотрим особенности организации хромосомного набора у птицы. Кариотип у представителей класса Aves имеет ряд существенных отличий от кариотипа млекопитающих. Первое связано с тем, что для разных видов птиц характерна невысокая вариабельность хромосомных чисел. В таблице 19 приведены данные о диплоидных числах у основных видов домашней птицы.

Таблица 19

Диплоидные числа хромосом у некоторых видов птицы

Вид	2n
Цесарка <i>Numida meleagris</i>	74
Курица домашняя <i>Gallus gallus domesticus</i>	78
Перепел <i>Coturnix coturnix japonicus</i>	78
Индейка <i>Meleagris gallopalo</i>	82
Фазан <i>Phasianus Colchicus</i>	82
Гусь <i>Anser anser</i>	82
Утка кряква <i>Anas platyrhynchos</i>	80
Утка мускусная <i>Cairina moschata</i>	80
Голубь сизый <i>Columba inia</i>	80
Горлица хохочущая <i>Streptopelia risoria</i>	80

Число хромосом у разных видов птицы различается всего лишь на несколько пар, тогда как у млекопитающих этот размах составляет десятки хромосом.

Для всех цитогенетически изученных представителей класса Aves характерно большое число хромосом. Однако не это главное, что определяет особенности организации их генома. У ряда видов

млекопитающих, в том числе у представителей мозолоногих, полорогих и псовых, кариотип также содержит большое число хромосом.

Вторая особенность кариотипа птиц, значительно затрудняющая изучение их хромосомного набора, связана с наличием большого числа микрохромосом. Для птиц, в отличие от млекопитающих, характерна резкая гетероморфность организации генома, проявляющаяся в наличии макро- и микрохромосом.

В ряде работ описаны основные структурно-функциональные характеристики макро- и микрохромосом. Для первых типичны насыщенность структурными генами, раннее время репликации ДНК. Большинство микрохромосом, как полагали ранее, имеют гетерохроматиновую природу. В последнее время стало ясно, что эти элементы генома птицы также содержат большое количество генов, в том числе связанных с продуктивностью и проонкогенов.

Еще одной отличительной чертой хромосомного набора у птиц является существование значительного гетероморфизма по длине гомологов, а иногда и по центромерному индексу. Наличие гетероморфизма хромосом у птицы очевидно связано с различной скоростью конденсации хромосом при прохождении митоза (Трофимова Л.В., 1977). По данным Трофимовой Л.В. (1979) наиболее сильно гетероморфизм выражен у двух первых пар макрохромосом.

И, наконец, у этого класса животных, в отличие от млекопитающих, гетерогаметным является женский пол. Хромосомная формула мужского пола определяется как ZZ, а женского - WZ.

Вопросы для самопроверки по теме 15.

1. Функция хромосом.
2. Метафазные хромосомы. Морфология хромосом.

3. Понятие о кариотипе.
4. Кариотипические характеристики основных видов домашних животных.
5. Иверсии.
6. Реципрокные и нереципрокные транслокации.
7. Компаунд перестройки.
8. Различия между робертсоновскими и тандемными транслокациями.
9. Роль различных перестроек в кариотипической эволюции.

Глава 16. Цитогенетика в селекции животных

Полиморфизм хромосом. Хромосомные болезни животных.

Цитогенетический контроль в животноводстве. Цитогенетические характеристики, используемые для сертификации производителей.

Сохранение постоянства в строении и числе хромосом является необходимым условием, как нормальной жизнедеятельности организма, так и сохранения вида. И, тем не менее, в популяциях домашних животных регулярно выявляются особи с измененным хромосомным набором (В этом случае принято говорить о конституциональных аномалиях хромосом). Причем в подавляющем большинстве случаев имеет место передача той или иной аномалии в ряде поколений. Возникновение конституциональных хромосомных аномалий *de novo* – явление достаточно редкое.

Частота встречаемости отдельных аномалий кариотипа может достигать в популяциях до десятков процентов. В эволюционном плане можно было бы говорить, что в данном случае мы имеем дело с хромосомным полиморфизмом. Однако в большинстве случаев хромосомные перестройки приводят к снижению продуктивности животных.

Реципрокные транслокации являются одной из часто встречающихся у домашних животных аномалий (рис.57). Они наиболее распространены среди европейских пород свиней, встречаются также у крупного рогатого скота (табл. 20). В подавляющем большинстве случаев эти аномалии в сбалансированном виде не связаны с анатомическими дефектами, а проявляются на разных стадиях эмбриогенеза у потомства носителей, в несбалансированном состоянии приводя к их гибели. У овец известен лишь один случай реципрокной транслокации $1p-;20q+$. У лошадей также

описаны различные структурные перестройки хромосом. Поуер М. (1991) у чистокровной кобылы с пониженной репродукцией была выявлена реципрокная транслокация $гср\ 1q;3q$. У других видов одомашненных животных эта аномалия к настоящему времени не обнаружена.

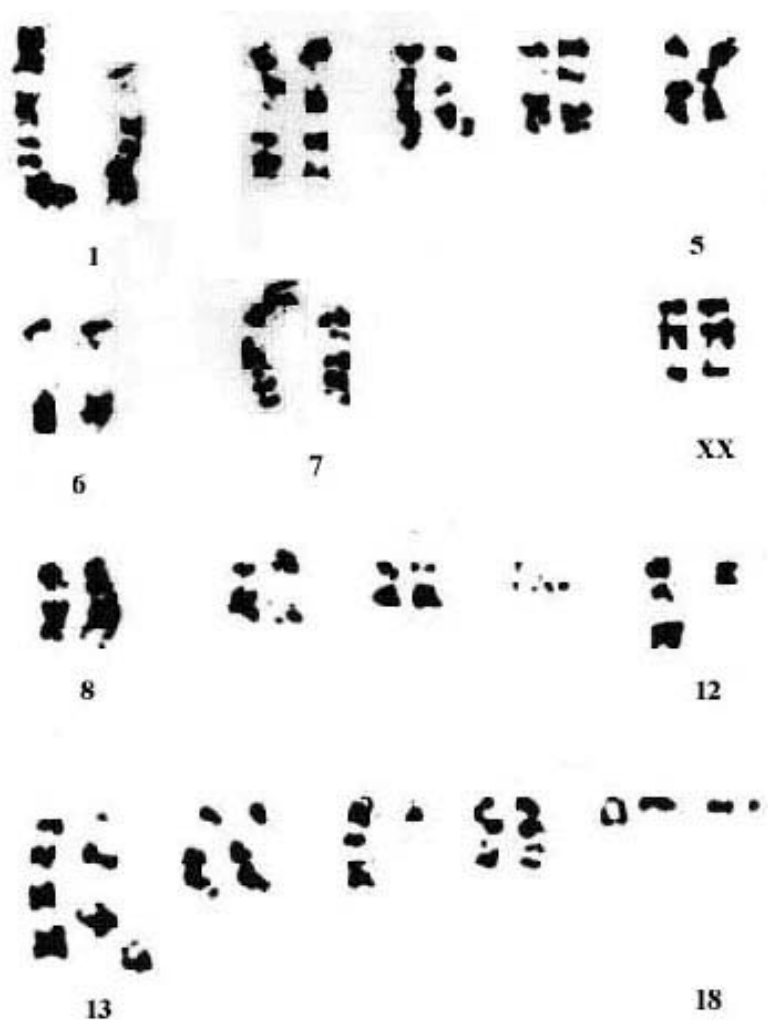


Рис. 57. Кариотип свиноматки Гамма, полученной от осеменения спермой, облученной в дозе 600 Р. Двойная реципрокная транс-локация: $1p-7p+$; $12q+15q-$. G – окраска. (Коновалов с соавт., 1987). Вариант раскладки авторов преобразован нами в соответствии со стандартной номенклатурой хромосом домашней свиньи.

Таблица 20

Реципрокные транслокации у домашних животных

Вид	№	Вариант транслокации	Порода	Страна	Фенотипический эффект
1	2	3	4	5	6
S.scrofa	1	1p- 6q+	Крупная белая	Югославия	-25%
	2	1p- 16q+	Ландрас	Германия	-
	3	1p- 8q+	Йоркшир	Швеция	-
	4	1p- 11q+	Ландрас	Финляндия	-34%
	5	1p+ 15q-	Ландрас	Финляндия	-43%
	6	1p+ 14q-	Йоркшир	Швеция	-34%
	7	1q- 17q+	Йоркшир	Швеция	-40%
	8	1q- 7q+	Ландрас	Швеция	-
	9	1q+ 11q-	Синтетическая линия	Германия	-13%
	10	2p+4p-; 2p-15q+; 4p+15q-	Ландрас	Финляндия	-30%
	11	4q+ 13q-	Ландрас	Финляндия	-40%
	12	4q+ 14q-	Ландрас х крупная белая	Финляндия	-43%
	13	5q- 8q+	Йоркшир	Швеция	-33%
	14	5q- 14p+	Гемпшир х пьетрен	Франция	-28%
	15	5q- 14p+	Ландрас х дюрок	Франция	-50%
	16	6p+ 15q-	Ландрас	Бельгия	Бесплоден
	17	7q- 11q+	Йоркшир	Швеция	-50%
	18	7q- 15q+	Крупная белая	Франция	-45%
	19	7p+ 13q-	Гемпшир	Швеция	-
	20	7p+ 13q-	Ландрас	Финляндия	-
	21	9p+ 11q-	Йоркшир	Швеция	-50%
	22	11p-15q+	Ландрас	Швеция	От -40 до -50%
	23	2q- 13p+; 16/17	Сложная помесь	Россия	Бесплоден
	24	11p-15q+	Йоркшир	Швеция	-42%
	25	15q+16q-	Йоркшир	Швеция	-
	26	16q+17q-	Ландрас	Финляндия	-31,2%
	27	6q 3.3; 8q 2.6	Гасконская х мейшан	Франция	От - 72,6 до -82,6%
	28	6q 1.5; 15q 1.2	Пьетрен	Франция	- 94,6%
	29	4q- 14p+	-	Франция	-
	30	3p+ 7q-	-	Франция	-
	31	5q- 11q+	-	Франция	-
	32	5q+; 15q-	Ландрас	Словакия	Бесплоден
	33	1p6p; 1q6q	Швейцарская крупная белая	Швейцария	Многоплодие 7,1
	34	1p-; 11p+	Бельгийский ландрас	Болгария	-17,4%
	35	7q-; 13q+	Польский ландрас	Польша	-48%
	36	8p+; 14q-	Польский ландрас	Польша	-25%
	37	1q-; 5q+	Польский ландрас	Польша	-

Продолжение таблицы 20

1	2	3	4	5	6
	38	14q-; Xp+	-	Канада	Анатомические аномалии семенников, бло-кировка мейоза на стадии лептотены, резкое снижение фертильности самцов. Интерсекс.
	39	14q 2.9; 15q 2.4	Гемпшир	-	Многоплодие 6,6; мертворожденные 2; у 75% мертворожденных пороки сердечной перегородки
	40	7q 2.6; 17q 1.1	-	-	Нарушение фертильности, дегенерация семенников
	41	2p 1.4; 14q 2.3	-	-	Нарушение фертильности, дегенерация семенников
	42	1;18	-	-	Нарушение фертильности, дегенерация семенников
	43	бр+ 14q-	Крупная белая х эссен	Англия	Интерсекс
B.taurus	1	rcp 18q- ;Xp+	Шароле х лимузин	Канада	-
	2	1q+ ; 8q- ; 9q+	Швицкая	Италия, Дания	Менее 5% плодотворных осеменений
	3	rcp 20 ; 24	-	-	-
	4	rcp 17 ; 25	-	-	-
	5	rcp A- ; X	-	-	-
	6	rcp (8 ; 15) (21 ; 24)	Серая альпийская	Австрия	Оплодворяющая способность 25%
	7	rcp 23q- ; X	-	-	-

Следующие типы хромосомных перестроек затрагивают помимо морфологии, как диплоидное число, так и NF. К ним относятся тандемные и робертсоновские транслокации. Сбалансированная тандемная транслокация tnt (1;30) была обнаружена у чистокровного жеребца. У покрытых им маток отмечен высокий уровень эмбриональных потерь. У других видов одомашненных животных эта аномалия пока неизвестна, хотя тандемные перестройки играли существенную роль при видовой

дивергенции кариотипов во многих отрядах млекопитающих (Орлов В.Н., Булатова Н.Ш., 1982; Дзуев Р., 2000).

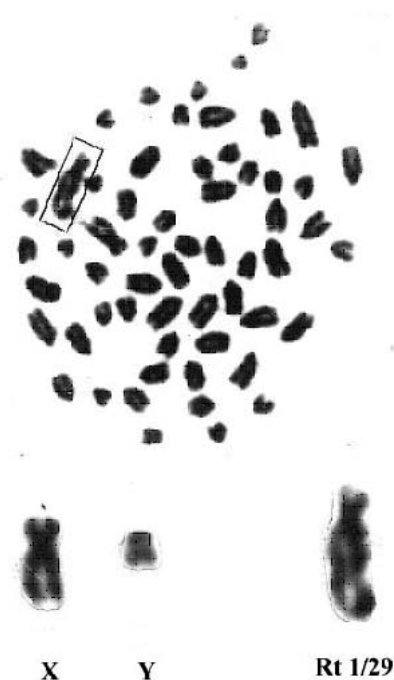


Рис. 58. Робертсоновская транслокация у симментальского быка-производителя Бамбук 7982: а) – метафаза (транслокация выделена рамкой); б) – половые хромосомы; в) – транслокация 1/29. Монохромная окраска.

Робертсоновские транслокации среди сельскохозяйственных животных наиболее часто встречаются у крупного рогатого скота. (рис. 58). В настоящее время у крупного рогатого скота описано 33 варианта робертсоновских транслокаций (табл. 21).

Таблица 21
Различные варианты Робертсоновских транслокаций у крупного рогатого скота

№ п/п	Тип транслокации	Порода	Страна
1	2	3	4
1	1/21	Голштино-фризская	Япония
2	1/25	Немецкая красно-пестрая	Германия
3	1/26	Голштино-фризская	Япония
4	1/27	Британская белая	Англия
5	1/29	35 пород	17 стран
6	2/4	Фризская	Англия
7	2/27	Айрширская	Россия
8	$\frac{3}{4}$	Лимузин	Франция

Продолжение таблицы 21

9	3/12	Айрширская	Россия
10	5/18	Симментальская	Венгрия
11	5/21	Японская черная	Япония
12	5/22	Польская красно-пестрая	Польша
13	5/25	Барроза	Италия
14	6/16	Декстер	Англия
15	7-11/ 20-25	Аквитанская белая х лимузин	Франция
1	2	3	4
16	7/21	Японская черная	Япония
17	8/9	Бурая альпийская	Швейцария
18	9/12	Айрширская	Россия
19	9/17	Айрширская	Россия
20	11/16	Симментальская	Венгрия
21	11/15 или 12/16	Симментальская	Новая Зеландия
22	12/12	Симментальская	Германия
23	12/27	Айрширская	Россия
24	13/21	Голштино-фризская Симментальская	Венгрия, Англия
25	14/20	Симментальская	Англия, Канада
26	14/21	Симментальская	Венгрия
27	14/28	Голштино-фризская	США
28	15/28	Серая украинская	Россия
29	17/27	Айрширская	Россия
30	20/20	Симментальская	-
31	21/27	Аквитанская белая	Франция
32	25/27	Альпийская серая	Италия
33	5/22	Красно-пестрая	Польша

Наиболее детально у крупного рогатого скота изучена робертсоновская транслокация 1/29. Показано, что эта аномалия приводит к снижению репродуктивной функции у несущих ее животных, за счет эмбриональных потерь на ранних стадиях беременности. В таблице 22 приведены сведения о встречаемости этой аномалии у различных пород крупного рогатого скота по странам мира.

Частота робертсоновских транслокаций хромосом
1/29 в различных стадах крупного рогатого скота

Страны	Породы	Исследовано животных (гол)	% животных с транслокацией 1/29	
1	2	3	4	
Австралия	Голштино-фризская	174	0	
	Герфордская	602	0	
	Красный комолый	2	100	
Бразилия	Питангуэйрас	240	27,9	
Великобритания	Голштино-фризская	916	0	
	Шароле	185	0,5	
	Симментальская	113	2,7	
Венгрия	Венгерская серая	106	3,8	
	Венгерская серая	944	1,8	
ГДР	Симментальская	228	3,94	
	Атласская	109	7,8	
Испания	Ретинта	18	27,7	
	Испанские спортивные быки	226	1,32	
	Алистана-санабреса	12	8,3	
Италия	Романьола	122	32,0	
	Романьола	49	16,3	
Канада	Симментальская	253	5,26	
Куба	Санта-гертруда	36	38,8	
	Голтино-фризская	38	0	
	Зебу	5	0	
Монголия	Симментальская	12	33,3	
Нигерия	Симментальская	10	10	
Норвегия	Норвежская красная	430	4,2	
Россия	Сычевская	60	21,6	
	Монбельярдская	100	2	
	Черно-пестрая	174	0	
	Холмогорская	28	0	
	Сычевская	145	13,8	
	Айрширская	25	0	
США	Симментальская	215	5,6	
	США	Шароле	43	30,2
	Франция	Брахман	190	38,9
		Нгуни	305	10,2
		Корсиканская	84	28,5
		Аквитанская белая	228	20,6
		Лимузин	231	5,6
Нормандская		249	0	
Лимузин		124	4,8	
Шароле		314	3,8	
Ф.Ф.П.Н.	215	0		

Продолжение таблицы 22

ФРГ	Немецкая симментальская	100	0
	Баварский крупный рогатый скот	1342	0,3
Чехословакия	Черно-пестрая	43	2,32
	Бурая	21	0
	Черно-пестрая	7	0
	Шароле	4	0
	Лимузин	2	0
Швеция	Шведская красно-белая	944	12,4
	Шведская голштино-фризская	1173	14,3
Швейцария	Симментальская	654	3,2
	Швицкая	430	0,2
Япония	Японская черная	112	3,6
	Голштино-фризская	38	0

В литературе к настоящему времени описано лишь несколько случаев спонтанных робертсоновских транслокаций у домашних свиней. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют об отрицательном влиянии робертсоновских транслокаций на воспроизводительные качества домашних свиней (таблица 23).

Таблица 23

Робертсоновские транслокации у домашних свиней и их влияние на воспроизводительную функцию

№ п/п	Транслокация	Порода	Страна	Фенотипический эффект
1	13/17	ландрас	Япония	Интерсекс
2	13/17	ландрас х дюрюк		Не исследован
3	13/17	не указана	Мексика	Не исследован
4	-	кроссбредные линии	Германия	многоплодие к норме 95 % у хряков и 60 % у маток
5	13/17	ландрас		многоплодие к норме: 93-90%
6	-	ландрас		Не исследован

Интересно отметить, что описанные у домашних свиней робертсоновские транслокации связаны с хромосомами 13 и 17 пар, тогда как у европейских и азиатских кабанов в перестройку вовлечены хромосомы 15, 16 и 17 пар. Следовательно, у домашних свиней эта аномалия возникла *de novo*, а не унаследована от предковых форм.

У овец описано три варианта робертсоновской транслокации, обозначаемых как Массей I, II и III (Rt: 5/26; 8/26; 7/25), отрицательного влияния этих aberrаций не обнаружено. У коз известно три варианта робертсоновских транслокаций: 1/29; 2/13 и 6/14. Все это свидетельствует о широком распространении данной хромосомной аномалии у представителей семейства полорогих (Bovidae).

Поуер М. (1987) описал у чистокровной кобылы хромосомную аномалию аналогичную транслокационному варианту синдрома Дауна у человека. В перестройку типа Rt была вовлечена 26 хромосома. В кариотипе одновременно с Rt 26/26 присутствовал нормальный гомолог этой пары. Таким образом, животное являлось своеобразным трисомиком по хромосоме 26. У других видов, кроме крупного рогатого скота, случаев транслокационной трисомии не описано. Случай гетерозиготной робертсоновской транслокации выявлен у каспианского пони, но вопрос о влиянии ее на репродукцию не изучался.

Несколько случаев робертсоновских транслокаций описано у собак. Первый случай описан Шайв с соавторами (1965) у помесного терьера с множественными аномалиями развития. Еще в двух случаях аномалия обнаружена у собак породы малый пудель с анатомическими дефектами (хондродисплазия и аномалии мочеточников). В последнем случае хромосомная аномалия обнаружена и у матери пробанда. Из 28 родственных между собой собак, имевших Rt13/23, у двух гомозигот по транслокации отмечена паховая грыжа.

Крайне редко у домашних животных встречаются инсерции, инверсии и делеции. Описаны лишь единичные случаи этих аномалий у крупного рогатого скота. Негативное влияние этих аномалий на репродукцию животных описано лишь в случае вставки в 16 хромосому, обнаруженной у группы родственных животных породы шароле (табл. 24).

Таблица 24

Редкие хромосомные aberrации у крупного рогатого скота

№ п/п	Аберрация	Порода	Страна	Фенотипический эффект
1	del X	-	-	-
2	ins 16	шароле	Бразилия	оплодотворяющая способность 25 %
3	inv 22	шароле х немецкая симментальская	Германия	-
4	inv 14	-	-	-

Числовые вариации хромосомного набора приводят к резкому дисбалансу наследственного материала и, как правило, являются летальными мутациями. В исследованиях, выполненных на человеке, показано, что эти нарушения приводят к эмбриональной гибели. У живорожденных известны случаи трисомий по отдельным хромосомам, в том числе наиболее распространенная трисомия по 21 хромосоме, но не описано ни одного случая моносомий, исключая моносомию по половым хромосомам. Аналогичная картина наблюдается и у животных. Правда, у свиней и овец пока неизвестны случаи моносомии по половым хромосомам. Случаи анеуплоидии по аутосомам среди сельскохозяйственных животных описаны только у крупного рогатого скота (табл. 25)

Таблица 25

Фенотипическое проявление аномалий в системе аутосом
у крупного рогатого скота

Тип аномалии хромосом	Порода	Фенотипическое проявление
60,XY,t(1/29)+1	-	Ранние эмбрионы. Летальна.
60,XX,t(12/12)+12 61,XX+12 61,XY+12	Симментальская	Брахигнатия верхней или нижней челюсти, аномалии половой системы. Летальна.
61+17 60/61+17	Красно-пестрая, черно-пестрая, симментальская	Брахигнатия, нанизм, гидроцефалия, множественные пороки сердца. Летальна.
60,XY/60,XY+18	Швицкая	Нанизм. Летальна.
61,XX+20 60,XX,t(20/20)+20	Черная японская Симментальская	Бесплодие. Брахигнатия нижней челюсти, сколиоз.
61,XX+21	Фризская	Билатеральная контрактура сухожилий плюсны, обезвоживание. Летальна.
61,XX+21	Голштинская	Расщепление неба, двухсторонний гидронефроз, пороки сердца. Летальна.
61,XX+21		Расщепление неба, гидроцефалия, артрогрипоз, пороки сердца. Летальна.
61,XX+22		Пупочная грыжа, свищ мочевого протока, брахигнатия нижней челюсти.
61,XX+22		Брахигнатия верхней челюсти, аномалии ушных раковин, пороки сердца.
61,XX+22		Множественные аномалии глазной щели, расщепление неба, кифосколиоз, артрогрипоз.
61,XX+24		Прогнатия нижней челюсти, множественные пороки сердца.
61,XY+27		Расщепление неба, кифосколиоз, гипоплазия легкого. Летальна.

Анеуплоидия же по половым хромосомам встречается практически у всех изученных видов животных (табл. 26).

Значительно чаще у животных отмечается мозаицизм по половым хромосомам (табл. 27).

Как видно из данных таблиц 26 и 27 при нарушении в системе гоносом в первую очередь страдает репродуктивная система, что в подавляющем большинстве случаев приводит к бесплодию.

Аномалии в системе гоносом у домашних животных

Вид	Тип аномалии хромосом	Характер нарушения репродуктивной системы	Плодовитость
<i>S. scrofa</i>	39,XXY	Тестикулярная гипоплазия	Бесплодны
<i>B. taurus</i>	61,XXX	не описан	тоже
<i>O. aries</i>	55,XXY	Тестикулярная гипоплазия	тоже
<i>E. caballus</i>	63,X0	Гонадальная дигнезия	тоже
	65,XXX	не описан	тоже
	65,XXY	Тестикулярная гипоплазия, крипторхизм	тоже
<i>C. familiaris</i>	79XXY	Тестикулярная гипоплазия, порок сердца	тоже
	79XXY	Мужской псевдогермафродит	тоже

Большинство из описанных случаев мозаицизма явно связано с изменением в составе гоносом в результате участия в оплодотворении аберрантных гамет. Это, очевидно, указывает на существование общего механизма генетического контроля сегрегации хромосом в процессе клеточного деления. В связи с тем, что между мозаицизмом и так называемой соматической анеуплоидией различия носят чисто количественный характер и обусловлены лишь разным временем их возникновения в онтогенезе, уровень последней, вероятно, детерминируется теми же генетическими механизмами. Нарушения в системе половых хромосом известны также у кошек. Классическим примером этого являются трехцветные или «черепаховые» коты.

Конституциональная анеуплоидия, возникающая в результате нарушения расхождения хромосом в гаметогенезе у нормальных животных или гетерозиготных носителей компаунд-хромосом, наиболее распространена у крупного рогатого скота.

Таблица 27

Влияние мозаицизма в системе половых хромосом
на репродуктивные качества животных

Вид	Тип аномалии хромосом	Характер нарушения репродуктивной системы	Плодовитость
1	2	3	4
S.scrofa	39,XXY/40,XXX	Тестикулярная гипоплазия	Бесплодны
	38,XX/39,XXY	тоже	тоже
B.taurus	61,XXX	не описан	тоже
	59,X0 /60,XX/61/XXX	Нарушение эстрального цикла	тоже
	60,XX/61,XXY	Аноплазия, азоспермия	тоже
	60,XY/61XY	Односторонний крипторхизм	Оплодотворяющая способность близка к норме
	55,XXY	Тестикулярная гипоплазия	Бесплодны
E.caballus	63,X0/64,XX	Гонадальная дигинезия	тоже
	64,XX/64,XY/65,XXY /63,X0	Мужской псевдогермафродит	тоже
	66,XXX	тоже	тоже
	64,XX/65XXY	тоже	тоже
	64,XX/64XY?/65,XXY	Гипоплазия и дистония пениса, билатеральный крипторхизм	тоже
	63,X0/64,XX/65,XXY	Мужской псевдогермафродит	тоже
	63 X0/65XXY	Дистония наружных половых органов, билатеральный крипторхизм	тоже
	63,X0/64,XY	Мужской гермафродитизм	тоже
	79XXY	Тестикулярная гипоплазия, порок сердца	не известно
C.familiaris	78XX/79XXY	Гермафродитизм	Бесплодны
	78XX/79XXY	Мужской псевдогермафродит	тоже

Во всех описанных случаях трисомия по аутосомам у крупного рогатого скота сопровождается серьезными анатомическими дефектами и в большинстве случаев летальна. У лошадей также известны случаи

трисомии по аутосомам. Один из этих случаев (транслокационная трисомия) описан выше. Три других связаны с трисомией по 23, 28 и 30 хромосомам.

К настоящему времени накоплены материалы, свидетельствующие о том, что определенная часть клеток практически у любого животного несет различные нарушения в хромосомном наборе. Основным типом нарушений кариотипа являются различные числовые вариации хромосом. Наиболее часто встречаются различные варианты анеуплоидии. Среди количественных нарушений в хромосомном наборе у животных на первом месте стоит анеуплоидия. Преобладающими среди анеуплоидов являются клетки с утерей части хромосом – гипоплоиды. Ряд авторов склонен, однако, рассматривать гипоплоидию как артефакт. Но в ряде работ гипоплоидия рассматривается как объективно существующее явление, отражающее реальные процессы, происходящие в клетке. Необходимо отметить, что частота гипоплоидии обычно превышает в несколько раз долю гиперплоидных клеток.

При анализе спонтанных изменений числа хромосом необходимо учитывать ряд моментов. Во-первых, в отличие от гиперплоидии гипоплоидия формируется как за счет нерасхождения, так и элиминации хромосом. Во-вторых, этот тип аномалий, как это показано рядом исследователей, зависит от многих биологических факторов, что свидетельствует о его неслучайном характере.

Доля анеуплоидных клеток у свиней колеблется от 3,8 до 24,5 %, в том числе доля гиперплоидов составляет от 1 до 3%. Аналогичная картина наблюдается и у других видов животных. Так, по данным Живалева И.К. (1976), у крупного рогатого скота разных пород доля гипоплоидов составляет от 5,12 до 9,64 %, тогда как гиперплоиды встречаются максимум в 0,06 % клеток. Подобные данные приводит и Бакай А.В. (1995).

У овец гипоплоидия также является наиболее часто встречающимся типом хромосомной аномалии в клетках различных тканей. Сходные данные имеются и по другим видам животных (Красавцев Ю.Ф., 2001).

На то, что анеуплоидия в соматических клетках у животных не связана со случайной утерей хромосом указывает то, что в части клеток имеет место сочетание гипо- и гиперплоидии по отдельным хромосомам.

Интерес к изучению спонтанной изменчивости хромосомного набора продиктован тем, что по данным некоторых авторов этот показатель, с одной стороны, изменяется при различных патологических состояниях, а с другой – получены данные о связи частоты различных спонтанных aberrаций с продуктивностью животных. В исследованиях Живалева И.К. (1976) показано повышение уровня хромосомной изменчивости соматических клеток при лейкозе крупного рогатого скота. Подобную картину отметил Круть Н.И. (1974) при атрофическом рините и чуме свиней.

В работах Евсикова В.И. и др. (1970) установлена отрицательная связь между частотой анеуплоидии и плодовитостью норок. Аналогичные данные получены Кленовицким П.М. у свиней (1982) и Розиковой М. у овец (1984). Исаковой Г.К. (1978) отмечена отрицательная связь между полиплоидией и репродуктивными качествами норок.

Второй распространенный тип изменений хромосомного набора в клетках различных тканей – полиплоидия. Исследованиями И.Л.Гольдмана с соавторами (1968) показано, что частота встречаемости полиплоидных клеток у каждого вида имеет определенный для него уровень.

Существует мнение, что повышение уровня полиплоидии наблюдается у животных с нарушениями воспроизводительной функции (Эрнст и Жигачев, 1989). Однако полиплоидизация части клеток, скорее

всего, является компенсаторным механизмом, направленным на поддержание гомеостаза в активно функционирующих органах (Бродский, Урываева, 1981).

Структурные aberrации хромосом в соматических клетках у животных встречаются, как правило, реже, чем числовые вариации. И, тем не менее, в последние годы у ряда животных с нарушением репродуктивной функции нами было отмечено повышение доли лимфоцитов с повышенным уровнем структурных аномалий хромосом. В частности, такие животные отмечены среди хряков пород ландрас и йоркшир.

Причем если в норме у свиней aberrации представлены, в большинстве случаев, хроматидными разрывами, то у этих животных наблюдался довольно высокий уровень клеток, содержащих спонтанные транслокации и множественные aberrации. Крайним случаем множественных aberrаций является фрагментация или пульверизация хромосом.

Помимо спонтанных транслокаций в соматических клетках у ряда животных выявляется еще одна грубая хромосомная aberrация – дицентрические хромосомы, приводящие к дисбалансу генетического материала в процессе деления клеток.

Описанные выше хромосомные aberrации часто сопровождаются нарушениями репродуктивных качеств животных. Причем в ряде пород и линий частота аномалий достаточно высока. В связи с чем очевидна необходимость широкого внедрения цитогенетического обследования в практику животноводства.

Еще одна спонтанная аномалия кариотипа – это химеризм по половым хромосомам. Эта аномалия достаточно хорошо изучена у рогатого скота. Показано, что у телок из разнополых двоен химеризм в

подавляющем большинстве случаев приводит к бесплодию (Эрнст, Жигачев; 1990. 2006).

У разнополых двоен овец в работах, выполненных в ВИЖе, химеризм не был обнаружен (Розикова и Кленовицкий, 1983; Марзанов и др., 2006). Довольно подробно этот вопрос изучен и у домашней свиньи (Гольдман и др., 1986). Сведения о химеризме по половым хромосомам у собак в литературе отсутствуют (Белова и Кленовицкий, 2003). Однако в наших исследованиях описан случай химеризма XY/XX у кобеля породы малый пудель из московской популяции (Кленовицкий и др., 2005).

Приведенные выше материалы свидетельствуют об отрицательном влиянии хромосомных аномалий на репродуктивные качества животных. Причем в ряде пород и линий частота аномалий достаточно высока. Именно поэтому очевидна необходимость широкого внедрения цитогенетического обследования в практику животноводства. Организация цитогенетического контроля должна строиться с учетом ряда основных принципов.

Во-первых, необходимо организация оперативного обмена информацией между учреждениями, занимающимися вопросами цитогенетического контроля, с этой целью необходимо создание единого банка данных, который включал бы сведения о носителях хромосомной патологии.

Во-вторых, включение сведений о цитогенетической характеристике животного в племенные документы.

В-третьих, закупка семени и племенного материала из-за рубежа должна проводиться лишь при наличии цитогенетического сертификата.

Цитогенетическое обследование в регионах должно осуществляться с использованием информации о распространенности хромосомных аномалий в породах и линиях:

1) породы и линии, в которых зарегистрированы случаи хромосомной патологии, передающейся по наследству (все варианты транслокаций и других структурных перестроек), а также потомки носителей хромосомных аномалий при отсутствии на них цитогенетического паспорта;

2) породы и линии, не исследованные цитогенетически ранее;

3) все случаи массового нарушения репродукции или генетической патологии неясной природы.

В первую очередь обследованию подлежат производители и самцы, предназначенные для ремонта стада, а также племенной молодняк двух первых категорий.

Вопрос о дальнейшем использовании носителей хромосомных аномалий должен решаться с учетом степени фенотипического проявления аномалии, племенной и продуктивной их ценности.

Хромосомные aberrации можно разделить на два больших класса: конституциональные – присущие всем клеткам, унаследованные от родителей или возникшие в процессе созревания гамет и соматические – возникающие в отдельных клетках в ходе онтогенеза.

С учетом генетической природы и фенотипического проявления хромосомных аномалий несущие их животные могут быть подразделены на четыре группы:

1) носители наследуемых аномалий с предрасположенностью к снижению репродуктивных качеств в среднем на 10 %. В эту группу входят носители робертсоновских и tandemных транслокаций. Теоретически 50 % потомков наследуют патологию.

2) носители наследуемых аномалий, приводящих к четко выраженному снижению репродукции (30-50 %) и врожденной патологии. В эту группу входят носители реципрокных транслокаций. Около 50 % потомков наследуют патологию.

3) Животные с аномалиями, возникающими de novo, приводящими к врожденной патологии (моносомии, трисомии и полисомии в системе аутосом и половых хромосом, мозаицизм и химеризм). В подавляющем большинстве случаев такие животные бесплодны.

4) Животные с повышенной нестабильностью кариотипа. Репродуктивная функция снижена, возможна наследственная предрасположенность.

Робертсоновские транслокации, связаны с изменением числа двухплечих хромосом и у большинства видов могут быть выявлены на основании визуального анализа и подсчета числа хромосом. Идентификация других типов конституциональных аномалий возможна только на основании кариотипирования.

Соматические aberrации выявляют путем микроскопирования определенного числа клеток. При анализе соматической анеуплоидии и спонтанных структурных aberrаций от каждого животного исследуется не менее 30 метафаз. Для анализа уровня полиплоидии просматривают не менее 200 метафаз.

Производители, при наличии у них аномалий первого и четвертого типа хромосомных аномалий, в случае их высокой племенной ценности могут быть использованы в племенных целях, но с обязательным цитогенетическим обследованием всех их потомков, оставляемых для племенных целей. Для племенных целей оставляются только потомки, свободные от хромосомной патологии.

Животные второй группы оказывают резко отрицательное влияние на воспроизводство, например, многоплодие свиноматок, покрытых хряками – носителями реципрокных транслокаций снижается на 30-50%, в связи, с чем подлежат безусловной выбраковке. При наличии у них интересных в племенном плане признаков, возможно использование их потомков, свободных от хромосомной аномалии.

Животные третьей группы, как правило, несут аномалии, несовместимые с нормальной жизнедеятельностью и бесплодны. Все носители этих аномалий подлежат выбраковке.

В литературе описаны случаи возникновения хромосомных аномалий *de novo* как у свиней, так и у крупного рогатого скота. Хотя для известных случаев спонтанных аберраций у животных этиология их неясна, не исключено, что причиной их возникновения может быть и действие радиации. Среди других причин можно указать действие различных биологически активных веществ, в том числе применяемых в сельскохозяйственной практике, а также различные инфекционные заболевания вирусной природы.

Не исключается возможность спонтанного возникновения различных структурных перестроек в результате каких-либо внутренних причин, приведших к нарушению нормального расхождения хромосом в ходе клеточного цикла. Но необходимо отметить, что вероятность такого события ничтожно мала. В связи с этим можно предположить, что все известные перестройки хромосом, выявляемые в природных популяциях, индуцированы действием различных средовых факторов. Отсюда следует, что один из путей профилактики возникновения и распространения хромосомной патологии основан на предупреждении загрязнения окружающей среды. Очевидна и необходимость цитогенетического контроля не только при экологических исследованиях и в племенной работе, но и при различных биоинженерных манипуляциях.

Об эффективности селекции против хромосомных аномалий говорят следующие факты. По данным Густавссона (1989) среди хряков с пониженной репродукцией почти 50% животных несут в своем кариотипе различные транслокации. В то же время, как отмечает Голиш (1988), среди проверенных по продуктивности хряков доля носителей хромосомных аномалий составляет около 1%. В свиноводстве России традиционно

уделяется внимание отбору животных по многоплодию, и среди нескольких сотен обследованных свиней был зарегистрирован лишь один случай транслокации. В то же время в скотоводстве основным методом профилактики малоплодия являются гормональные обработки, а частота хромосомных аномалий составляет в ряде пород до 6%. Однако в связи с тем, что селекция по репродуктивным признакам является эффективным приемом элиминации хромосомных аномалий, встает вопрос: нужно ли цитогенетическое обследование животных? Ответ может быть только один – да. Во-первых, цитогенетическое обследование позволяет в раннем возрасте выявить носителей аномалий, тем самым избежав затрат на их выращивание и риска распространения патологии в стаде. Во-вторых, в силу действия механизмов презиготической компенсации, фенотипический эффект аномалии может быть нивелирован. Это может привести к ее широкому распространению и, в случае блокировки компенсирующих механизмов, к значительным потерям в результате недополучения приплода.

Вопросы для самопроверки по теме 16.

1. Хромосомный полиморфизм в популяциях домашних животных.
2. Характер влияния транслокаций на продуктивность животных.
3. Анеуплоидия по аутосомам и ее последствия.
4. Изменения в числе гоносом.
5. Соматические нарушения, связанные с изменением числа хромосом.
6. Структурные aberrации хромосом в соматических клетках.
7. Роль цитогенетических исследований в сертификации племенных животных.

8. Принципы цитогенетического мониторинга.
9. Категории животных подлежащих цитогенетической сертификации.
10. Цитогенетические показатели, используемые в сертификации.

Глава 17. Анализ генетической структуры хромосом

Генные карты животных. Дифференциальная окраска. Гибридизация *in situ*. FISH-метод. Хромосомный пэ́йнтинг. Автоматический анализ хромосом.

В начале 90-х годов минувшего столетия в результате разработки молекулярных методов анализа генома и принципов реверсивной генетики проблема анализа генома сельскохозяйственных животных привлекла внимание исследователей во многих лабораториях мира. В рамках этих исследований в США и Западной Европе возник ряд программ по построению генных карт крупного рогатого скота, свиньи, овцы, лошади и других видов одомашненных животных.

Интерес к построению генных карт у одомашненных животных обусловлен рядом причин, в том числе поиском маркеров продуктивных признаков и решением вопросов филогенеза животных. Необходимо отметить, что анализ генных карт у этих видов еще далек от завершения, а потому некоторые имеющиеся сейчас сведения будут в ходе дальнейших исследований, несомненно, уточнены. Это касается не только локализации новых маркеров, но и уточнения данных по тем маркерам, для которых разными авторами получены противоречивые данные. Считается, что для построения генной карты, приемлемой для анализа генома, расстояние между маркерами должно быть менее 20 сМ (O'Brien S.J., 1991). Для построения генетической карты крупного рогатого скота с разрешением 20 сМ необходимо, как минимум, 150-200 маркеров. Однако, если учесть то, что маркеры выделяются случайным образом, эта стратегия становится мало эффективной, и требуется уже не менее 500 маркеров для достижения 99% полноты карты с такими промежутками (Steel M.R., George M., 1991).

Более того, и в этом случае сохраняется относительно высокая ошибка при идентификации сцепленного с маркером главного гена.

Длительное время основным методом картирования хромосом у высших животных с длительным циклом репродукции оставался генетико-популяционный анализ. Именно этим методом был обнаружен первый случай сцепления генов у крупного рогатого скота: тесное сцепление генов казеина молока. Этот метод широко применяется в генетике человека и основан на оценке достоверности отклонений частоты рекомбинации между двумя генами от 0,5, т.е. частоты, ожидаемой при отсутствии сцепления. Данный тест носит название *lod-score test*. В силу высокой продолжительности репродуктивного периода у животных этот подход к построению генетических карт накладывал существенные ограничения на изучение генома сельскохозяйственных животных.

Дальнейшему развитию работ в области картирования хромосом у высших животных значительно способствовали разработки в области генетики соматических клеток. Новым шагом в этом направлении явилась разработка гибридной техники. Гибридизация соматических клеток является уникальной системой для анализа взаимодействия генов и их хромосомной локализации. В основе этого метода локализации генов лежат следующие моменты: способность соматических клеток в определенных условиях сливаться, образуя гибридные клетки (гибридомы); нестабильность кариотипа гибридом – потеря части хромосом в ходе культивирования. Анализируя дифференциальную структуру хромосом в отобранных культурах можно на основании особенностей кариотипа определить хромосомную локализацию интересующего нас гена. Однако этот метод имеет ряд недостатков: им могут быть выявлены лишь гены ферментных систем (например, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа на X-хромосоме); невозможно установить место физической локализации гена на хромосоме. В силу анонимности сайтов локализации

генов на хромосомах методом гибридизации клеток, для построения хромосомной карты данный метод необходимо дополнять гибридологическим анализом.

Проблема хромосомной локализации генов у животных была практически решена после разработки метода гибридизации *in situ*. Термин *in situ* означает «в месте положения». Разработка этого метода явилась следующим шагом в изучении организации наследственного аппарата у животных. В совокупности с методами анализа дифференциальной структуры хромосом он позволяет определять положение гена непосредственно на хромосоме.

В основу метода положено явление гибридизации хромосомной ДНК со специфическими зондами, несущими определенные нуклеотидные последовательности, в том числе и структурных генов.

К 1995 г. число картированных генов у человека превысило 5800, у мыши оно составило более 2600, около 900 генов локализовано у крупного рогатого скота и более 400 у свиней, в меньшей степени был изучен геном овцы и лошади. На момент написания данной книги только в нашем банке данных имелись сведения о локализации 2130, 1602, 803 и 519 маркеров у крупного рогатого скота, свиньи, овцы и лошади. Применение различных методов картирования привело к созданию двух видов карт: физической и генетической. Физические карты отражают реальное положение гена на хромосоме, а генетические – их расстояние друг от друга и от реперной точки в единицах перекреста (сМ). Карты сцепления и физические карты дают тождественное отображение генных последовательностей.

Данный метод в генетике животных явился несомненным шагом вперед, ибо он позволяет определять локализацию генов и их сцепление, не прибегая к гибридологическому анализу, что, учитывая длительный процесс смены поколений, многократно ускоряет процесс картирования хромосом. Разумеется, по степени изученности локализации генов

сельскохозяйственные животные значительно уступают человеку и лабораторным животным, у которых локализовано гораздо большее число генов. Но данный метод находит в генетике животных все большее применение. С одной стороны, он используется при построении генетической карты и для определения групп сцепления, что может быть использовано в качестве прогнозирующего метода. Первый пример попытки реализовать этот подход содержится в работах бельгийских исследователей. Используя ДНК-маркеры, им удалось выявить маркер, сцепленный с геном мышечной гипертрофии. С другой стороны интерес к этим исследованиям продиктован широким интересом к получению генетически трансформированных животных (трансгенезу). Оказалось, что эффект трансформации генотипа зависит от того, в какой участок генома встроился данный ген. Ответить на этот вопрос можно, используя данный метод.

Процесс локализации генов методом гибридизации *in situ* включает ряд этапов: получение зонда, его мечение, денатурацию зонда, денатурацию препарата и гибридизацию на препарате. Проблема выделения и клонирования зондов выходит за рамки данной книги, поэтому ограничимся лишь изложением принципов, лежащих в основе самого метода.

В основе метода лежит свойство двухнитевой молекулы ДНК к **денатурации** или «**плавлению**» под действием физических или химических агентов и восстановлению своей нативной структуры (**ренатурации**) после прекращения действия соответствующего агента. Сущность плавления ДНК состоит в разрушении под действием высокой температуры или щелочи водородных связей между азотистыми основаниями, поддерживающих спиральную структуру молекулы. Если к тестируемому образцу ДНК добавить ДНК из другого источника (репер или зонд), то после прекращения воздействия денатурирующего агента

возникнет определенная часть гибридных ДНК, которые будут содержать нити как тестируемого образца, так и репера. Доля таких молекул будет тем выше, чем выше гомология тестируемой и реперной ДНК. Уровень этой гомологии можно оценить количественно, если включить в репер изотопную метку. Этот метод широко используется в таксономических исследованиях. Аналогичная картина имеет место и при гибридизации *in situ*. Отличие состоит в том, что плавлению подвергается ДНК неразрушенных хромосом непосредственно на препарате.

Наиболее распространенный способ мечения зонда основан на замещении оснований в процессе репарации однонитевых разрывов (**метод ник-трансляции**). В этом случае метка оказывается включенной в 30-75 % ДНК-зонда. В настоящее время для получения меченых зондов используется также метод полимеразной цепной реакции (PCR). В этом случае для синтеза зонда в качестве «затравки» используются его концевые последовательности – **праймеры**. В качестве метки используются трифосфаты, содержащие молекулы трития или радиоактивного йода, или биотиновую метку. Затем зонд и препарат денатурируют и проводят их гибридизацию. В процессе ренатурации молекулы зонда связываются с комплиментарными им участками хромосомной ДНК.

Процесс гибридизации носит статистический характер в связи, с чем возможен ряд вариантов. Наиболее часто метится лишь одна из хроматид, несущих исследуемую последовательность, при этом интенсивность мечения может колебаться в широких пределах.

Локализация зонда осуществляется путем выявления меток на хромосомах при их микроскопировании. При изотопном методе меткой являются гранулы серебра наносимой на препарат фотоэмульсии, характер засветки которой зависит от длины свободного пробега излучаемых частиц и связан с местонахождением зонда. В случае

использования неизотопной метки (биотин) локализация зонда осуществляется с использованием специфических реакций и выявляющих их красителей.

Оценка локализации гена есть процесс статистический по самой своей природе. В случае использования изотопного метода положение метки зависит от подчиняющейся закону нормального распределения длины свободного пробега частицы, а также от направления ее движения, которое также носит случайный характер. Это является одной из причин возникновения фонового мечения и снижения вероятности появления метки в месте локализации. Данный недостаток в определенной мере устраняется при использовании нерадиоактивной метки. Но и при этом остается ряд фоновых факторов. Один из них – неспецифическое связывание зонда с ДНК хромосом. Кроме того, в части хромосом молекула ДНК может восстановить свою структуру прежде, чем одна из ее цепей прореагирует с молекулой зонда, поэтому критерием локализации гена при классическом методе гибридизации *in situ* является не наличие метки, а максимальное число меток на хромосому. Повышению точности локализации генов способствовало создание метода PCR – *in situ*, позволившего значительно усилить исходящий от зонда сигнал за счет амплификации анализируемого участка хромосомы в результате проведения полимеразной цепной реакции непосредственно на цитологическом препарате.

Помимо локализации генов метод гибридизации *in situ* нашел применение при изучении локализации хромосомных перестроек. С его применением идентифицирован ряд транслокаций у свиней и крупного рогатого скота. В качестве хромосомных маркеров в этом случае служили зонды структурных генов. Однако данные о локализации различных генов у домашних животных ограничены, в связи, с чем наибольший интерес в этом плане представляет использование специальных

хромосомных зондов, нашедшее широкое применение в практике медицинской цитогенетики. В основу этого метода положен тот факт, что значительная часть ДНК (около 90 %) не кодирует структурные гены, а выполняет не ясные пока до конца функции в структуре хромосом. К этому типу ДНК относятся и различные классы так называемой сателлитной ДНК. Оказалось, что один из классов этой ДНК (альфа-сателлиты) обладает хромосомной специфичностью, что позволило создать серию зондов, позволяющих идентифицировать индивидуальные хромосомы. Принцип идентификации их аналогичен идентификации различных генов: к препарату добавляется специфический зонд, который связывается с определенной хромосомой, и по наличию метки осуществляется опознание данной хромосомы.

Применение этого метода позволяет легко идентифицировать не только различные количественные нарушения в кариотипе по числу меток на препарате, но и структурные перестройки, причем даже те, которые не выявляются методами обычной световой микроскопии. Идентификация структурных перестроек основана на серии последовательных гибридизаций препарата с зондами к различным хромосомам.

Данный метод нашел широкое применение не только при изучении хромосомных заболеваний в медицине, но и в экологических исследованиях при изучении повреждающего действия различных средовых агентов, в том числе и радиации, на хромосомный аппарат. В сочетании с описанным выше методом проточной сортировки хромосом этот прием обладает высокой эффективностью и технологичностью. Таким образом, развитие методов молекулярной биологии дало цитогенетике новый мощный метод изучения хромосомного набора животных.

Гибридизация *in situ* положила начало огромному числу методических разработок, которые уже нашли широкое применение в практической медицине, а современная хромосомная диагностика продвинулась значительно дальше самых смелых фантазий цитологов 80-х годов. В цитогенетике млекопитающих последние годы ознаменованы стремительным развитием новых методов исследований, в основе которых лежит флуоресцентная *in situ* гибридизация нуклеиновых кислот или FISH (рис.59).

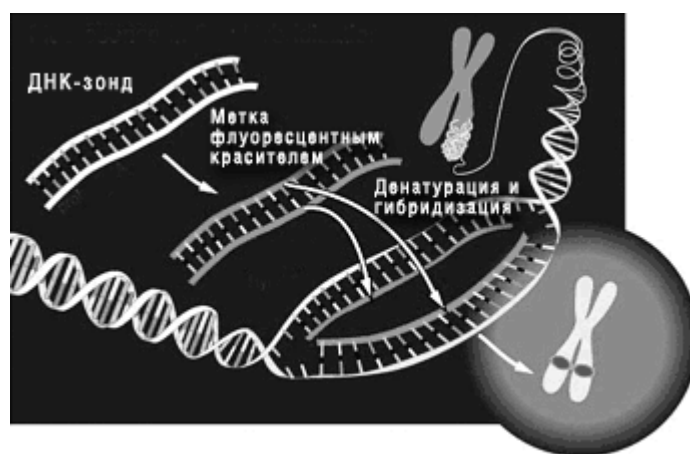


Рис.59. Схема гибридизации *in situ* с флуоресцентной меткой (FISH)

Десять-пятнадцать лет назад возможности исследователя при идентификации гомологов и анализе хромосомных перестроек были практически сведены к изучению морфологии и дифференциальной окрашиваемости хромосом и их отдельных районов. Точность этих исследований значительно зависела от разрешающей способности того или иного метода дифференциальной окраски хромосом.

В основу всех известных методов дифференциальной окраски положено избирательное связывание флуоресцентных красителей с зонами хромосом, имеющими специфический нуклеотидный состав, или окрашивание хромосом красителем Гимза после обработки их в трипсине или солевых растворах. В настоящее время существует многочисленный ряд модификаций основных вариантов окраски, описанных в ряде

руководств по цитогенетике. Сложность использования этих методов заключается в том, что они крайне требовательны к качеству препаратов и условиям их обработок. Кроме того, ряд хромосомных перестроек (в основном, это микроперестройки, часто являющиеся причиной наследственных болезней) практически невозможно идентифицировать даже на дифференциально окрашенных препаратах высокой степени разрешения.

Развитие методов гибридизации *in situ*, позволивших визуализировать на цитологических препаратах интересующие последовательности ДНК, резко изменило ситуацию.

В методе FISH используются флуоресцирующие молекулы для прижизненной окраски генов или хромосом. Метод применяется для картирования генов и идентификации хромосомных aberrаций. Методика начинается с приготовления коротких последовательностей ДНК, называемых зондами, которые являются комплементарными по отношению к последовательностям ДНК, представляющим объект изучения. Зонды гибридизуются (связываются) с комплементарными участками ДНК и благодаря тому, что они помечены флуоресцентной меткой, позволяют видеть локализацию интересующих генов в составе ДНК или хромосом. В отличие от других методов изучения хромосом, требующих активного деления клетки, FISH можно выполнять на неделящихся клетках, благодаря чему достигается гибкость метода.

FISH может применяться для различных целей с использованием зондов трех различных типов:

1. Лocus-специфичные зонды, связывающиеся с определенными участками хромосом. Данные зонды используются для идентификации имеющейся короткой последовательности выделенной ДНК, которая используется для приготовления меченого зонда и его последующей гибридизации с набором хромосом.

2. Альфоидные или центромерные зонды-повторы представляют собой повторяющиеся последовательности центромерных областей хромосом. С их помощью каждая хромосома может быть окрашена в различный цвет, что позволяет быстро определить число хромосом и отклонения от нормального их числа.

3. Зонды на всю хромосому являются набором небольших зондов, комплементарных к отдельным участкам хромосомы, но в целом покрывающими всю ее длину. Используя библиотеку таких зондов можно «раскрасить» всю хромосому и получить дифференциальный спектральный кариотип индивида. Данный тип анализа применяется для анализа хромосомных aberrаций, например транслокаций, когда кусочек одной хромосомы переносится на плечо другой.

Современная техника регистрации сигнала способна регистрировать не только его интенсивность, но и спектральные характеристики. Такое приборное оснащение лежит в основе спектрального кариотипирования (SKY). Однако в настоящее время для получения многоцветных изображений FISH вполне достаточно обычной черно-белой цифровой регистрации сигнала. Информация об интенсивности свечения каждого из флуорохромов записывается отдельно благодаря специфичной комбинации возбуждающего и запирающего фильтров. При этом каждому из таких изображений присваивается свой собственный уникальный псевдоцвет, т.е., используя данную методику, мы получаем специфическую картину свечения хромосом, получившую название хромосомного пэйнтинга.

Следует заметить, что одновременное использование нескольких флуорохромов позволяет получить за счет их комбинаций значительно большее число псевдоцветов. Поясним это следующим примером. Пусть точка, окрашенная флуорохромом *a*, будет считаться точкой псевдоцвета № 1, точка, окрашенная флуорохромом *b*, будет считаться точкой псевдоцвета № 2, в этом случае можно принять, что точка,

окрашенная флуорохромами *a* и *b* одновременно, будет считаться точкой псевдоцвета № 3 окраски хромосом).

Рассмотрим теперь ряд конкретных приемов использования FISH в цитогенетическом анализе. Один из них это так называемый «24-цветный FISH» (рис. 60).

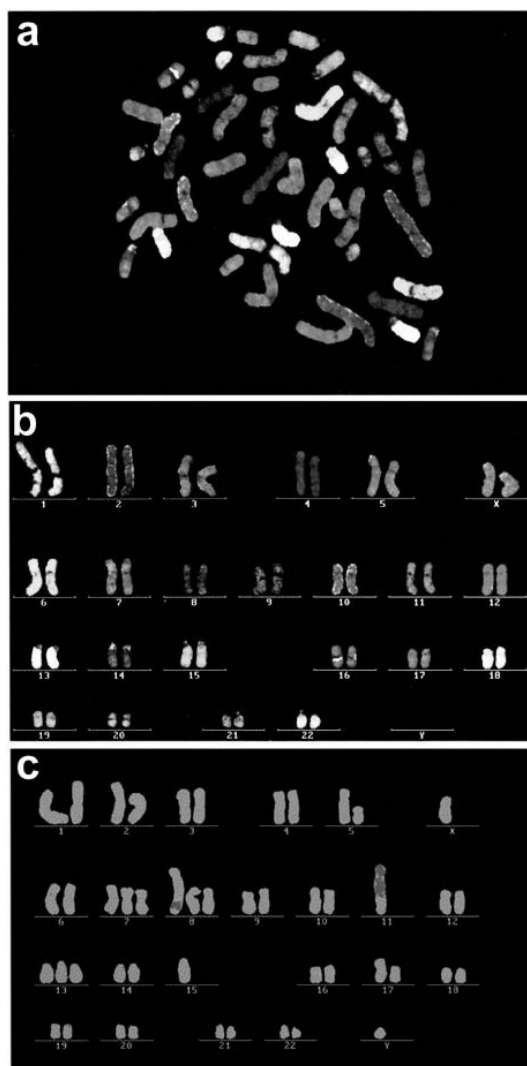


Рис. 60. 24-цветная FISH хромосом человека: а – метафазная пластинка; б – кариотип человека; с – анализ транслокации 8-й и 11-й хромосом человека

Кариотип человека состоит из 22 аутосом и половых хромосом X и Y. То есть для одновременной идентификации материала всех хромосом человека необходимо иметь 24 уникально меченые хромосомоспецифичные ДНК-пробы. Для их мечения вполне достаточно 5

флуорохромов. В результате флуоресцентной *in situ* гибридизации каждой хромосоме человека соответствует свой псевдоцвет. Такой метод хромосомного анализа позволяет выявлять и идентифицировать любые транслокации материала негомологичных хромосом. Окраска хромосомы более чем одним цветом свидетельствует о наличии транслокации. Цвет хромосомных районов позволяет однозначно определить хромосомы, которые были вовлечены в данные хромосомные перестройки. К сожалению, необходимо отметить, что 24-цветная FISH оказывается бесполезной при анализе внутривхромосомных перестроек. Делеции, инверсии, дубликации остаются невидимыми для этого метода.

Благодаря 24-цветной FISH первичный анализ сложных кариотипов может быть завершён менее чем за двое суток. При этом полученные результаты будут абсолютно достоверны. Только в самых сложных случаях могут потребоваться дополнительные исследования для уточнения положения точек разрывов-воссоединений

В 1997 г. Малкольм Фергюсон-Смит с сотрудниками разработали базу для метода многоцветного бэндинга хромосом человека. В основе этого метода, получившего название RXFISH, лежит тот же принцип многоцветной *in situ* гибридизации, но в отличие от 24-цветной FISH, этот метод позволяет выявлять и часть внутривхромосомных перестроек. ДНК-пробы, используемые в RXFISH, помечены комбинацией трех флуорохромов, что обеспечивает 7 псевдоцветов. Однако они специфично окрашивают отдельные районы хромосом, создавая их цветную исчерченность. Метод позволяет осуществлять анализ всего генома человека в одном эксперименте многоцветной FISH (рис. 61).

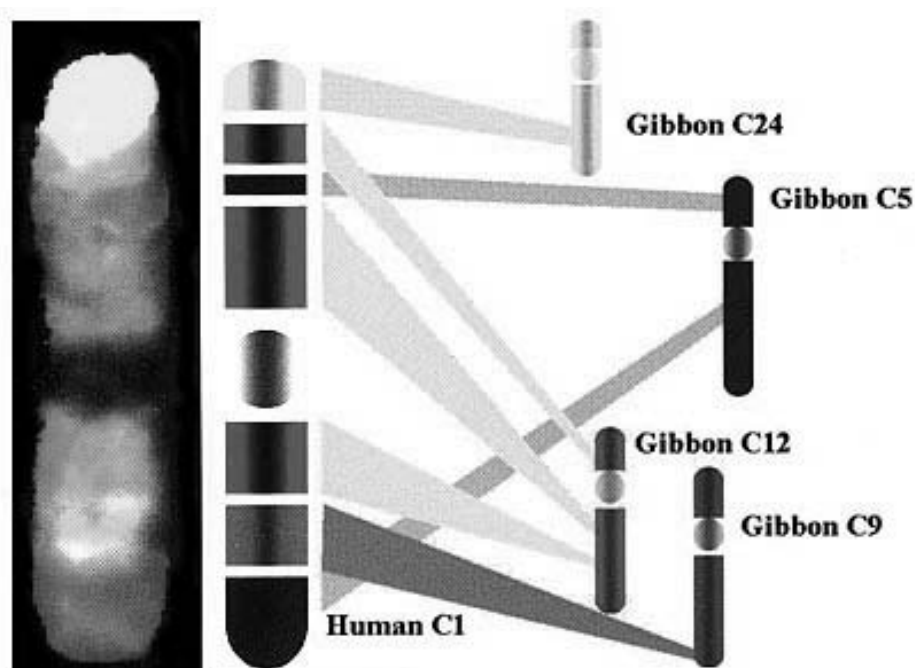


Рис. 61. Природа цветной исчерченности хромосомы 1 человека при RXFISH.

К недостаткам RXFISH можно отнести большой размер многих цветных бэндов. А такие хромосомы человека, как 15, 18, 19, 21, 22, X и Y, представляют собой один цветной бэнд каждая. Использование в будущем большего числа флуорохромов и новых ДНК-проб, полученных благодаря использованию искусственных хромосом или микродиссекции метафазных хромосом, может значительно повысить разрешающие способности метода.

Одновременно с RXFISH была предложена еще одна система получения многоцветного бэндинга хромосом человека. В отличие от RXFISH, она предназначена не для полного анализа всех хромосом, а для проведения детального анализа одной из них. В этих целях был получен комплект микродиссекционных ДНК проб и разработано специальное программное обеспечение “MetaSystems’ isis mFISH” для сравнительного анализа уровня свечения различных флуорохромов. Районспецифичные ДНК пробы были помечены различными флуорохромами или комбинациями флуорохромов (рис. 62).

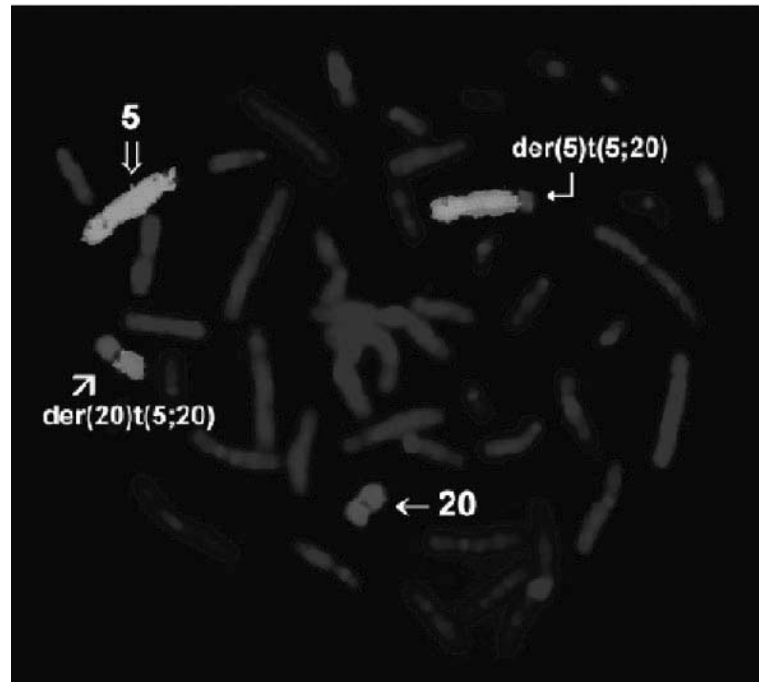


Рис.62. Выявление перестроек кариотипа с помощью хромосомоспецифических пэинтинг проб

В Институте цитологии и генетики СО РАН разработан новый метод получения молекулярных маркеров хромосом и хромосомных районов на базе микродиссекции метафазных хромосом и ТОРО-DOP-PCR, что открыло возможности анализа самых сложных хромосомных перестроек путем создания ДНК-библиотек рассматриваемой хромосомы или хромосомного района. Этот подход обеспечивает идентификацию точек разрыва хромосом на уровне разрешения, соответствующего, как минимум, прометафазной хромосоме. Кроме того, с помощью данного метода возможно быстрое получение любых ДНК-зондов для детекции определенных типов хромосомных перестроек, например районспецифичных ДНК-библиотек для идентификации аномальных хромосом, характерных для определенных типов лейкозий. Использование настоящего метода для анализа врожденных хромосомных аномалий, таких как делеции небольших хромосомных районов, сверхчисленные маркерные хромосомы, а также для анализа реорганизации хромосом при клеточной малигнизации, показало его высокую эффективность.

Этот подход открывает новые возможности для идентификации гомологии небольших хромосомных районов у представителей различных таксонов, что позволяет рассчитывать на успешное развитие исследований, посвященных выявлению закономерностей эволюции кариотипа в классе млекопитающих.

Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) оказался крайне эффективным инструментом изучения генома человека и других видов млекопитающих, реорганизации хромосом в ходе эволюции, анализа хромосомных перестроек, как при малигнизации клеток, так и при врожденных патологиях. Уже в настоящее время в ряде диагностических центров некоторые варианты многоцветной FISH используются в качестве рутинных методик при анализе хромосомных перестроек у человека.

Наиболее широкое применение они находят при анализе реорганизации генома трансформированных клеток в случаях онкологических заболеваний. Крайне перспективным представляется их использование при изучении организации интерфазного ядра и пространственной организации хромосом в ходе клеточного цикла. Дальнейшее совершенствование методов многоцветной FISH и их совместное использование с конфокальной микроскопией может открыть принципиально новые возможности в цитологических исследованиях, а полученные с их помощью результаты могут привести к революции в наших взглядах на морфофункциональную организацию клетки.

Значительную роль в развитии новых вариантов FISH сыграл приход новых методов регистрации микроскопических изображений. Замена фотонасадок CCD-камерами (CCD-камерами с высоким уровнем разрешения, охлаждаемыми CCD-камерами с длительным временем накопления сигнала и т.д.) с соответствующим компьютерным обеспечением не просто упростила и ускорила процесс регистрации микроскопических изображений, но и предоставила экспериментатору

принципиально новые возможности обработки изображений, записанных в цифровом формате. Новая приборная база позволила осуществлять регистрацию сверхслабых световых сигналов, недоступных глазу человека, а также световых сигналов с длинами волн, выходящими за пределы видимого света.

Методы получения, обработки и анализа препаратов хромосом крайне трудоемки. В связи с этим еще в 70-е годы прошлого века был разработан ряд систем, повышающих технологичность процессов приготовления и анализа хромосом. Рабочий цикл таких систем включает: разлив культуральной среды; отбор и введение в среду образцов крови; дозировку и введение цитостатиков; осаждение клеток и удаление надосадочной жидкости; ресуспендирование; разлив по флаконам гипотонического раствора; нанесение суспензии клеток на предметные стекла и высушивание препаратов; окраску препаратов. По сравнению с ручной обработкой препаратов эти системы позволяют снизить затраты времени в 8 раз, что в значительной мере позволяет стандартизировать условия приготовления препаратов при проведении больших объемов исследований.

Подобные системы могут сочетаться с автоматизированными системами поиска и анализа метафазных пластин. Для проведения поиска используют различные автоматические анализаторы изображения микрообъектов. Эти системы представляют собой микроскоп с устройствами автоматического перемещения предметного столика и фокусировки, оснащенный телекамерой, связанной с компьютером через преобразователи электронных сигналов. Наличие специального пакета программ позволяет проводить автоматизированное кариотипирование. В случае необходимости изображение микрообъекта может быть сохранено и проведено дополнительное его исследование с применением соответствующих аппаратных средств. В частности может быть проведен

анализ изменения оптической плотности по длине хромосом (денситометрия), применяемый при анализе дифференциально окрашенных хромосом.

Еще один подход к автоматизации анализа хромосом основан на методе проточной цитофлуорометрии. В отличие от традиционных методов, основанных на исследовании хромосом в митотической или мейотической клетке, этот метод базируется на анализе изолированных хромосом. Хромосомы для анализа окрашивают двумя флуорохромами, имеющими разную волну возбуждения, после чего митотические хромосомы отделяют от остального клеточного материала и помещают в систему. Данный метод позволяет дать количественную оценку рисунка флуоресценции и на его основании провести идентификацию большого числа хромосом. Помимо анализа эта система может быть использована для сортировки хромосом.

Метод проточной флуорометрии имеет важные преимущества перед другими – высокую скорость и точность анализа. Некоторые хромосомные aberrации настолько малы, что их невозможно обнаружить обычными методами, но при определенных условиях они легко выявляются при флуорометрии. Показано, что использование этого метода позволяет идентифицировать все известные конституциональные аномалии кариотипа у свиней и овец.

Однако наиболее важно, что этот метод позволяет препаративно разделять хромосомы и с использованием специальных зондов исследовать структуру и функцию как хромосом, так и отдельных генов. В этом случае интересующий ген можно локализовать с помощью гибридизации *in situ*, размножить его ДНК методом клонирования и секвенировать, что может быть использовано как при анализе генома животных и выявлении различных вариантов генетического полиморфизма, так и в генно-инженерных исследованиях.

Вопросы для самопроверки по теме 17.

1. Роль картирования генов в маркерной селекции.
2. Методы картирования генов.
3. Молекулярные основы гибридизации *in situ*.
4. Сущность FISH метода.
5. Типы зондов, используемые для FISH.
6. Что такое хромосомный пэйнтинг?
7. Варианты хромосомного пэйнтинга, применяемые в цитогенетических исследованиях.
8. Задачи, решаемые на основе FISH.
9. Автоматический анализ метафазных хромосом.
10. Проточная флуориметрия.

Глава 18. Нормативные акты, регламентирующие сертификацию племенного материала в РФ

Федеральный закон «О селекционных достижениях». Федеральный закон «О племенном животноводстве». Государственная программа «Генетическая экспертиза племенной продукции (материала) в Российской Федерации».

Во второй половине XX столетия в связи с концентрацией и интенсификацией животноводства, пересмотром ряда селекционных программ и ростом антропогенной нагрузки остро встал вопрос о профилактике наследственных заболеваний. Неслучайно в странах с развитым животноводством существуют национальные программы генетического мониторинга. В России подобные исследования предусмотрены статьей 19 Федерального закона «О племенном животноводстве» и регламентируются Государственной программой «Генетическая экспертиза племенной продукции (материала) в Российской Федерации», утвержденной в 1998 г. МСХ и продовольствия РФ (приказ № 291).

К настоящему времени во всех странах мира с развитым животноводством введена обязательная проверка достоверности происхождения племенных животных всех видов по группам крови. Практика показывает, что даже в таких племпредприятиях с хорошо налаженным племенным учетом, как конезавод, встречаются ошибки в достоверности происхождения. Ошибки в происхождении приводят к снижению точности оценки генотипа животных, эффективности отбора и тормозят темпы совершенствования продуктивных и породных качеств животных.

В России мобилизация, сохранение и использование генофонда животных с хозяйственно-ценными признаками отнесены к приоритетным

направлениям развития науки и техники (Пр-577 от 30 марта 2002). Учитывая, что в повышении и эффективном использовании генетического потенциала сельскохозяйственных животных важную роль играет изучение генетической обусловленности хозяйственно-полезных признаков, генодиагностика была включена в перечень критических технологий Российской Федерации (Пр-578 от 30 марта 2002 г.).

Отправным моментом в работах по сертификации племенного материала служит Федеральный закон Российской Федерации «О селекционных достижениях». Статья 1 этого закона включает основные понятия, определяющие суть селекционного достижения и, следовательно, объектов, подлежащих генетической сертификации

Статья 1 Федерального закона Российской Федерации от 6 августа 1993 г. № 5605-1 «О селекционных достижениях»: «Основные понятия. Понятия, используемые в настоящем Законе, означают следующее: селекционное достижение – сорт растений, порода животных; порода – группа животных, которая независимо от охраноспособности обладает генетически обусловленными биологическими и морфологическими свойствами и признаками, причем некоторые из них специфичны для данной группы и отличают ее от других групп животных. Порода может быть представлена женской или мужской особью или племенным материалом. Охраняемыми категориями породы являются тип, кросс линий; племенное животное – животное, предназначенное для воспроизводства породы; племенной материал – племенное животное, его гаметы или зиготы (эмбрионы)».

Племенное животноводство призвано обеспечить процесс воспроизводства племенных животных в целях улучшения продуктивных качеств сельскохозяйственных животных и разведения высокопродуктивных сельскохозяйственных животных, сохранения генофонда малочисленных и исчезающих пород сельскохозяйственных

животных, полезных для селекционных целей. Племенное животноводство – разведение племенных животных, производство и использование племенной продукции (материала) в селекционных целях.

Главы 3 и 4 Закона Российской Федерации «О племенном животноводстве» регламентируют порядок управления и государственного регулирования в племенном животноводстве. В статье 12. «Государственная племенная служба» говорится: «Федеральные органы исполнительной власти и органы исполнительной власти субъектов Российской Федерации, непосредственно осуществляющие управление в области племенного животноводства, образуют единую систему органов исполнительной власти (государственную племенную службу)». Основные направления деятельности государственной племенной службы и ее представителей, и их полномочия оговорены в статьях с 13 по 16, входящих в 3 главу Закона.

Глава 4 регулирует лицензирование деятельности в области племенного животноводства и определяет порядок государственная регистрации племенных животных и племенных стад (статьи 17, 18), а также порядок государственного стимулирования племенного животноводства и проведения научных исследований в области племенного животноводства (статьи 20, 21).

Руководствуясь международными нормами и требованиями по сертификации племенной продукции в Федеральном законе Российской Федерации «О племенном животноводстве», в статью 19 «Сертификация племенной продукции (материала)» включены требования по обязательному проведению иммуногенетической экспертизы происхождения племенных животных четырех видов: крупного рогатого скота, свиней, овец и лошадей.

Статья 19. «Сертификация племенной продукции (материала)

Племенная продукция (материал) подлежит обязательной сертификации на соответствие установленным стандартам, нормам и правилам в области племенного животноводства.

Сертификация племенной продукции (материала) проводится в целях определения и документального подтверждения происхождения, продуктивности племенных животных, отсутствия у них генетических пороков, а также происхождения и качества семени или эмбрионов. Документ о результатах сертификации – сертификат (свидетельство) – является основанием для признания конкретного животного племенным и гарантирует определенный уровень эффективности его использования при соблюдении пользователем племенной продукции (материала) технологии ведения племенного животноводства.

Сертификация племенной продукции (материала) осуществляется соответствующими органами государственной племенной службы при участии контрольно-испытательных станций животноводства, ипподромов, лабораторий селекционного контроля качества молока, шерсти и лабораторий иммуногенетической экспертизы.

Порядок проведения сертификации племенной продукции (материала) устанавливается законодательством Российской Федерации, регулирующим эти вопросы».

В статьях 22, 23 и 24 Закона оговариваются условия использования племенного животного, его семени и эмбрионов в целях воспроизводства. Статья 22. «Условия использования племенного животного в целях воспроизводства породы.

Племенное животное используется в целях воспроизводства породы в случаях, если: племенное животное подвергнуто мечению или обозначено каким-либо иным способом, позволяющим точно идентифицировать это животное; племенное животное зарегистрировано и (или) на него имеется сертификат (свидетельство)».

Статья 23. «Условия использования семени племенных животных в целях их разведения.

Семя племенных животных, произведенное для реализации, используется в целях их разведения в случаях, если: оно получено в организациях по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных; оно получено от племенных животных, зарегистрированных в установленном порядке; оно четко обозначено в целях идентификации; на него имеется сертификат (свидетельство)».

Статья 24. «Условия использования эмбрионов племенных животных в целях разведения племенных животных. Эмбрионы племенных животных в целях разведения племенных животных используются в случаях, если: они получены в организациях по трансплантации эмбрионов; они получены от племенных животных, зарегистрированных в установленном порядке; они четко обозначены в целях их идентификации (в случае нахождения эмбриона в животном оно должно быть подвергнуто мечению); на них имеются сертификаты (свидетельства).

Эмбрионы племенных животных могут быть реализованы или переданы другим лицам исключительно организациями по трансплантации эмбрионов».

Текст этих статей по своей сути также указывает на то, что генетическая сертификация племенного материала является необходимым условием его допуска для воспроизводства животных.

В законе (статьи с 30 по 35) также определены основные категории организаций, занимающихся племенным животноводством. Действующие «Правила определения видов организаций по племенному животноводству» утверждены приказом Минсельхоза России № 402 от 19 октября 2006 г.

Племенной завод – организация по племенному животноводству, располагающая стадом высокопродуктивных племенных животных определенной породы и использующая чистопородное разведение племенных животных (скрещивание племенных животных допускается только по согласованию со специально уполномоченным Правительством Российской Федерации государственным органом по управлению племенным животноводством). Племенной завод производит племенных животных, как правило, для племенных репродукторов.

Племенной репродуктор – организация по племенному животноводству, которая осуществляет разведение племенных животных в целях обеспечения потребностей сельскохозяйственных товаропроизводителей.

Организация по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных содержит племенных животных-производителей, которые используются для получения семени. Указанная организация проводит работы по получению, обработке, контролю качества, хранению и поставке семени для проведения искусственного осеменения сельскохозяйственных животных, регистрируя все технологические процессы.

Организация по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных создается по согласованию со специально уполномоченным Правительством Российской Федерации государственным органом по управлению племенным животноводством.

Организация по трансплантации эмбрионов проводит работы по получению, обработке, контролю качества эмбрионов племенных животных, трансплантации и (или) передаче эмбрионов племенных животных другим сельскохозяйственным товаропроизводителям, регистрируя все технологические процессы.

Организация по трансплантации эмбрионов создается по согласованию со специально уполномоченным Правительством

Российской Федерации государственным органом по управлению племенным животноводством.

Организация по учету, контролю, оценке уровня продуктивности качества продукции, племенной ценности животных (далее – организация по учету и контролю в племенном животноводстве) – вид организации по племенному животноводству, к которой относятся контрольно-испытательные станции животноводства, лаборатории селекционного контроля качества молока, шерсти, лаборатории иммуногенетической или молекулярно-генетической экспертизы, ипподромы, центры информационного обеспечения, осуществляющие учет генотипических и фенотипических признаков племенных животных для использования указанных признаков в селекции животных.

Для регламентации вопросов, связанных с сертификацией племенного материала на первом этапе была разработана Государственная программа «Генетическая экспертиза племенной продукции в Российской Федерации», утвержденная приказом № 291 МСХ России от 19 мая 1998 года. Многие ее положения нашли дальнейшее развитие в приказе МСХ РФ № 402 от 19 октября 2006 г. «Об утверждении Правил определения видов организаций по племенному животноводству».

Приказ 402 предусматривает 100% генетическую паспортизацию племенных производителей, маток ведущей группы и племенного молодняка. Кроме того, приказ детализирует перечень организаций по племенному животноводству и определяет стоящие перед ними задачи по сертификации племенного материала.

Помимо использования официально принятых методов племенного учета, идентификации, контроля продуктивности, определения племенной ценности животных и реализации племенной продукции (материала), а также помимо обеспечения реализации программ по проверке производителей по собственной продуктивности и качеству потомства, по

испытанию различных типов, линий, в задачи племенного завода входит обеспечение проведения генетической экспертизы на достоверность происхождения животных, а также экспертизы по выявлению хромосомных аномалий и сообщение результатов исследований в системы информационного обеспечения по племенному животноводству.

В задачи племенного репродуктора, помимо указанных, выше входит обеспечение проведения генетической экспертизы для подтверждения происхождения животных, и с целью выявления хромосомных аномалий, а также сообщение результатов генетической экспертизы в системы информационного обеспечения по племенному животноводству, участие в федеральных селекционных программах, информационных системах, программах генетического мониторинга и экспертизы племенной продукции.

Генофондное хозяйство – организация по племенному животноводству, осуществляющая разведение и сохранение сельскохозяйственных животных малочисленных, исчезающих видов и пород, несущих определенные признаки и свойства, сформированные в результате длительного эволюционного развития, представляющие собой источник генетического материала для создания (выведения) новых пород и типов сельскохозяйственных животных и поддержания биоразнообразия животного мира. Генофондным хозяйством используется метод чистопородного разведения, скрещивание не допускается. Помимо соблюдения установленного порядка использования племенной продукции (материала) животных в соответствии с нормами и правилами по племенному животноводству и с Законом Российской Федерации «О селекционных достижениях» хозяйства этой категории обеспечивают проведение генетической экспертизы всего взрослого поголовья с целью создания генетического паспорта породы, подтверждения и поддержания ее специфических качеств и свойств;

Организация по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных. В организации по искусственному осеменению содержатся производители различных пород с высоким генетическим потенциалом продуктивности. Используемые производители должны превосходить по племенной ценности поголовье маток в зоне обслуживания и обеспечивать генетический прогресс в разводимых породах, поддерживать их генеалогическую структуру в соответствии с селекционными программами (планами). В этих хозяйствах также необходимо обеспечение проведения генетической экспертизы для подтверждения достоверности происхождения животных и с целью выявления хромосомных аномалий. Результаты генетической экспертизы должны сообщаться в системы информационного обеспечения по племенному животноводству;

Организация по трансплантации эмбрионов сельскохозяйственных животных принимает участие в разработке селекционных программ и в заключении договоров с организациями по племенному животноводству (племенными заводами, племенными репродукторами, генофондными хозяйствами) по использованию высокоценного маточного поголовья (доноров) с целью ускоренного создания высокопродуктивных стад сельскохозяйственных животных, получения заказных производителей, сохранения генофонда редких, исчезающих видов и пород сельскохозяйственных животных.

Организации по учету, контролю, оценке уровня продуктивности, качества продукции, племенной ценности животных – вид организации по племенному животноводству, к которой относятся контрольно-испытательные станции животноводства, лаборатории селекционного контроля качества молока, шерсти, лаборатории иммуногенетической или молекулярно-генетической экспертизы, ипподромы, центры информационного обеспечения, осуществляющие учет генотипических и фенотипических признаков племенных животных для использования

указанных признаков в селекции животных. Организация по учету и контролю в племенном животноводстве должна быть обеспечена штатом специалистов, специальным оборудованием, приборами, нормами и правилами по племенному животноводству и утвержденными и зарегистрированными в установленном порядке методиками испытаний (исследований). На эти организации возлагается проведение генетического контроля достоверности происхождения животных и наличия генетических аномалий.

Региональные информационно-селекционные центры - вид организаций по племенному животноводству, осуществляющих деятельность по научно-методическому, технологическому, сервисному и информационному обеспечению селекционно-племенной работы в животноводстве на территории(-ях) субъекта(-ов) Российской Федерации. РИСЦ в своем составе может иметь лабораторию селекционного контроля количества и качества животноводческой продукции, лабораторию иммуногенетической экспертизы, центр информационного обеспечения и другие подразделения по учету, контролю и оценке уровня продуктивности и качества продукции, племенной ценности животных. В его задачу помимо решения селекционных вопросов входит: проведение генетической экспертизы подтверждения происхождения племенных животных и наличия генетических аномалий; выдача (подтверждение) племенных свидетельств, в том числе импортных на племенных животных, племенную продукцию (материал); участие в селекционных программах, информационных системах, программах генетического мониторинга и экспертизы племенной продукции.

Селекционно-гибридный центр – вид организации по племенному животноводству, располагающей стадом чистопородных высокопродуктивных племенных животных нескольких пород, осуществляющей деятельность по выведению, совершенствованию и

воспроизводству специализированных сочетающихся линий путем замкнутого линейного разведения, а также обеспечивающей генетическую экспертизу племенных животных на наличие генетических аномалий и сообщение результатов экспертизы в системы информационного обеспечения по племенному животноводству;

Селекционный центр (ассоциация) по породе – организация по племенному животноводству, осуществляющая деятельность по научно-методическому, сервисному и информационному обеспечению селекционно-племенной работы с конкретной породой животных на территории Российской Федерации, а также проведение мониторинга селекционно-генетических процессов в породе сельскохозяйственных животных, использование результатов при разработке селекционных программ.

Племенное предприятие (региональное) по хранению и реализации семени животных-производителей – организация по племенному животноводству, не содержащая племенных животных-производителей, но имеющая хранилище – банк семени для долговременного хранения его запасов с целью обеспечения искусственного осеменения маточного поголовья животных в зоне обслуживания. Участвует в селекционных программах, информационных системах по племенному животноводству, программах генетического мониторинга и экспертизы племенной продукции (материала), а также в ведении племенного учета происхождения, продуктивности, воспроизводительной способности, племенной ценности производителей в соответствии с требованиями норм и правил племенного животноводства; обеспечивает проведение генетической экспертизы с целью выявления хромосомных аномалий, сообщение результатов генетической экспертизы в системы информационного обеспечения по племенному животноводству.

Организация по племенной работе, организации по учету, контролю, оценке уровня продуктивности и качества продукции, племенной ценности животных (контрольно-испытательная станция животноводства, ипподром, лаборатория селекционного контроля качества молока, шерсти, лаборатория иммуногенетической экспертизы, центр информационного обеспечения) осуществляют учет генотипических и фенотипических признаков племенных животных для использования указанных признаков в селекции животных.

Задача выявления генов, ответственных за формирование отдельных признаков животных, характеристика мутаций в этих генах, влияющих на выражение признака и изучение распространения таких мутаций у животных разных популяций является актуальной фундаментальной проблемой современной биотехнологии и генетики сельскохозяйственных животных.

ВИЖ Российской академии сельскохозяйственных наук является ведущим научным центром страны в области биотехнологии сельскохозяйственных животных. В Центре биотехнологии и молекулярной диагностики ВИЖ проводятся широкомасштабные исследования по генодиагностике различных видов сельскохозяйственных животных.

Решение поставленных задач осуществляется молекулярно-генетическими методами анализа, включающими в себя разработку и экспериментальную апробацию аналитических моделей анализа генома по комплексу ДНК маркеров на базе методов ПЦР-ПДРФ, аллельспецифической ПЦР, пиросеквенирования и секвенирования.

Вопросы для самопроверки по теме 18.

1. Основные направления сертификации племенных животных.
2. Основные понятия, определяющие суть селекционных достижений..
3. Основные принципы сертификации племенного материала.
4. Объекты, попадающие под определение племенной материал.
5. Категории племенных организаций, участвующих в сертификации племенного материала.
6. Их функции в племенном животноводстве.
7. Категории животных, подлежащих сертификации в качестве племенного материала.
8. Методы сертификации.

Перечень рефератов и/или курсовых работ по темам

1. Вклад А.С. Серебровского теорию маркерной селекции.
2. Селекция по количественным и качественным признакам.
3. Главные гены продуктивности.
4. Использование анонимных маркеров в селекции.
5. Анализ генетической структуры стад по ДНК-маркерам.
6. Цитогенетический контроль в животноводстве.
7. Методы генетической сертификации племенных животных.

Перечень вопросов итоговой аттестации

1. Анализ структуры гена.
2. Молекулярные методы выявления мутаций.
3. Строение хромосомы. Кариотип.
4. Основные типы хромосомных перестроек.
5. Современные методы анализа хромосом.
6. Гибридизация *in situ* в генетических исследованиях.
7. Фенотипическое проявление нарушений хромосомного набора.
8. Этиология хромосомных мутаций.
9. Понятие генетического маркера.
10. Типы маркеров и их характеристика
11. Различия в селекции по ДНК- маркерам и маркерным генам.
12. Преимущества селекции по генетическим маркерам перед традиционной селекцией.
13. Анализ генетического сходства.
14. Генетическая сертификация животных.

Литература

Литература (основная).

1. Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Проблемы биотехнологии и селекции сельскохозяйственных животных// Дубровицы, ВИЖ, 2006, - 316 с.
2. Брем Г., Кройслих Х., Штранцингер Г. Экспериментальная генетика в животноводстве: основы методов в биотехнологии// М.: Россельхозакадемия, 1996, – 326 с.
3. Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А., Каплинская Л.И., Брем Г., Мюллер М. Методические рекомендации по молекулярно-генетическому анализу овец с использованием микросателлитных маркеров / Е.А. Гладырь [и др.] М.; РАСХН; 2004, – 31 с.

Литература (дополнительная):

1. Моисейкина Л.Г.; Кленовицкий П.М. Генетические основы современной селекции. Методическое пособие // Элиста; 2001,-80 с.
2. Кленовицкий П.М., Никишов А.А.; Иолчиев Б.С.; Багиров В.А.; Марзанов Н.С. Введение в прикладную цитогенетику одомашненных животных. / П.М. Кленовицкий [и др.] Дубровицы. 2003.-56 с.
3. Кленовицкий П.М. Марзанов Н.С.; Багиров В.А.; Насибов М.Г. Генетика и биотехнология в селекции животных / П.М. Кленовицкий [и др.] М.; [б.и.]; ФГУП "ЭКСПЛОР", 2004, - 285 с.
- 4.

Интернет-ресурсы.

5. Российская федерация. федеральный закон о племенном животноводстве (Принят Государственной Думой 12 июля 1995 года) / <http://www.informika.ru/text/goscom/normdoc/r01/01271.html>
6. Сертификат на продукцию генной инженерии / http://cmmp.ru/page.aspx?id_page=861

7. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Молекулярно-генетические аспекты в создании и использовании трансгенных сельскохозяйственных животных / http://www.rfbr.ru/default.asp?doc_id=5805
8. European communities (certification of animals and animal products) regulations, 1999 / <http://faolex.fao.org/docs/texts/ire54449.doc>
9. Animal Export Certification Application forms, Information and Notes for Guidance to facilitate the export of animals / <http://www.dardni.gov.uk/index/animal-health/animal-export-certification.htm>

Словарь (глоссарий) основных терминов и понятий

Термин, сокращение, определение или понятие	Подробное определение
ANPEP	Ген аминопептидазы
BLAD	Дефицит лейкоцитарной адгезии крупного рогатого скота. Врожденный иммунодефицит крупного рогатого скота. Наследственное заболевание рецессивной природы.
BMP15	Ген костного морфогенетического белка 15
BMPR-IB	Ген рецептора морфогенетического костного белка
BSE	Бычья губкоподобная энцефалопатия – инфекционное заболевание прионной природы у крупного рогатого скота, поражающее головной мозг. Летально.
CHS	Синдром Чидайк-Хигаши, наследственный иммунодефицит у человека и животных. Наследственное заболевание рецессивной природы.
CVM	Комплексный порок позвоночника, наследственное заболевание крупного рогатого скота рецессивной природы.
DGAT	Ген диацилглицерол О-ацил-трансферазы
ESR	Ген эстрогенового рецептора
FSGB	Ген β - субъединицы фолликулостимули-

	рующего гормона
FSHR	Ген рецептора фолликулостимулирующего гормона
GDF8	Ген миостатина
GH	Ген гормона роста
GNRHR	Ген рецептора гонадотропин-релизинг гормона
IGF-1	Ген инсулиноподобного фактора роста 1
IGF-2	Ген инсулиноподобного фактора роста 2
LH-CGR	Ген рецептора лютеинизирующего гормона / хориогонадотропина
MC4R	Ген меланокортин-рецептора 4
NCOA1	Ген коактиватора 1 ядерных рецепторов
OPN	Ген остеопоэтина
PRLR	Ген рецептора пролактина
QTL	Quantitative Trait Loci's - гены (локусы) количественных признаков. Термин QTL используется, обычно, когда речь идет о группе сцепленных полигенов (или главном гене с неизвестной функцией) влияющих на определенный количественный признак, но может быть использован и для обозначения гена или генов с известной функцией, влияющих на продуктивность.
RARG	Ген рецептора ретиноловой кислоты $\gamma 2$
RBP4	Ген ретинол связывающего белка 4
RYR1	Ген мышечного рианодинового рецептора
SCID	Комплексный сыворотосный иммунодефицит.

	Наследственное заболевание лошадей.
TG5	Ген тиреоглобулина
TSE	Трансмиссионные губкоподобные энцефалопатии – общее название группы инфекционных заболеваний животных и человека, связанных с поражением головного мозга. Ткань головного мозга на заключительных этапах болезни приобретает пористую (губкообразную) консистенцию. Исход летальный.
Аллель	Форма состояния одного и того же гена.
Анеуплоидия	Отклонение от диплоидного числа, связанное с уменьшением или увеличением числа гомологов в одной или нескольких парах хромосом.
Ген	Основной элемент наследственности, представляющий собой фрагмент нуклеиновой кислоты, несущий информацию о последовательности полипептидной или нуклеотидной цепи.
Геном	Гаплоидный набор хромосом, содержащих полный одинарный набор генов.
Генотип	Совокупность всех генов организма.
Диацилглицерол О-ацил-трансфераза	Фермент, катализирующий последний этап синтеза триглицеридов.
Диплоидное число	Число хромосом в соматических клетках, обозначается символом – 2n.
ДНК-маркер	Полиморфные участки ДНК с неизвестной

функцией, сцепленные с QTL.

Индексная селекция	Оценка и отбор животных по комплексу признаков, определенным образом объединенных в селекционный индекс.
Калпастатин	Ингибитор активности калпаина, участвует в процессе протеолиза при созревании мяса.
Кариотип	Совокупность хромосом, присущую для организмов определенного вида принято обозначать термином кариотип. При этом подразумевается использование этого термина в широком смысле. В узком смысле кариотип – это систематизированное по определенным правилам с учетом морфологии и размера изображение хромосом.
Конверсия	Преобразование, процесс изменения третичной структуры белка с участием белковой матрицы. Классическим примером является изменение нормальной третичной структуры приона (альфа-спирали) в патогенную бета-спираль с участием в качестве матрицы инфекционного приона.
Локус	Участок хромосомы, в котором локализован ген или анонимная нуклеотидная последовательность.
Маркер	Наследственный признак, имеющий ряд аллельных вариантов, выявляемых по его фенотипическому проявлению или

	молекулярно-генетическими методами, сцепленный с QTL или непосредственно влияющий на продуктивность.
Миостатин	Ингибитор мышечного роста
Мозаицизм	Присутствие в одном организме вследствие неправильного расхождения в процессе деления генетического материала, клеток разного генотипа, например с разным числом хромосом.
Наследуемость	Доля генотипической изменчивости в общей изменчивости организмов.
Плечи	Участки хромосомы, разделенные первичной перетяжкой, в которой локализована центромера. Короткое плечо обозначают символом - p, длинное - q.
Прион	Белок, в норме принимающий участие в функционировании синапсов нервных волокон.
Реверсивная генетика	Метод генетического поиска маркеров, базирующийся на принципе «от гена к признаку» .
Реципрокная транслокация	Взаимный обмен фрагментами между хромосомами. Для его реализации необходимо два разрыва и два соединения участков хромосом.
Робертсоновская транслокация	Хромосомная аномалия, когда две акроцентрические хромосомы сливаются

(центрическое слияние)	короткими плечами. В результате чего возникает новая метацентрическая или субметацентрическая хромосома, а диплоидное число хромосом уменьшается на единицу. Но в отличие от анеуплоидии и ряда вариантов тандемных транслокаций число плеч в этом случае остается постоянным
Секвенирование	Определение нуклеотидной последовательности ДНК какого-либо гена.
Селекционный индекс	Показатель, включающий в себя оценку по нескольким продуктивным показателям. Представляет из себя своеобразное уравнение регрессии.
Сигналь (устаревшее)	Ген, имеющий ряд аллельных вариантов, выявляемых по его фенотипическому проявлению, сцепленный генами, влияющими на количественный признак.
Система групп крови	Совокупность антигенов, контролируемых одним локусом.
Тандемная транслокация	Хромосомные перестройки, обусловленные слиянием хромосом конец в конец. Существует три варианта тандемных транслокаций: центромерно-центромерный (частный случай – робертсоновские транслокации), центромерно-теломерный и теломерно-теломерный. Тандемные транслокации последних двух типов сопровождаются изменением основного числа.

Теломера	Специализированный концевой участок плеча хромосомы.
Тиреоглобулин	Гликопротеин и предшественник тиреоидных гормонов трийодотиронина и тетраiodотиронина, которые участвуют в образовании жировых клеток и формировании мраморности.
Фенотип	
Химеризм	Присутствие в одном организме вследствие механического объединения клеток разного генотипа, например с мужским и женским набором хромосом.
Хроматида	Функционирующая в митозе хромосомная структура, одна из двух продольных половинок хромосомы.
Хромосомы	Специализированные структуры клеточного ядра, обеспечивающие хранение, передачу, перегруппировку наследственного материала и реализацию генетической программы.
Центромера (кинетохор)	Специализированная структура хромосомы, обеспечивающая расхождение хроматид в процессе клеточного деления.

ОПИСАНИЕ КУРСА И ПРОГРАММА

Общее описание курса.

Цели и задачи курса:

Основной целью курса является – обучение специалистов-технологов по производству и переработке продукции животноводства и ветеринарных врачей знанию современных методов генетического контроля селекционного процесса, сертификации племенного материала и принципов генетического мониторинга в животноводстве. Материалы курса могут использоваться в программах повышения квалификации преподавательского состава аграрного и ветеринарного профилей.

Основные задачи курса:

- дать представление о молекулярной биологии и генетике высших животных;
- дать представление о теоретических основах генетической сертификации племенных животных;
- обучить особенностям применения генетических методов в современной селекции животных;
- сформировать умения и навыки в области применения результатов молекулярно-генетического, иммуногенетического и цитогенетического анализа, при решении прикладных задач животноводства и ветеринарии;
- сформировать навыки и умения самостоятельной работы по контролю селекционного процесса на основе анализа генетической структуры стад и пород.
- ознакомить слушателей с современным состоянием и перспективами применения современных методов

генетического контроля селекционного процесса и сертификации племенного материала в животноводстве.

Курс включает как теоретическую часть, так и практические занятия, позволяющие слушателям не только ознакомиться с генетическими методами контроля селекционных процессов и сертификации племенных животных, но и приобрести навык самостоятельного анализа результатов генотипирования животных.

Целевая аудитория:

Проблема продовольственной безопасности страны может быть решена только подготовкой специалистов, владеющих современными методами контроля селекционных процессов и сертификации племенных животных.

Предлагаемый учебный курс предназначен как основной образовательный проект для магистратуры по направлению «Зоотехния», специальности «Технология производства и переработки продуктов животноводства», и как основной курс или курс по выбору для специальности «Ветеринария».

Основное содержание курса.

- В соответствии с предлагаемой целью предусмотрено изучение следующих вопросов:
 - История становления современной селекции.
 - Использование современных генетических методов для контроля селекционного и сертификации племенного материала.
 - Основы молекулярной генетики и молекулярной биологии животных. Особенности организации генома высших животных, строение хромосом, генные карты.

- Природа генетического полиморфизма. Типы генетические маркеров. Механизмы лежащие в основе их использования для контроля селекционного процесса и сертификации племенного материала.
- Методы выявления генетического полиморфизма на основе ДНК-технологий. Иммуногенетические и цитогенетические методы.
- Примеры использования генетических маркеров по видам сельскохозяйственных животных.
- Применение методов ДНК технологии в ветеринарии.
- Документы, регламентирующие сертификацию племенного материала и осуществление генетического контроля селекционного процесса в Российской Федерации.

Требования к уровню усвоению содержания курса (знания, умения, навыки).

После изучения данного курса, слушатель должен:

➤ знать:

- основы молекулярной биологии и генетики высших животных;
- типы генетических маркеров и механизмы их возникновения;
- теоретические предпосылки использования для контроля селекционного процесса и сертификации племенного материала;
- современное состояние вопроса и примеры использования генетических маркеров по видам сельскохозяйственных животных;

- основные направления использования ДНК-технологий в ветеринарии
- категории хозяйств виды и контингент животных подлежащих генетической сертификации.
- нормативные акты РФ, регламентирующие сертификацию племенного материала и осуществление генетического контроля селекционного процесса.

➤ уметь:

- владеть основами молекулярно-генетического, иммуногенетического и цитогенетического анализа ;
- сертифицировать племенное животное по генетическим маркерам.
- анализировать достоверность происхождения животных;
- анализировать наследование генетических маркеров;
- анализировать генетическую структуру стад или пород и использовать ее для контроля селекционного процесса;
- владеть кластерным анализом
- иметь представление: о состоянии и основных направлениях работ по генетическому контролю селекционного процесса и сертификации племенного материала и перспективах их развития в мире.

Инновационность курса

Создание курса вызвано потребностью сельскохозяйственных предприятий в специалистах, владеющих современными методами генетического контроля селекционного процесса и сертификации племенного материала в животноводстве.

Существенный прогресс в селекции сельскохозяйственных животных в настоящее время невозможен без использования в практике

современных приемов оценки отбора животных и контроля селекционного процесса, основанных на использовании молекулярно-генетических, иммуногенетических и цитогенетических методов. Эффективная реализация наследственных задатков племенных животных в условиях интенсификации животноводства невозможна без генетической сертификации племенного материала.

При создании курса используются новейшие научные достижения в области современной генетики и молекулярной биологии животных, а также последние достижения в области применения методов генетического контроля селекционного процесса и сертификации племенного материала в России и за рубежом. В рамках курса большое внимание уделено современным методам анализа генетической структуры стад и пород для контроля селекционного процесса.

В рамках курса будут рассмотрены вопросы использования белкового и ДНК-полиморфизма для сертификации племенного материала. Описывается методика поиска и выявления новых, перспективных генетических маркеров.

В данном курсе предусмотрено использование новых учебно-методических материалов с применением информационно-коммуникационных технологий (ИКТ).

Структура курса

Темы лекций.

Блок 1 « « 2 кредита

Тема 1. Современная селекция животных – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 2. Современные представления о гене – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 3. Генетические маркеры – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 4. Типы генетических маркеров – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 5. Классические маркеры I типа – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 6. Основы ДНК - диагностики генных мутаций – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 7. Полиморфизм молочных белков – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 8. Гены, влияющие на репродуктивную функцию у животных – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 9. Генетические маркеры, связанные с ростом и качеством мяса – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 10. Применение ДНК - диагностики для выявления летальных рецессивных мутации – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 11. Прионные болезни – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 12. Применение генетических маркеров I и II типа в филогенетических исследованиях – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 13. Генетический контроль в селекции на основе маркеров I и II типа – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 14. Методы ДНК - диагностики в ветеринарии – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 15. Основы цитогенетики животных – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 16. Цитогенетика в селекции животных – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Тема 17. Анализ генетической структуры хромосом. Генные карты животных. Гибридизация *in situ*. Хромосомный пайнтинг – 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Блок 2 « « 1 кредит

Тема 18. Нормативные акты, регламентирующие сертификацию племенного материала в РФ. - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

Темы семинарских занятий:

1. Современные направления селекции животных - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

2. Сцепление генов, аллелосила и аллелобаланс маркера - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

3. Сравнительная характеристика маркеров разного типа - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

4. Качественные признаки и их использование в селекции - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

5. Анализ наследования окрасов у домашних животных - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

6. Методы выделения и анализа ДНК - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

7. Анализ породных различий по аллелям «главных генов продуктивности» - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

8. Анализ распространения BLAD и CVM синдромов в стадах крупного рогатого скота - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

9. Генетическая структура популяций. Генетические расстояния и кластерный анализ - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.

10. Анализ сателлитной ДНК. Аллелизм сателлитов - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.
11. Роль иммуногенетических исследований в животноводстве - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.
12. Использование ДНК-маркеров в селекционно-генетических исследованиях - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.
13. Место цитогенетики в селекционно-генетической работе - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.
14. Методы цитогенетического анализа - 2 часа аудиторных / 1 час самостоятельных занятий.
15. Генетическая сертификация племенного материала - 4 часа аудиторных / 2 час самостоятельных занятий.
16. Итоговый и рубежный контроль знаний – 4 часа аудиторных .

Вопросы к контрольным работам:

1. Анализ структуры гена.
2. Молекулярные методы выявления мутаций.
3. Строение хромосомы. Кариотип.
4. Основные типы хромосомных перестроек.
5. Современные методы анализа хромосом.
6. Гибридизация *in situ* в генетических исследованиях.
7. Фенотипическое проявление нарушений хромосомного набора.
8. Этиология хромосомных мутаций.
9. Понятие генетического маркера.
10. Типы маркеров и их характеристика
11. Различия в селекции по ДНК- маркерам и маркерным генам.
12. Преимущества селекции по генетическим маркерам перед традиционной селекцией.

13. Анализ генетического сходства.
14. Генетическая сертификация животных.

Примерная тематика курсовых работ:

1. Вклад А.С. Серебровского в теорию маркерной селекции.
2. Селекция по количественным признакам.
3. Селекция по качественным признакам.
4. Главные гены продуктивности.
5. Использование анонимных маркеров в селекции.
6. Анализ генетической структуры стад по ДНК-маркерам.
7. Цитогенетический контроль в животноводстве.
8. Методы генетической сертификации племенных животных.

Организационно-методическое построение учебного процесса.

В данном курсе используются следующие виды и формы организации учебной деятельности: лекции, самостоятельная работа с литературой, в том числе с ресурсами Интернета, подготовка курсовых проектов; семинарские занятия, итоговые занятия и аттестация в форме защиты курсовых проектов (работ). Лекции и семинарские занятия проходят с использованием мультимедийной техники.

Самостоятельная работа слушателя предполагает, прежде всего, внимательное изучение дополнительного теоретического материала и образовательных Интернет-ресурсов к каждой теме.

Итоговые занятия. Курс завершается защитой курсового проекта (работы).

- ☞ Основные (базовые) термины и понятия.
- ☞ Контрольные вопросы для повторения и самопроверки.
- ☞ Тесты к темам (для текущего самоконтроля).

Аттестационные требования

Курс завершается защитой курсового проекта (работы).

Слушатель считается успешно закончившим обучение в случае, если он публично защитит курсовой проект (работу).

Проводится три внутрисеместровых тестирования на основе пройденного материала с использованием РС.

Слушатель, успешно окончивший курс, получает удостоверение государственного образца о краткосрочном повышении квалификации.

Общие правила выполнения курсовых проектов (работ)

В соответствии с программой и учебно-тематическим планом курса каждый слушатель самостоятельно выполняет творческое задание - пишет курсовой проект (работу) по проблематике курса.

Курсовой проект (работа) и его защита - итоговая форма аттестации слушателя, форма понимания и подтверждения степени усвоения материала слушателем. Выполняя курсовой проект, слушатель приобретает навыки самостоятельной научной работы, знакомится с современными методами ведения исследовательской деятельности, учится работать с литературой и нормативными актами, развивает творческое мышление и умение аргументировано отстаивать свою точку зрения.

Одним из главных итогов работы слушателя является усвоение и закрепление полученных знаний и, в частности, изложение нового видения на выбранную проблематику исследования. Темы курсовых проектов предлагаются преподавателем, однако слушатели могут предложить свою тему для курсового проекта, интересную и актуальную для них в плане их места работы и профессиональной деятельности.

После утверждения темы слушатель составляет и согласовывает с научным руководителем график работы над курсовым проектом (работой). Обычно, в нем предусматривают следующие стадии:

- 1) определение круга источников,
- 2) составление подробного плана курсового проекта,
- 3) сбор и изучение материала,
- 4) написание отдельных параграфов, введения и заключения,
- 5) оформление работы и представление его научному руководителю,
- 6) публичная защита и выставление оценки по курсовому проекту научным руководителем.

Курсовой проект (работа) оформляется в соответствии с методическими требованиями и рекомендациями по их оформлению.

Условия и критерии выставления оценок.

От слушателей требуется посещение лекций и семинарских занятий, обязательное участие в аттестационных испытаниях. Особо ценится активная работа на семинаре, а также качество контрольных работ и экзаменационных эссе.

Для успешной работы в семинаре студент должен прочесть указанную преподавателем накануне литературу и активно участвовать в дискуссии, уметь изложить основные идеи прочитанных источников и дать им аргументированную оценку. Именно устные выступления студентов на семинаре являются главным критерием высокой экзаменационной оценки.

Балльная структура оценки.

Посещение занятий – до 10 баллов;

Активная работа на семинаре (научные сообщения, самостоятельное изучение и освещение дополнительных вопросов курса) – до 10 баллов;

Рубежный контроль – три контрольные работы в семестр по 20 баллов каждая.

Защита итогового курсового проекта (работы) – до 20 баллов;

Всего – 100 баллов.

Шкала оценок:

A (5+) – 95 – 100 баллов;

B (5) - 90 – 94;

C (4) – 76 – 89;

D (3+) – 60 – 75;

E (3) – 56 – 59;

FX (2+) – 33 – 55;

F (2) – менее 33.

Показатель		Неудовлетворительно		Удовлетворительно		Хорошо	Отлично	
кредит	Сумма	F	FX	E	D	C	B	A
	баллов	2	2+	3	3+	4	5	5+
4	100	менее 33	33-55	56-59	60-75	76-89	90-94	95-100

Пояснение оценок:

A – выдающийся ответ

B – очень хороший ответ

C – хороший ответ

D – достаточно удовлетворительный ответ

E – отвечает минимальным требованиям удовлетворительного ответа

FX – означает, что студент может добрать баллы только до минимального удовлетворительного ответа

F – неудовлетворительный ответ (либо повтор курса в установленном порядке, либо основание для отчисления).

Академическая этика.

Все имеющиеся в творческой работе (курсовом проекте) сноски тщательно выверяются и снабжаются «адресами». Не допустимо включать в свою работу выдержки из работ других авторов без указания на это, пересказывать чужую работу близко к тексту без отсылки к ней,

использовать чужие идеи без указания первоисточников. Это касается и источников, найденных в Интернете. Необходимо указывать полный адрес сайта. Все случаи плагиата должны быть исключены. В конце работы дается исчерпывающий список всех использованных источников.

Аннотированная программа курса:

Блок « 3 кредита

Тема 1. Современная селекция животных. Роль генетики в селекции. Реверсивная генетика. Традиционная и маркерная селекция. Преимущества селекции по маркерам.

Тема 2. Современные представления о гене. Эволюция представлений о гене. Генетический полиморфизм. Строение и функционирование гена у прокариот.

Тема 3. Генетические маркеры. История вопроса. Понятие о маркере. Хромосомная теория и метод сигналей А.С.Серебровского. Главные гены. Понятие о генах-кандидатах.

Тема 4. Типы генетических маркеров. Кодированная и анонимная ДНК. Мутации и генетический полиморфизм. Маркеры I и II типа, хромосомные маркеры. Митохондриальные гены.

Тема 5. Классические маркеры I типа. Качественные и количественные признаки. Классические представления о генетике масти. Генетика окрасов домашних животных. Мутации окраса и ДНК-полиморфизм. Основы иммуногенетики животных.

Тема 6. Основы ДНК - диагностики генных мутаций. Анализ нуклеотидной последовательности генов. Мутации и изменение сайтов рестрикции. Анализ длин рестриктных фрагментов.

Тема 7. Полиморфизм молочных белков. Методы выявления полиморфных вариантов: гель-электрофорез, ПЦР-ПДРФ. Полиморфизм

казеинов. Полиморфизм лактоглобулинов. Полиморфизм молочных белков, качество молока и молочная продуктивность.

Тема 8. Гены, влияющие на репродуктивную функцию у животных.

Классификация генов. Полиморфизм генов эстрогенового и пролактинового рецепторов у свиней. VMРR-1R и VMР15 - главные гены плодовитости у овец. Использование полиморфных вариантов главных генов плодовитости в селекции.

Тема 9. Генетические маркеры, связанные с ростом и качеством мяса.

Маркеры роста и качества мяса у крупного рогатого скота, свиней и овец.

Тема 10. Применение ДНК - диагностики для выявления летальных

рецессивных мутации. Врожденный иммунодефицит крупного рогатого скота (BLAD – синдром). Комплексный порок позвоночника (СVM).

Тема 11. Прионные болезни. Классификация, этиология, распространение

и механизм развития прионных болезней. Генетический полиморфизм прионового гена. Видовые и породные различия. Анализ генетической устойчивости на примере скрепи.

Тема 12. Применение генетических маркеров I и II типа в

филогенетических исследованиях. Анализ генетической близости видов.

Анализ дивергенции пород. Генетические расстояния. Кластерный анализ.

Тема 13. Генетический контроль в селекции на основе маркеров I и II

типа. Генетическая сертификация племенных животных: оценка

достоверности происхождения; генотипирование по QTL, главным генам и

на носительство рецессивных мутаций. Анализ генетической структуры

стад и контроль селекционного процесса.

Тема14. Методы ДНК - диагностики в ветеринарии. Вирусные и

бактериальные инфекции, зоонозы.

Тема 15. Основы цитогенетики животных. Видовые различия

хромосомных наборов. Типы хромосомных перестроек. Кариотипическая

эволюция.

Тема 16. Цитогенетика в селекции животных. Полиморфизм хромосом. Хромосомные болезни животных. Цитогенетический контроль в животноводстве. Цитогенетические характеристики, используемые для сертификации производителей.

Тема 17. Анализ генетической структуры хромосом. Генные карты животных. Гибридизация *in situ*. Хромосомный пайнтинг.

Блок « « 1 кредит

Тема 18. Нормативные акты, регламентирующие сертификацию племенного материала в РФ. Федеральный закон «О селекционных достижениях». Федеральный закон «О племенном животноводстве». Государственная программа «Генетическая экспертиза племенной продукции (материала) в Российской Федерации».

Темы семинарских занятий:

1. Современные направления селекции животных.
2. Сцепление генов, аллелосила и аллелобаланс маркера.
3. Сравнительная характеристика маркеров разного типа.
4. Качественные признаки и их использование в селекции.
5. Анализ наследования окрасов у домашних животных
6. Методы выделения и анализа ДНК.
7. Анализ породных различий по аллелям «главных генов продуктивности».
8. Анализ распространения BLAD и CVM синдромов в стадах крупного рогатого скота.
9. Генетическая структура популяций. Генетические расстояния и кластерный анализ.
10. Анализ сателлитной ДНК. Аллелизм сателлитов.
11. Роль иммуногенетических исследований в животноводстве.

12. Использование ДНК-маркеров в селекционно-генетических исследованиях.
13. Место цитогенетики в селекционно-генетической работе.
14. Методы цитогенетического анализа.
15. Генетическая сертификация племенного материала.

Литература (основная).

1. Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Проблемы биотехнологии и селекции сельскохозяйственных животных// Дубровицы, ВИЖ, 2006, - 316 с.
2. Брем Г., Кройслих Х., Штранцингер Г. Экспериментальная генетика в животноводстве: основы методов в биотехнологии// М.: Россельхозакадемия, 1996, – 326 с.
3. Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А., Каплинская Л.И., Брем Г., Мюллер М. Методические рекомендации по молекулярно-генетическому анализу овец с использованием микросателлитных маркеров / Е.А. Гладырь [и др.] М.; РАСХН; 2004, – 31 с.

Литература (дополнительная):

1. Моисейкина Л.Г.; Кленовицкий П.М. Генетические основы современной селекции. Методическое пособие // Элиста; 2001,-80 с.
2. Кленовицкий П.М., Никишов А.А.; Иолчиев Б.С.; Багиров В.А.; Марзанов Н.С. Введение в прикладную цитогенетику одомашненных животных. / П.М. Кленовицкий [и др.] Дубровицы. 2003.-56 с.
3. Кленовицкий П.М. Марзанов Н.С.; Багиров В.А.; Насибов М.Г. Генетика и биотехнология в селекции животных / П.М. Кленовицкий [и др.] М.; [б.и.]; ФГУП "ЭКСПЛОР", 2004, - 285 с.

Интернет-ресурсы.

1. Российская федерация. федеральный закон о племенном животноводстве (Принят Государственной Думой 12 июля 1995 года) / <http://www.informika.ru/text/goscom/normdoc/r01/01271.html>
2. Сертификат на продукцию генной инженерии / http://cmmp.ru/page.aspx?id_page=861
3. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Молекулярно-генетические аспекты в создании и использовании трансгенных сельскохозяйственных животных / http://www.rfbr.ru/default.asp?doc_id=5805
4. European communities (certification of animals and animal products) regulations, 1999 / <http://faolex.fao.org/docs/texts/ire54449.doc>
5. Animal Export Certification Application forms, Information and Notes for Guidance to facilitate the export of animals / <http://www.dardni.gov.uk/index/animal-health/animal-export-certification.htm>
- 6.

**Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ»**

УЧЕБНО-ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН

**Современные методы генетического контроля селекционных
процессов и сертификации племенного материала в животноводстве**

(наименование программы)

Цель _____ основной курс

Категория слушателей магистры

Срок обучения 108 часов

Режим занятий 36 ч. – лекции; 38 ч. – практические занятия; 34 ч. –
самостоятельная работа

№ п/п	Наименование дисциплин и разделов	Всего часов	В том числе			Форма контроля
			Лекци и	Практич. занятия, включая рубежный контроль и защиту курсовых проектов	Самост. занятия	
1	2	3	4	5	6	7
	Современные методы генетического контроля селекционных процессов и сертификации племенного материала в животноводстве	108	36	38	34	1 курсовой проект
1	Современная селекция животных	4	2	2	2	

	Роль генетики в селекции. Реверсивная генетика. Традиционная и маркерная селекция. Преимущества селекции по маркерам..					
2	Современные представления о гене	4	2	2	2	
	Эволюция представлений о гене. Генетический полиморфизм. Строение и функционирование гена у прокариот.					
3	Генетические маркеры.	4	2	2	2	
	История вопроса. Понятие о маркере. Хромосомная теория и метод сигналей А.С.Серебровского. Главные гены. Понятие о генах-кандидатах.					
4	Типы генетических маркеров	4	2	2	2	
	Кодирующая и анонимная ДНК. Мутации и генетический полиморфизм. Маркеры I и II типа, хромосомные маркеры. Митохондриальные гены.					
5	Классические маркеры I типа	4	2	2	2	
	Качественные и количественные признаки. Классические представления о генетике масти. Генетика окрасов домашних животных. Мутации окраса и ДНК-полиморфизм. Основы иммуногенетики животных.					

6	Основы ДНК - диагностики генных мутаций	4	2	2	2	
	Анализ нуклеотидной последовательности генов. Мутации и изменение сайтов рестрикции. Анализ длин рестриктных фрагментов..					
7	Полиморфизм молочных белков.	4	2	2	2	
	Методы выявления полиморфных вариантов: гель-электрофорез, ПЦР-ПДФ. Полиморфизм казеинов. Полиморфизм лактоглобулинов. Полиморфизм молочных белков, качество молока и молочная продуктивность.					
8	Гены, влияющие на репродуктивную функцию у животных	4	2	2	2	
	Классификация генов. Полиморфизм генов эстрогенового и пролактинового рецепторов у свиней. VMРR-1R и VMР15 - главные гены плодовитости у овец. Использование полиморфных вариантов главных генов плодовитости в селекции					
9.	Генетические маркеры, связанные с ростом и качеством мяса	4	2	2	2	

	Маркеры роста и качества мяса у крупного рогатого скота, свиней и овец					
10.	Применение ДНК - диагностики для выявления летальных рецессивных мутации	4	2	2	2	
	Врожденный иммунодефицит крупного рогатого скота (BLAD – синдром). Комплексный порок позвоночника (CVM)					
11.	Прионные болезни	4	2	2	2	
	Классификация, этиология, распространение и механизм развития прионных болезней. Генетический полиморфизм прионового гена. Видовые и породные различия. Анализ генетической устойчивости на примере скрепи					
12.	Применение генетических маркеров I и II типа в филогенетических исследованиях	4	2	2	2	
	Анализ генетической близости видов. Анализ дивергенции пород. Генетические расстояния. Кластерный анализ					
13.	Генетический контроль в селекции на основе маркеров I и II типа.	4	2	2	2	

	Генетическая сертификация племенных животных: оценка достоверности происхождения; генотипирование по QTL, главным генам и на носительство рецессивных мутаций. Анализ генетической структуры стад и контроль селекционного процесса.					
14.	Методы ДНК - диагностики в ветеринарии	4	2	2	2	
	Вирусные и бактериальные инфекции, зоонозы.					
15.	Основы цитогенетики животных	4	2	2	2	
	Видовые различия хромосомных наборов. Типы хромосомных перестроек. Кариотипическая эволюция.					
16.	Цитогенетика в селекции животных	4	2	2	2	
	Полиморфизм хромосом. Хромосомные болезни животных. Цитогенетический контроль в животноводстве. Цитогенетические характеристики, используемые для сертификации производителей.					
17.	Анализ генетической структуры хромосом	4	2	2	2	

	Генные карты животных. Гибридизация in situ. Хромосомный пайнтинг			Ч		
18.	Нормативные акты, регламентирующие сертификацию племенного материала в РФ	2	2	2	2	
	Федеральный закон «О селекционных достижениях». Федеральный закон «О племенном животноводстве». Государственная программа «Генетическая экспертиза племенной продукции (материала) в Российской Федерации»					
19	Итоговый и рубежный контроль	4		4		Контроль ое гестирован е и защита курсового проекта (работы)