

## Інструкція

### з проведення тестування племінних тварин за ДНК-маркерами

#### 1. Загальні положення

1.1. Ця Інструкція, розроблена на виконання Закону України "Про племінну справу у тваринництві" ( 3691-12 ), визначає порядок проведення тестування за ДНК-маркерами у тваринництві, яке є невід'ємною частиною генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин.

1.2. Тестування за ДНК-маркерами - визначення генотипу тварини за окремими генами або локусами геному на основі аналізу ДНК.

Аналіз ДНК - визначення алельного стану локусу. Генотипи можуть визначатися за окремими генами, важливими в біологічному та господарському відношенні, за високополіморфними локусами ДНК та за будь-якими іншими локусами геному сільськогосподарських тварин.

1.3. Мета тестування - виявлення тварин із спадковими вадами розвитку та особливостями генотипу за окремими локусами.

1.4. Тестування за ДНК-маркерами проводять один раз за життя тварини.

1.5. Організацію та проведення відбору зразків біоматеріалу для тестування за ДНК-маркерами здійснюють ветеринарні спеціалісти господарств/власників тварин.

1.6. Тестування за ДНК-маркерами здійснюють на підприємствах (лабораторіях) генетичного контролю атестовані фахівці із спеціальною освітою, які пройшли спеціальну підготовку щодо проведення ДНК-тестування.

#### 2. Визначення термінів

У цій Інструкції наведені нижче терміни вживаються в такому значенні:

алель - одна з альтернативних структурних форм стану гена;  
біоптат - частка тканини (органа), отримана прижиттєво для дослідження;

генотип - сукупність генів організму;

ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота, речовина спадковості, молекула, яка кодує генетичну інформацію і здатна до самовідновлення;

ДНК-ампліфікація - множинне копіювання певної ділянки ДНК за допомогою ПЛР;

електрофореграма - результат розділення біополімерів в електричному полі;

електрофорез - фізичний метод розділення біополімерів в електричному полі;

ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція;

праймер - коротка послідовність нуклеотидів, яка

використовується в ПЛР;

рестрикт - фрагмент ДНК, отриманий у результаті обробки ДНК рестриктазою;

рестриктаза - бактеріальний фермент, що розщеплює молекулу ДНК у специфічних ділянках (сайтах пізнавання);

скринінг - метод або комплекс методів, що дає змогу ідентифікувати окремий об'єкт шляхом перегляду великої кількості об'єктів;

супернатант - надосадова рідина;

BLAD - (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency) синдром дефіциту адгезійності лейкоцитів великої рогатої худоби;

RYR - (ryanodine receptor gene, р'анодин-рецепторний ген). Виконує головну роль у контролі стресчутливості свиней.

### 3. Організація ДНК-тестування

3.1. Як біопробу для тестування за ДНК-маркерами використовують будь-який біологічний матеріал тварини: кров, сперму, біоптат тощо.

#### 3.1.1. Відбір крові

Проводять в антикоагулянт або на марлевий тампон. За умови використання марлевого тампона його просякують відібраною кров'ю та висушують на повітрі. Для ДНК-аналізу достатньо 0,5 мл рідкої крові або кров'яної плями на марлевому тампоні розміром 5x5 мм.

Умови зберігання крові:

рідкої - 5-7 діб при температурі 4 град.С або декілька місяців при температурі -20 град.С;

висушеної - у герметично закритому сухому пакеті до 5 років за кімнатної температури або в холодильнику при температурі 4 град.С. Висушену кров можна пересилати поштою до підприємства (лабораторії) генетичного контролю.

#### 3.1.2. Відбір та зберігання сперми

Відбирають 0,5-2 мл нативної сперми. Сперму для виділення ДНК зберігають за умов, аналогічних для зберігання рідкої крові.

#### 3.1.3. Відбір біоптатів

Біоптати можуть мати різне походження. Для ДНК-аналізу можна використовувати вищипи з вуха, які залишаються при міченні тварин. Термін зберігання шматочків розміром від 5x5 мм при температурі 4 град.С - 3-4 доби, у замороженому стані (-20 град.С і нижче) - необмежений час.

3.1.4. Під час відбору кожен пробу маркують індивідуальним номером. Складають акт про відбір проб у довільній формі, у якому вказують повну назву господарства/власника, де зроблено відбір біоматеріалу, час відбору, його вид, записують номери тварин та відповідні номери проб.

3.2. Виділення ДНК проводять за декількома методиками в залежності від мети дослідження.

За умови, якщо метою дослідження є скринінговий експрес-аналіз певної групи тварин на наявність генетичних аномалій чи особливостей, ДНК виділяють експрес-методом у невеликій кількості, термін зберігання проби 1-2 доби.

З метою зберігання проби тривалий час і використання для ряду аналізів - ДНК виділяють відповідним методом, така ДНК-проба може зберігатися декілька років.

#### 3.3. Методи виділення ДНК

##### 3.3.1. Експрес-метод виділення ДНК з різних тканин за

допомогою реагента "Chelex-100".

#### 3.3.1.1. Виділення ДНК із крові:

до 2-500 мкл крові або гомогенізованих тромбів додають 1000 мкл стерильної дистильованої води та перемішують на мікрозмішувачі типу "Vortex";

суміш інкубують протягом 15-30 хв за кімнатної температури, періодично перемішують шляхом струшування;

центрифугують протягом 1 хв при 6000 об/хв;

обережно видаляють надосадову рідину, залишають 20-30 мкл рідини над осадом;

додають 170-180 мкл 5%-ного стерильного водяного розчину "Chelex-100";

інкубують протягом 15-30 хв. при температурі 56 град.С;

ретельно перемішують шляхом струшування та витримують 8 хв. на водяній бані при температурі 100 град.С;

ретельно перемішують шляхом струшування;

центрифугують протягом 5 хв. при 6000 об/хв.

Для ампліфікації використовують 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК. Зберігають зразки при температурі -20 град.С. Після кожного розморожування зразки перемішують та центрифугують протягом 5 хв. при 6000 об./хв.

#### 3.3.1.2. Виділення ДНК із сперми:

до 3 мкл нативної сперми додають 200 мкл 5% стерильного водного розчину "Chelex-100"

до суміші додають 2 мкл протеїнази К концентрацією 10 мг/мл та 7 мкл 1 М дітіотрейтолу;

обережно перемішують шляхом струшування та інкубують зразки 30-60 хв. при температурі 56 град.С;

перемішують уміст пробірок на мікрозмішувачі 5-10 секунд та інкубують 8 хв. при температурі 100 град.С.;

перемішують на мікрозмішувачі 5-10 секунд та центрифугують 2-5 хв. при 8000-10000 об./хв.

Зразки зберігають при температурі -20 град.С. Для ампліфікації використовують 5 мкл надосадової рідини, яка містить ДНК.

Концентрацію та ступінь очищення ДНК визначають спектрофотометрично (спектрофотометр СФ-46) при довжині хвилі 260 та 280 нанометрів. Нативність ДНК визначають шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі за умови відсутності "шлейфу" фрагментів ДНК та інтенсивності флуоресценції бромистого етидію при ультрафіолетовому опромінюванні електрофореграм.

3.3.2. Метод виділення ДНК за Соколовим-Джемелинським (для проведення ряду аналізів і тривалого зберігання препаратів ДНК):

5 мл крові, що містить антикоагулянт змішують з 30 мл холодного (4 град.С) буферу для лізису клітин (0,32 М сахарози, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1% Тритон X-100, 0,01М трис-HCl (pH 7,6)) і витримують при температурі 4 град.С протягом 30 хв.;

ядра клітин осаджують шляхом центрифугування при 4000 об/хв. Термін осаджування 30 хв. при температурі 4 град.С;

осад ресуспендують у розчині, що містить 1,5 мл солі EDTA (75 мМ NaCl, 25 мМ EDTA (pH 8,0)), 200 мкл 10% SDS, 25 мкл (10 мг/мл) протеїнази К, та інкубують протягом 16 годин при температурі 37 град.С;

до одержаного лізату додають 0,75 мл 5М ацетату калію (pH 4,8), обережно перемішують, витримують 30 хв при температурі 4 град.С та центрифугують (40 хв., 5000 об./хв., 4 град.С);

до супернатанту додають два об'єми холодного (4 град.С) 96% етанолу та вимотують ДНК на скляну паличку;

підсушують за кімнатної температури, ДНК двічі промивають 70% етанолом та розчиняють у 0,5 мл буферу TE (10 mM Tris-HCl (pH 7,4)), 1 mM EDTA (pH 8,0) або 0,5 мл деіонізованої води.

Проби ДНК зберігають при температурі -20 град.С.

#### 3.4. ДНК-ампліфікація локусів геному, вибраних для аналізу

Для ДНК-ампліфікації використовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Суть методу - багатократний направлений синтез ДНК із дезоксирибонуклеотидтрифосфатів, *in vitro*, за допомогою термостабільної ДНК-полімерази. Специфічність синтезу (ампліфікації) вибраної ділянки ДНК визначається синтетичними праймерами-затравками.

##### 3.4.1. Обладнання для проведення ПЛР:

ампліфікатор (інша назва приладу - термоциклер або термостат, що програмується для проведення ампліфікації);

автоматичні мікропіпетки (0,5 - 200 мкл) для відбору зразків; центрифуга для пробірок типу "Eppendorf" (частота обертання ротора до 14000 об./хв.);

прилади для вертикального (у поліакриламідному гелі) та горизонтального (в агарозному гелі) електрофорезу;

трансілюмінатор;

система для фото- або цифрової документації результатів.

##### 3.4.2. Реактиви для проведення ПЛР:

термостабільна ДНК-полімераза;

специфічні праймери-затравки;

реакційна суміш для проведення ПЛР (уміщує реакційний буфер для проведення ПЛР з MgCl<sub>2</sub> або без нього, оптимізований для конкретної термостабільної ДНК-полімерази, та суміш чотирьох дезоксинуклеотид-трифосфатів);

високоочищена (деіонізована) вода.

Реактиви поставляються у готовому вигляді фірмами-виробниками.

##### 3.4.3. Проведення реакції

В ампліфікаційну пробірку (0,5 мл) уносять компоненти реакції: реакційну суміш, праймери-затравки для синтезу вибраної ділянки ДНК, термостабільну ДНК-полімеразу, зразок ДНК тварини і воду, доводячи до кінцевого об'єму 25 мкл.

Конкретна кількість реактивів (мкл) залежить від концентрації, у якій вони поставляються фірмами-виробниками. Реакційна суміш завжди вміщує 1-кратний реакційний буфер, а кількість у ній іонів Mg<sup>++</sup> може коливатися в діапазоні від 1,5 до 3 mM. Кількість полімерази, що вноситься, залежить від її активності. Уносять 1-2 одиниці активності фермента (0,1-0,5 мкл). Загальну кількість реактивів розраховують у відповідності до числа зразків, які ампліфікують. Збирають в окрему пробірку всі компоненти реакції, крім зразка ДНК, після ретельного перемішування розносять в окремі пробірки. Пробірки заздалегідь маркують відповідно до зразків ДНК. Для запобігання випаровуванню на реакційну суміш до кожної пробірки наносять шляхом нашарування мінеральне масло.

Для ДНК-діагностики стрес-синдрому у свиней як один з можливих варіантів використовують праймери:

RYR 1: 5' - GTGCSTGATGTCSTGTGTTCCST - 3';

RYR 2: 5' - CTGGTGACATAGTTGATGAGGTTTG - 3'.

У результаті ПЛР синтезується фрагмент ДНК розміром 134 пари нуклеотидів (п.н.).

Для ДНК-аналізу синдрому дефіциту адгезійності лейкоцитів великої рогатої худоби (BLAD) використовують праймери:

F - 5' - TGAGACCAGGTCAGGCATTGCGTTCA - 3';

R - 5' - CCCCCAGSTTCTTGACGTTGACGAGGTC - 3'.

У результаті ПЛР синтезується фрагмент ДНК розміром 132 п.н.  
В ампліфікаційній суміші під час ДНК-тестування великої рогатої худоби за геном гормону росту використовують праймери:

F - 5' - CCGTGTCTATGAGAAGC - 3';

R - 5' - GTTCTTGAGCAGCGCGT - 3'.

У результаті ПЛР синтезується фрагмент ДНК розміром 428 п.н.

Для свиней використовують праймери:

BG3M - 5' - ACCGGCTGTGATGGCTGCAGGCAA - 3';

BG4 - 5' - AGGТАСТССАТССАГААСGCCСAG - 3'.

У результаті ПЛР синтезується фрагмент ДНК розміром 659 п.н.

Під час ДНК-тестування за геном капа-казеїну використовують праймери:

Vocas A: 5' - ATGTGCTGAGCAGGTATCCTAGTTATGG - 3';

Vocas B: 5' - CСAAAAGTAGAGTGCAACAACACTGG - 3'.

У результаті ПЛР синтезується фрагмент ДНК розміром 883 п.н.

Для ампліфікації фрагмента гена рецептора естрогена використовують праймери:

ESR 3: 5' - CССТСТАТGACСТGCTGCTG - 3';

ESR 4: 5' - TCAGATTGTGGTGGGGAAGTTC - 3'.

У результаті ПЛР синтезується фрагмент ДНК розміром 185 п.н.

Після приготування ампліфікаційної суміші пробірку поміщають в ампліфікатор. Для кожної пари праймерів використовують оптимізований температурно-часовий режим ампліфікації.

3.4.4. Два режими ампліфікації

3.4.4.1. Для ампліфікації фрагмента ріанодинрецепторного гена (RYR1) режим ампліфікації:

1-й етап

94 град.С - 4 хв.

2-й етап

94 град.С - 20 сек.

69 град.С - 20 сек.

72 град.С - 20 сек.

Цикли повторюються 30 разів.

3-й етап

72 град.С - 4 хв.

3.4.4.2. Для ампліфікації фрагмента гена гормону росту свиней режим ампліфікації:

1-й етап

94 град.С - 4 хв.

2-й етап

94 град.С - 20 сек.

57 град.С - 20 сек.

72 град.С - 20 сек.

Цикли повторюються 30 разів.

3-й етап

72 град.С - 4 хв.

Після ампліфікації пробірку з реакційною сумішшю зберігають до використання не більше 24 годин при температурі 4 град.С або заморожують для довготривалого зберігання.

3.5. Обробка ампліфікованих фрагментів рестриктазою

Для ДНК-діагностики стрессиндрому свиней, синдрому дефіциту адгезивності лейкоцитів великої рогатої худоби (BLAD), дефіциту синтезу уридинмонофосфату в худоби, цитрулінемії при ДНК-тестуванні за геном гормону росту, рецептора естрогену та капа-казеїну проводять гідроліз ампліфікованого фрагмента ДНК

специфічною рестриктазою.

Рестриктазний гідроліз передбачає інкубування ампліфікованої ДНК із рестриктазою в буфері, склад якого спеціально оптимізований для конкретного ферменту рестрикції.

Детальні умови рестриктазного гідролізу наводяться в паспортах до ферментів і розрізняються в залежності від фірми - виробника цього препарату.

Для рестриктазного гідролізу ампліфікованого фрагмента при діагностиці стрессиндрому свиней використовують фермент рестрикції, який має назву Nha I. При діагностиці VLAD - рестриктази Tag I та Hae III. Для ДНК типування за геном гормону росту у великої рогатої худоби використовують фермент - Alu I, свиней - Bsu RI, Bam HI тощо, свиней - MspI. Тестування великої рогатої худоби за геном капа-казеїну потребує обробки фрагмента ампліфікації рестриктазою PstI, тестування свиней за геном рецептора естрогену - AvaI. Для кожного з наведених ферментів існують ферменти-прототипи, які мають інше походження та іншу назву, але специфічність їх дії на ДНК така сама.

### 3.6. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації або рестриктів ДНК

Для перевірки якості ампліфікації та аналізу продуктів рестрикції застосовують метод електрофоретичного розділення ДНК-фрагментів в агарозному (2%- та 4%) або поліакриламідному гелях.

#### 3.6.1. Приготування 2% агарозного гелю:

зважують 2 г агарози і вносять у колбу ємністю 200 мл;

додають 20 мл x 5TBE (трис-боратний буфер) та H<sub>2</sub>O до 100 мл;

2

інкубують на водяній бані (100 град.С) до повного розплавлення агарози;

готують форму для заливання гелю;

охолюють розплавлену агарозу орієнтовно до температури 50-60 град.С та заливають у форму;

сформований агарозний гель охолоджують та розміщують у приладі для електрофорезу.

Під час приготування 4% агарозного гелю проводять ті самі маніпуляції, але зважують 4 г агарози.

#### 3.6.2. Приготування поліакриламідного гелю

Готують стоковий розчин акриламідом (30% акриламідом та 1% N,N'-метиленабісакриламідом), 3% розчин персульфату амонію (розчин зберігають не більше тижня при температурі 4 град.С) та x10 TBE (десятикратний трис-боратний буфер). Готують розчин гелю відповідно до структури поліакриламідного гелю (додаток 1).

У колбу ємністю 200 мл уносять відповідну кількість реагентів для приготування акриламідного гелю вибраної концентрації в такому порядку:

акриламід;

x10 TBE;

H<sub>2</sub>O;

2

3% персульфат амонію.

Суміш заливають у рамку для електрофорезу, у якій розміщено гребінку для формування слотів для нанесення проб, і залишають за кімнатної температури на 1,5-2 години для полімеризації.

#### 3.6.3. Приготування проби ДНК для електрофорезу:

до 6 частин розчину ДНК додають 2 частини буферу для

нанесення проби (буфер для нанесення проби: 0,025% розчин бром-фенолового синього, який готують на 30% гліцерині).

#### 3.6.4.Проведення електрофорезу:

у слоти сформованого агарозного або поліакриламідного гелю вносять 2-20 мкл готової проби ДНК (після ампліфікації або після рестрикції ампліфікатів);

в одну з кишень слотів уносять маркерну ДНК, за допомогою якої визначають розміри ДНК-фрагментів;

умикають блок живлення для електрофорезу (напруга 5 В/см) та проводять електрофоретичне фракціонування ДНК протягом 1,5-4 годин, вимикають блок живлення;

переносять гель у ванночку для фарбування розчином бромистого етидію (0,5 мкг/мл) на 4-6 хв.;

багатократно відмивають гель проточною водою та розміщують на трансільюмінаторі для візуальної детекції результатів.

За необхідності отриману електрофореграму фотографують.

Для визначення розмірів ДНК у пробах, що аналізуються як маркерна ДНК, використовують:

ДНК бактеріофага (лянда), яка гідролізована рестриктазою Pst I або EcoRI, Hind III;

гідролізовану рестриктазою ДНК однієї із плазмід: pBR322, pUC 19 тощо;

так звану ледерну ДНК, яка вміщує фрагменти ДНК розміром, що є кратним 100 п.н.

#### 4. Визначення генотипу тварини

Під час діагностики стрес-синдрому свиней після обробки рестриктазою Hha I ампліфікований ДНК-фрагмент може розділятися на два фрагменти розміром 81 та 53 п.н., що відповідає гомозиготному домінантному генотипу RYR T/RYR T, на три фрагменти розміром 134, 81 та 53 п.н., що відповідає гетерозиготному генотипу RYR T/RYR C, і залишатися нерозділеним - генотип RYR C/RYR C - гомозиготний рецесивний.

Під час діагностики синдрому дефіциту адгезійності лейкоцитів великої рогатої худоби (BLAD) після рестриктного гідролізу ампліфікату можуть виникати такі варіанти фрагментів рестрикції:

за умови використання рестриктази Tag I - 71 та 61 п.н. генотип NN; 132, 71, 61 п.н. - NB; 132 п.н. - BB;

за умови використання рестриктази Hae III - 87 та 45 п.н. генотип NN; 87, 68, 45, 19 п.н. - NB; 68, 45, 19 п.н. - BB.

При тестуванні свиней за геном гормону росту можливі такі варіанти фрагментів рестрикції:

374, 137п.н. - генотип AA; 374, 137, 274 п.н. - AB; 374, 274 п.н. - BB.

Під час тестування великої рогатої худоби за геном гормону росту при використанні ферменту Alu I можливі такі варіанти фрагментів рестрикції:

265, 96, 51 п.н. - генотип LL; 265, 147, 96, 51 п.н. - LV; 265 та 147 п.н. - VV.

Під час ДНК-тестування за геном капа-казеїну виникають такі варіанти фрагментів рестрикції:

106, 306 та 471 п.н. - генотип AA; 106, 306, 471 та 777 п.н. - AB; 106 та 777 п.н. - BB.

При тестуванні свиней за геном рецептора естрогену: фрагменти рестрикції 76 та 109 п.н. відповідають генотипу -/-; 76, 62 та 47 п.н. - +/-; 109, 76, 62 та 47 п.н. - -/+.

## 5. Оформлення результатів тестування тварин за ДНК-маркерами

Результати тестування тварин за ДНК-маркерами заносяться до форми N 7-ГЕН "Протокол тестування тварин за ДНК-маркерами" (додаток 2).

У формі вказують:

вид тварин - у графі "Вид тварин";

ідентифікаційний номер тварини - у графі "Ідентифікаційний N";

марку і номер у Державній книзі племінних тварин (за наявності) - у графі "Марка і N у ДКПТ";

повну назву породи, до якої належить тварина, - у графі "Порода";

породність тварини - у графі "Породність";

кличку тварини - у графі "Кличка";

стать тварини - у графі "Стать";

число, місяць та рік народження тварини - у графі "Дата народження";

назву господарства/власника та поштову адресу - у графі "Місце народження";

назву господарства/власника та поштову адресу - у графі "Власник".

висновки щодо результатів досліджень - у графі "Висновок".

У графі "Підприємство (лабораторія) генетичного контролю" зазначають повну назву підприємства (лабораторії) генетичного контролю, яке видає протокол.

Форма N 7-ГЕН підписується керівником підприємства (лабораторії) генетичного контролю та завіряється печаткою підприємства.

Начальник Департаменту ринків  
продукції тваринництва з Головною  
державною племінною інспекцією

Д.М.Микитюк

Додаток 1  
до пункту 3.6.2 Інструкції  
з проведення тестування  
племінних тварин  
за ДНК-маркерами

### Структура поліакриламідного гелю

Реагенти	Концентрація, %				
	3,5	5,0	8,0	12,0	20,0
Акриламід 30%, мл	11,6	16,6	26,6	40,0	66,6
H <sub>2</sub> O, мл	76,3	71,3	61,3	47,9	21,3
Персульфат амонію 3%, мл	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1

ТВЕ x10, мл	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	
Загальний об'єм, мл	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	

Додаток 2  
до розділу 5 Інструкції  
з проведення тестування  
племінних тварин  
за ДНК-маркерами

Форма N 7-ГЕН

ПРОТОКОЛ ТЕСТУВАННЯ ПЛЕМІННИХ ТВАРИН  
ЗА ДНК-МАРКЕРАМИ

Вид тварини \_\_\_\_\_

Ідентифікаційний  N	Марка і N у  ДКПТ	Порода	Породність
Кличка			Стать
Дата народження	Місце народження	Власник	

Висновок \_\_\_\_\_

Підприємство  
(лабораторія)  
генетичного контролю \_\_\_\_\_  
(повна назва підприємства, поштова адреса)

М.П. Підпис \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)