

**Міністерство освіти і науки України**  
**Подільський державний аграрно-технічний університет**  
**Факультет ветеринарної медицини і технологій у тваринництві**

*Кафедра гігієни тварин та ветеринарного  
забезпечення кінологічної служби НПУ*

## **МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

для самостійної роботи з дисципліни

### **«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ»**



для здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина», освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини

**м. Кам'янець-Подільський**

**2023**

**УДК 619:616.9**

**Укладач:**

**Тетяна СУПРОВИЧ,**

доктор сільськогосподарських наук, професор; завідувачка кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби НПУ

*Рекомендовано до друку науково-методичною радою  
Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»  
(Протокол № 10 від 19. 12. 2023 р.)*

**Рецензенти:**

**Єлизавета ФЕДОРОВИЧ,**

доктор сільськогосподарських наук, професор, член-кореспондент НААН, завідувачка лабораторії розведення та селекції тварин Інституту біології тварин НААН, м. Львів.

**Юлія ГОРЮК,**

доктор ветеринарних наук, доцент, доцент кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Методичні рекомендації для самостійної роботи з дисципліни «Молекулярно-генетичні методи досліджень у ветеринарній медицині» для здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина», освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини / Т.М. Супрович. Кам'янець-Подільський, ЗВО ПДУ, 2023, 46 с.

Методичні рекомендації розроблено з метою закріплення теоретичних знань і набуття практичних навичок при визначення генотипу великої рогатої худоби за ДНК-маркерами корисних ознак та адаптивного імунітету.

© ЗВО ПДУ, 2023

## ЗМІСТ

Теми	Стор.
Зміст	3
Перелік умовних скорочень	4
Передмова	5
Тема 1. Хімічна будова нуклеїнових кислот. Нуклеотиди. Реплікація ДНК. Шлях передачі інформації в живих системах: «центральна догма» молекулярної генетики.	6
Тема 2. Визначення ПЛР, етапи ПЛР-реакції. Секвенування ДНК. Методи аналізу структури й експресії генів і геномів. Блот-гібридизація.	10
Тема 3. Головний комплекс гістосумісності. Структура та функції головного комплексу гістосумісності великої рогатої худоби. Ген BOVA-DRB3: структура, функції, поліморфізм в популяціях.	15
Тема 4. Генетичні маркери та їх роль в дослідженні захворювань. Ідентифікація QTL-генів у тваринництві.	22
Тема 5. Молекулярно-генетична діагностика інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин.	28
Тема 6. Біотехнологічні сільськогосподарські культури, методи і підходи щодо діагностики ГМО (ГМР).	33
Тема 7. Мікросателітні локуси в дослідженнях генофондів собак	41
Рекомендовані джерела інформації	46

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Bf – комплемент фактора В

BoLA (Bovine Lymphocyte Antigen) – головний комплекс гістосумісності ВРХ

DR, DP, DQ – локуси головного комплексу гістосумісності

Dr-антиген – антиген DR локусу головного комплексу гістосумісності

DRB3 – ген, який кодує антигени класу II головного комплексу гістосумісності  
ВРХ

HLA (Human Leukocyte Antigene) – головний комплекс гістосумісності людини

Ir (immune response) – гени імунної відповіді

MAS (marker-assisted selection) - маркер-асоційована селекція

SCC (Somatic Cell Count ) – кількість соматичних клітин в 1 мл молока

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – метод однонуклеотидних замінів

ВЛ ВРХ – вірус лейкозу великої рогатої худоби

ВРХ – велика рогата худоба

ГКГ (МНС) – головний комплекс гістосумісності (Major Histocompatibility  
Complex)

ГМО – генетично модифіковані організми

ДНК (DNA) – дезоксирибонуклеїнова кислота (deoxyribonucleic acid)

ВОЗ – всесвітня організація охорони здоров'я

ЛКО (QTL) – локус кількісних ознак (Quantitative Trait Locus)

ПДРФ (RFLP) – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів (Restriction  
Fragment Length Polymorphism)

ПЛР (PCR) – полімеразна ланцюгова реакція (Polymerase Chain Reaction)

ПЛР-РЧ полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі

п.н. – кількість нуклеотидних пар в ланцюгу ДНК

QTL – локуси кількісних ознак

## ПЕРЕДМОВА

Молекулярні методи досліджень набувають дедалі більшої популярності у прикладних галузях ветеринарних наук. Низка дисциплін аграрного профілю, такі як селекція, мікробіологія, вірусологія, епізоотологія, ветеринарно-санітарна експертиза, клінічна діагностика та ін. вже не можуть обходитись без молекулярного «підтвердження» своїх розробок і технологій.

Сьогодні можна виділити кілька основних напрямів у розробленні аграрних ДНК-технологій: дослідження геному сільськогосподарських тварин на наявність продуктивних якостей для вирішення селекційних проблем (MAS – marker assisted selection – селекція за допомогою маркерів); виявлення генетичних захворювань на ранніх стадіях розвитку; діагностика інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин і проведення епізоотологічного моніторингу; генетична «дактилоскопія» організмів, створення генетичних паспортів порід, видів, таксономічних груп; визначення статі ембріонів; контроль якості сільськогосподарської сировини і продуктів харчування.

Методичними вказівками передбачено самостійне опанування матеріалу, який дозволить більш глибоко зрозуміти особливості етапів постановки ПЛР з метою виділення збудника інфекційного захворювання, .

Засвоєння навчального матеріалу систематично контролюється питаннями для самоперевірки, які наведені в кінці кожної теми.

## ТЕМА 1: ХІМІЧНА БУДОВА НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ. НУКЛЕОТИДИ. РЕПЛІКАЦІЯ ДНК. ШЛЯХ ПЕРЕДАЧІ ІНФОРМАЦІЇ В ЖИВИХ СИСТЕМАХ: «ЦЕНТРАЛЬНА ДОГМА» МОЛЕКУЛЯРНОЇ ГЕНЕТИКИ

*Анотація:* У розділі розкрито питання будови полінуклеотиду, будови дезоксирибонуклеїнової та рибонуклеїнової кислоти, властивості азотистих основ, реплікація ДНК. Дано пояснення центральної догми молекулярної біології.

Мономерна одиниця нуклеїнової кислоти – нуклеотид – складається з трьох елементів: азотиста основа, пентозний цукор, залишок фосфорної кислоти.

Азотисті основи – гетероциклічні сполуки, у кільцях яких містяться карбон і азот, а всі зв'язки мають характер частково подвійних. До складу нуклеїнових кислот входять два типи азотистих основ: пурини (загальноприйняте позначення R) – аденін (A) і гуанін (G); піримідини (Y) – урацил (U), тимін (T), цитозин (C). Загальне позначення для всіх основ – N.

Найсуттєвішими для структури нуклеїнових кислот та їхніх взаємодій з іншими молекулами є такі властивості азотистих основ:

- Оскільки всі зв'язки в кільці – частково подвійні, азотисті основи є планарними – усі атоми кільця лежать практично в одній площині.
- Атоми азоту кільця та приєднані до нього атоми кисню є акцепторами, а NH<sub>2</sub>-групи – донорами водневого зв'язку. Але водночас площина кільця є гідрофобною, тому азотисті основи погано розчиняються у воді.

Один із атомів азоту кільця приєднується у складі нуклеотиду до карбону пентозного цукру глікозидним зв'язком.

Сполука азотистої основи й пентози називається нуклеозидом (залежно від типу азотистої основи: аденозин, гуанозин, цитидин, тимідин, уридин) або ж, залежно від типу пентози, рибо- чи дезоксирибонуклеозидом. Рибонуклеозиди входять до складу РНК – рибонуклеїнової кислоти, дезоксирибонуклеозиди – до складу ДНК – дезоксирибонуклеїнової кислоти. Інша хімічна різниця між ДНК і РНК стосується складу піримідинових азотистих основ: Т у ДНК замість U в РНК.

Дві хімічні групи – ОН-група при 3'-атомі пентози одного нуклеотиду та фосфат при 5'-атомі іншого – використовуються для утворення фосфодієфірного зв'язку між нуклеотидами.

Два полінуклеотидні ланцюги (ДНК, РНК або гібридні) можуть об'єднуватись в єдину дволанцюгову структуру (дуплекс). Таке об'єднання відбувається за жорсткої умови: певні азотисті основи повинні стояти одна проти одної – А проти Т (чи U), G проти C. Цей принцип компліментарності, сформульований Уотсоном і Кріком, зумовлений утворенням специфічних водневих зв'язків між названими основами: два зв'язки в парі А-Т, три в парі G-C. Два ланцюги при цьому спрямовані в різні боки (є антипаралельними), цукрофосфатні остови розташовані зовні, пари основ – усередині цієї структури.

У складі такого дволанцюгового комплексу неполярні площини сусідніх пар основ мають наблизитися одна до одної, і відносна гнучкість остовів дозволяє це зробити простим шляхом – закрутити два ланцюги один навкруг одного у подвійну спіраль. Усередині формується стопка (stack) щільно укладених одна на одну пар основ, захищена на поверхні спірально закрученими один навкруг одного полярними цукрофосфатними остовами. Між остовами на поверхні спіралі утворюються два жолобки різного розміру – великий і маленький (major/minor groove), в які “дивляться” донорні та акцепторні групи азотистих основ: у великому жолобку міститься по два акцептори (O, N) та одному донору (NH<sub>2</sub>) водневого зв'язку кожної пари; у маленькому – два акцептори пари А-Т, два акцептори й один донор пари G-С. ДНК із майже будь-якою послідовністю пар основ може існувати у двох структурних формах, що позначаються як А і В.

Обидві спіралі є правими. Основні відмінності між двома формами ДНК зумовлені різною конформацією цукру – С2'- та С3'-ендо. Саме внаслідок цього в А-формі порівняно з В-формою:

- Скорочується відстань між фосфатними залишками.
- Зменшується ступінь правої спіральної закрутки.
- Кожна пара основ суттєво нахилиється до осі спіралі (у В-формі пари майже перпендикулярні до осі).
- Унаслідок нахилу в А-формі скорочується відстань між сусідніми парами основ уздовж осі спіралі (проекція райза на вісь спіралі).

За фізіологічних умов у розчині ДНК існує тільки у В-формі, перехід в А-форму здійснюється за досить екстремальних умов *in vitro* – за певних концентрацій солі та спиртів у розчині, при зниженні вологості у фібрилах. Але це не означає, що А-форма не є фізіологічною.

## РЕПЛІКАЦІЯ ДНК

Процес подвоєння ДНК – реплікація (replication) – забезпечує відтворення спадкової інформації та передачу її до дочірніх клітин при мітозі й мейозі. Синтез ДНК відбувається при реплікації з використанням обох полінуклеотидних ланцюгів як матриць – за так званим напівконсервативним механізмом: дві дочірні молекули-копії містять один материнський ланцюг (що слугував матрицею) і один ланцюг, синтезований *de novo*. Включення нуклеотидів до ланцюга, що синтезується, детермінується матрицею за принципом комплементарності.

Такий механізм реплікації став зрозумілим відразу після того, як Уотсоном і Кріком була сформульована модель подвійної спіралі ДНК. Зростання ланцюга ДНК відбувається в напрямку від 5' до 3'-кінця. Субстратами реакції є 3'-кінцева ОН-група дезоксирибози зростаючого ланцюга та дезоксирибонуклеозидтрифосфати. Фермент, що каталізує цю реакцію – ДНК-залежна ДНК-полімераза (DNA dependent DNA Polymerase, DNAР). Синтез ДНК

за подібними механізмами здійснюється також при репарації пошкоджень і деяких інших процесах.

Реплікація ДНК починається з невеликої ділянки – ориджина (origin), де здійснюється ініціація процесу, головним моментом якої є розходження ланцюгів ДНК. Далі по ходу реплікації такий реплікативний міхур розростається у двох протилежних напрямках. На кожному боці міхура існує так звана реплікативна вилка, у основі якої й відбувається синтез ДНК. Ділянку ДНК, де здійснюється реплікація, що розпочинається з однієї точки, називають репліконом. Еукаріотична хромосома є полірепліконом – вона містить велику кількість точок ініціації.

У кожній реплікативній вилці працюють дві молекули ДНК-полімерази, що здійснюють синтез двох полінуклеотидних ланцюгів. Оскільки два ланцюги є антипаралельними, і синтез відбувається тільки в напрямку від 5'- до 3'-кінця, синтез тільки одного з ланцюгів може відбуватися (і відбувається) безперервно, починаючись від ориджина. Цей ланцюг називають лідируючим (leading strand), його 3'-кінець розташований поблизу від основи реплікативної вилки.

Синтез іншого ланцюга розпочинається від реплікативної вилки: синтезуються окремі фрагменти – так звані фрагменти Оказакі, які пізніше з'єднуються між собою. Довжина фрагмента Оказакі при реплікації у бактерій дорівнює 1–2 тис. нуклеотидів. Для синтезу кожного із фрагментів треба спочатку звільнити відповідний простір на матричному ланцюзі – пересунути реплікативну вилку вперед, відповідно, фрагментарний ланцюг називають ланцюгом, що запізнюється (lagging strand). Середня швидкість реплікації на одну реплікативну вилку становить ~750 нуклеотидів за секунду в бактерій, 60–90 нуклеотидів за секунду в еукаріотів. Синтез та бактеріальної хромосоми відбувається за ~50 хвилин, повна реплікація ДНК еукаріотичної клітини – за кілька годин.

У більшості репліконів реплікація здійснюється в обох напрямках. Сусідні реплікони еукаріотичної хромосоми врешті-решт “зустрічаються”, і в результаті утворюються дві копії ДНК хромосоми.

Магістральний шлях передачі інформації в біологічних системах відображає схема, яка була, виходячи з принципів структурної організації подвійної спіралі ДНК, запропонована у свій час Френсісом Кріком під назвою центральна догма молекулярної біології (рис. 1).

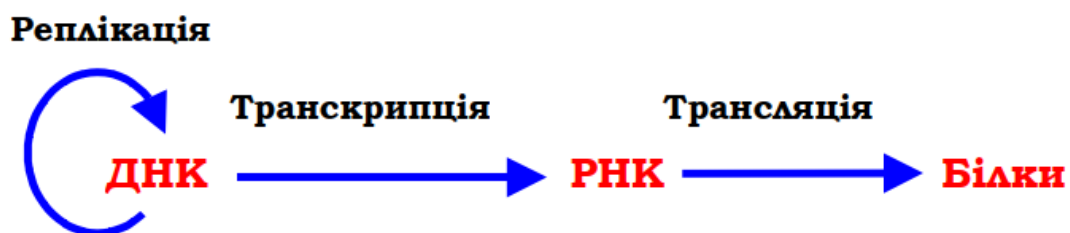


Рис. 1. Центральна догма молекулярної біології та генетики



Інформаційним джерелом є ДНК, а кінцевою точкою передачі інформації – білки (біополімери, побудовані з 20 типів амінокислот). Велике розмаїття амінокислотних послідовностей створює можливості для реалізації різноманітних шляхів укладання ланцюгів у просторі – утворення специфічних просторових структур білків для виконання певних специфічних завдань. Головним типом цих завдань є каталіз численних біохімічних реакцій (у тому числі тих, що забезпечують передачу біологічної інформації). Крім того, білки є основним будівним матеріалом будь-якої біологічної системи й зумовлюють виконання всіх інших біологічних функцій: транспорт речовин, передачу регуляторних сигналів, спрямовані рухи, захист від чужорідних молекул тощо. Отже, саме білки, головним чином, зумовлюють усі фізіологічні особливості та зовнішні ознаки організму.

Спадкова інформація, яка записана в послідовності нуклеотидів на ділянці ДНК, є інформацією про послідовність амінокислот у складі білка. Отже, ген – це окрема змістовна ділянка ДНК, у послідовності якої закодована амінокислотна послідовність білка. Проте, крім білкових, існує також велика кількість генів, кінцевими продуктами яких є різноманітні молекули РНК. Але незалежно від типу гена, первинним продуктом його активності (проміжним для білкових генів) є молекула РНК. Під час транскрипції нуклеотидна послідовність одного з ланцюгів ДНК за принципом комплементарності переписується в нуклеотидну послідовність РНК – ДНК використовується як матриця, на якій будується комплементарна РНК-репліка. Молекула РНК, що синтезується на білковому гені, використовується далі як матриця для білкового синтезу – трансляції (переписування нуклеотидної послідовності РНК в амінокислотну послідовність білка).

Суттєвим моментом функціонування біологічної системи є не тільки реалізація (експресія) генетичної інформації, а й її збереження та подвоєння з метою передачі наступному поколінню. Подвоєння інформації – це відтворення молекули ДНК у двох ідентичних дочірніх копіях – реплікація. Головним її механізмом знову ж таки є принцип комплементарності: кожен із ланцюгів ДНК використовується як матриця для синтезу комплементарної ДНК-репліки.

З кількома суттєвими уточненнями (у деяких вірусів спадкова інформація міститься в молекулі РНК; в усіх організмів у процесі функціонування клітин працюють також шляхи передачі інформації з РНК на РНК і на ДНК; не тільки білки, але й РНК певних типів мають значення для клітинних фізіологічних процесів) центральна догма є головним фундаментальним принципом роботи апарату спадковості.

### *Контрольні запитання*

1. Будова нуклеотида.
2. Будова полінуклеотида.
3. Будова ДНК.
4. Центральна догма молекулярної біології.

## **ТЕМА 2. ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ, ЕТАПИ ПЛР-РЕАКЦІЇ. СЕКВЕНУВАННЯ ДНК. МЕТОДИ АНАЛІЗУ СТРУКТУРИ Й ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ І ГЕНОМІВ. БЛОТ-ГІБРИДИЗАЦІЯ**

*Анотація:* У розділі розкрито перелік основних термінів, етапи постановки ПЛР, різні методи секвенування ДНК, методи аналізу структури й експресії генів і геномів.

Останнім часом до традиційних методів лабораторної діагностики інфекційних захворювань, таких як мікробіологічні та імунологічні додалися нові, засновані на використанні молекулярно-генетичних технологій. Це стало можливим завдяки відкриттю в середині 80-х років процесу штучного багаторазового копіювання ДНК, в даний час відомого як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та подальшому стрімкому розвитку цієї технології.

Завдяки високій чутливості, універсальності та відносній простоті виконання, ПЛР є незамінною для вирішення завдань лабораторної діагностики, таких, як аналіз мутацій, пов'язаних з генетичними захворюваннями і схильністю до певної соматичної патології, пряме виявлення та ідентифікація збудників захворювань, молекулярне типування та дослідження властивостей патогенних мікроорганізмів.

*Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти здобувач:*

амплікон - фрагмент ДНК, що клонується в ході ПЛР;

ампліфікатор - прибор, що програмується, в якому проводять ПЛР;

ампліфікація ДНК - багаторазове збільшення числа копій ДНК;

відпал праймера - комплементарне утворення водневих зв'язків праймера з певною ділянкою ДНК;

відмивочний розчин - 75% розчин етанолу, що використовується на стадії виділення ДНК для відмивки осаду, що містить ДНК, від інших домішок;

детекція – виявлення;

денатурація ДНК - явище, що супроводжується розривом водневих зв'язків між комплементарними основами ДНК під дією високої температури електрофорез процес руху в електричному полі катіонів до катода, а аніонів до аноду;

елюція - екстракція, вимивання;

компліментарність - гетероциклічних основ в ДНК (правило Чаргаффа) – в дволанцюговій молекулі ДНК кількість молекул аденіну дорівнює кількості молекул тиміну, а кількість молекул гуаніну дорівнює кількості молекул цитозину;

мінеральне масло - масло, що отримано хімічним шляхом (наприклад, з нафти), не містить молекул ДНК;

маркер молекулярної ваги ДНК-фрагментів - фрагменти ДНК певної довжини;

нуклеозидтрифосфати - елементарні одиниці для будівлі ДНК (наприклад, тимідинтрифосфат), що використовується полімеразою в реплікації;

праймер - олігонуклеотид довжиною 10-30 п. н., який, коли відпалюється на певній ділянці ДНК, допомагає ДНК-полімеразі почати синтез комплементарної копії одноланцюгової молекули ДНК;

ПЛР полімеразна ланцюгова реакція, в якій кількість дволанцюгового фрагменту (фрагментів) певної довжини підвищується за математичною формулою:  $2^n - 2^n = F$ , де  $n$  - кількість циклів ПЛР, а  $F$  - кількість фрагментів;

полімераза фермент, що бере участь у реплікації, синтезує комплементарну копію одноланцюгової молекули ДНК;

реплікація - процес подвоєння ДНК;

ресуспендування - перехід осаду розчину у зважений стан;

розчин для лізису - розчин, що використовується в етапі виділення ДНК для розриву мембран в клітинах (цитоплазматичної, ядерної та інш.), при виділенні ДНК використовується, наприклад, розчин гуанідін ізоціонату;

сорбент - матеріал, що виявляє спорідненість до певних хімічних речовин, при виділенні ДНК, наприклад, використовують скляні буси;

супернатант - надосадова рідина;

Тaq-полімераза - полімераза, що виділена з бактерій *Thermus aquaticus*, стійка до високих температур;

флюоресценція - світіння речовини при освітленні його світлом.

## Етапи ПЛР

**1. Денатурація.** На першому етапі необхідно денатурувати ДНК, що знаходиться у зразку. Для цього реакційну суміш нагрівають до 92–95°C, у результаті чого дволанцюгові молекули ДНК розплітаються з утворенням двох одноланцюгових молекул. Цей процес триває не менше 1 хвилини.

**2. Відпал.** На другому етапі температуру суміші знижують до 55°C, праймери приєднуються до одноланцюгової ДНК-мішені. Праймери вибирають так, щоб вони обмежували необхідний фрагмент і були комплементарні протилежним ланцюгам ДНК.

**3. Елонгація** (синтез ДНК). На третьому етапі температуру в реакційній суміші доводять до оптимуму роботи Таq-полімерази 75°C, і починається синтез комплементарного ланцюжка ДНК, ініційований 3'-гідроксильною групою праймера, який проходить з максимальною ефективністю.

Надалі етапи денатурації, відпалу і елонгації багаторазово повторюються (30 і більше разів). На кожному циклі кількість синтезованих копій фрагмента ДНК подвоюється.

## Секвенування ДНК

Клонований або ампліфікований фрагмент ДНК можна дослідити різними способами, однак найвичерпнішу інформацію дає встановлення нуклеотидної послідовності (sequence) фрагмента – секвенування.

На рис. 2 показано схему найбільш популярного сьогодні методу Сангера (Frederick Sanger). До одноланцюгової ДНК-матриці додається радіоактивно мічений праймер, повний набір дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP), ДНК-полімераза та невелика кількість дидезоксинуклеозидтрифосфату одного із чотирьох типів (наприклад, ddATP).

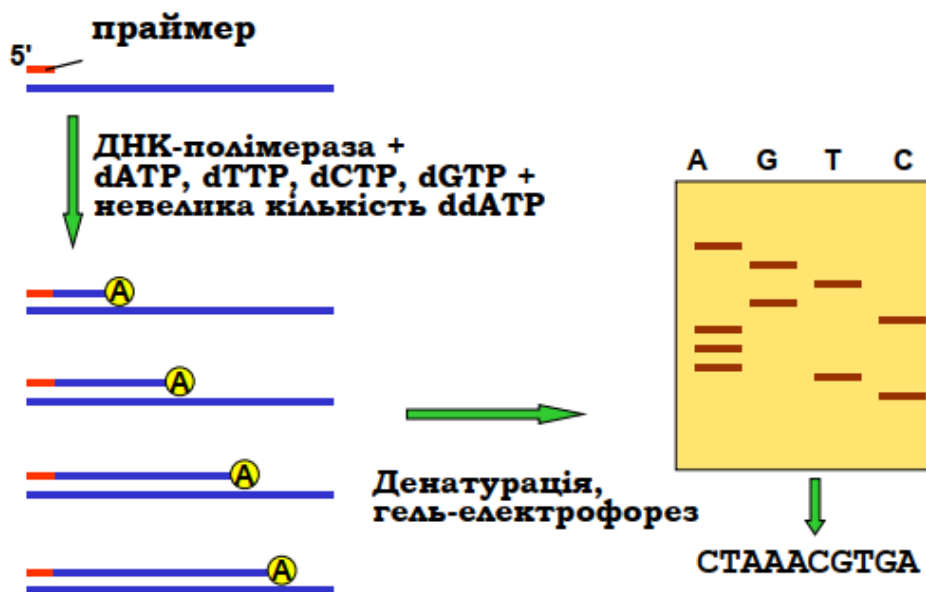


Рис. 2. Секвенування ДНК за Сангером: схема синтезу ДНК у присутності дидезоксиАТР (ліворуч). Шляхом аналогічної процедури для інших трьох дидезоксинуклеотидів отримуємо набір одноланцюгових фрагментів, що аналізуються за допомогою гель-електрофорезу в денатуруючих умовах (праворуч) – розподіл смуг дозволяє прочитати послідовність (праворуч унизу)

Дидезоксинуклеотид відрізняється тим, що містить атом Н замість ОН-групи не тільки при 2'-, а також і при 3'-атомі пентози. Включення такого нуклеотиду в ланцюг, що синтезується, приведе до зупинки подальшого зростання ланцюга внаслідок відсутності 3' ОН-групи на його кінці. Оскільки ddATP присутній у невеликій кількості, така подія буде відбуватися в різних точках ланцюга – в усіх, де аденін розташований напроти тиміну в складі матриці. Шляхом денатурації продуктів реакції отримаємо набір мічених одноланцюгових фрагментів від праймера до кінцевого аденіну.

Довжина цих фрагментів у нуклеотидах визначить порядковий номер аденіну в складі ланцюга. З метою визначення довжини фрагментів проводять гель-електрофорез у денатуруючих умовах, на сусідні лунки гелю наносять

також продукти синтезу у присутності інших дидезоксинуклеотидів. Як показано на рис. 2, після електрофорезу та візуалізації смуг із такого гелю можна прочитати нуклеотидну послідовність.

Метод Сангера використовується сьогодні автоматичними секвенаторами, в яких замість радіоактивно-мічених застосовуються флуоресцентно-мічені праймери. Для кожної з чотирьох реакцій беруть чотири різні флуоресцентні мітки, котрі випромінюють світло в різних спектральних діапазонах. Продукти всіх чотирьох реакцій наносять на гель для електрофорезу разом. Сканування гелю після електрофорезу лазерним променем, що збуджує флуоресценцію, дозволяє дискримінувати продукти різних реакцій, тобто різні кінцеві нуклеотиди, і, таким чином, негайно прочитати послідовність.

Здійснення секвенування кожного із фрагментів, які містяться в геномній бібліотеці клонів, і порівняння послідовностей фрагментів, що перекриваються, дозволяє розмістити клоновані фрагменти в порядку їхньої локалізації в геномі, тобто встановити повну послідовність геному.

## Методи аналізу структури й експресії генів і геномів

### Блот-гібридація

Саузерн-блотинг. Потужним засобом аналізу складних сумішей ДНК щодо наявності там специфічних елементів послідовності є блотгібридація на нітроцелюлозних фільтрах за Саузерном (Edward Southern). Назва процедури, яку схематично зображено на рис. 3, походить від слова blotting (промакування):

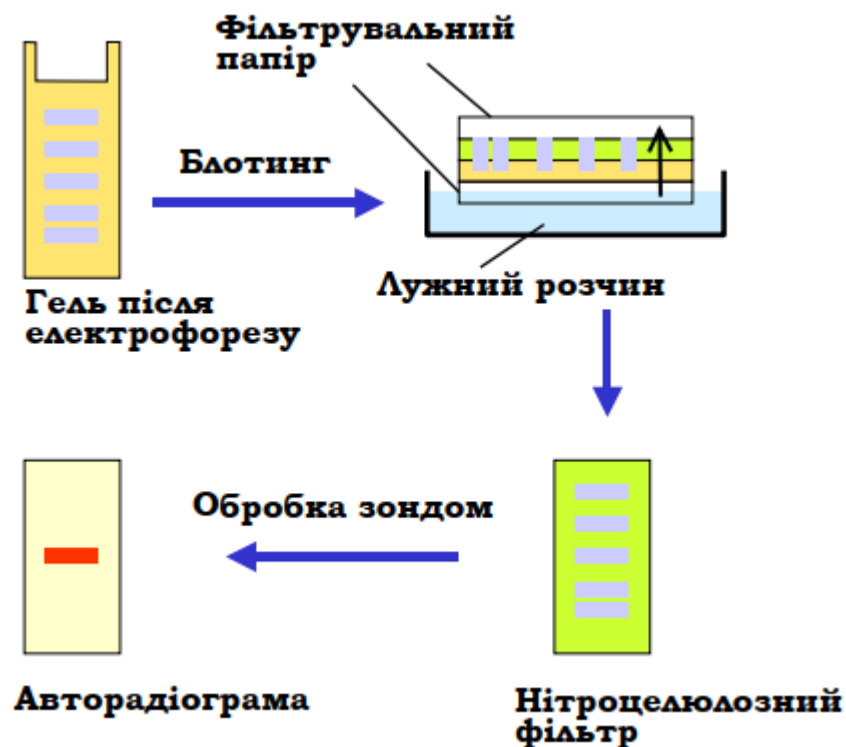


Рис. 3. Блот-гібридація

фрагменти ДНК розділюються за допомогою гель-електрофорезу (залишаючись невидимими в гелі), після чого на гель накладають нітроцелюлозний фільтр, а під та над цим “сендвічем” розміщують фільтрувальний папір і занурюють нижній шар паперу в лужний розчин. Під дією капілярних сил розчин піднімається до верхнього шару паперу, «захоплюючи» при цьому ДНК і переносячи її з гелю на нітроцелюлозу. Одночасно при цьому ДНК денатурується лугом. У результаті одноланцюгова ДНК опиняється на фільтрі – середовищі, придатному для подальшої гібридизації, а сам фільтр є точною реплікою вихідного гелю. Так само можна перенести ДНК на нітроцелюлозу, застосувавши електрофорез у поперечному напрямку – із гелю на фільтр. Далі проводять обробку фільтра зондом – одноланцюговим фрагментом ДНК певної послідовності, який містить радіоактивну мітку. Зонд гібридується з комплементарною ДНК у певних досі невидимих смугах, що можна зафіксувати за допомогою авторадіографії.

У такий спосіб можна встановити, наприклад, наявність у геномі додаткових копій послідовності, що є гомологічними вже відомій; присутність у невивченому геномі генів, гомологічних відомим генам; присутність специфічних послідовностей ДНК у препаратах, що отримані з білково-нуклеїнових комплексів. Прикладом одного з численних застосувань Саузерн-блотингу є метод фингерпринтингу ДНК (DNA fingerprinting). Метод базується на факті наявності в еукаріотичних геномах мінісателітних повторів – невеликих елементів послідовності, що тандемно повторюються в різних місцях геному кілька разів. Розподіл локусів за кількістю повторів є індивідуальним – так само, як відбитки пальців. З метою ідентифікації особини (чи особи – у криміналістиці, судових справах тощо) геномну ДНК обробляють рестриктазою, що не має своїх сайтів усередині повтору. Фрагменти розділяються шляхом електрофорезу, здійснюється блотинг і гібридизація з радіоактивно міченим елементом послідовності мінісателіта. У результаті на авторадіограмі представлено специфічний для особини набір фрагментів різної довжини, тобто різної кількості повторів мінісателіта – своєрідний молекулярний відбиток (DNA fingerprint).

### ***Контрольні запитання***

1. Назвіть етапи ПЛР-реакції.
2. Який процес відбувається під час денатурації.
3. Який процес відбувається під час відпалу.
4. Який процес відбувається під час елонгації.
5. Що таке секвенування ДНК.
6. Що таке блот-гібридизація.

### ТЕМА 3. ГОЛОВНИЙ КОМПЛЕКС ГІСТОСУМІСНОСТІ. СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІЇ ГОЛОВНОГО КОМПЛЕКСУ ГІСТОСУМІСНОСТІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ. ГЕН *BoLA-DRB3*: СТРУКТУРА, ФУНКЦІЇ, ПОЛІМОРФІЗМ В ПОПУЛЯЦІЯХ

**Анотація:** У розділі розкрито питання принципи організації головного комплексу гістосумісності у ссавців і людини, його роль у імунному захисті організмів від чинників зовнішнього і внутрішнього середовища, будова та функції молекул класу I і класу II ГКГ, структура та функції гена *BoLA-DRB3*.

На поверхні майже всіх клітин організму представлені молекули (білки), які мають назву антигенів головного комплексу гістосумісності або МНС (Major histocompatibility complex). Молекули ГКГ виконують роль своєрідних "антен", що дозволяють організму, розпізнавати власні та чужорідні клітини (бактерії, віруси, ракові клітини) і, при необхідності, запустити імунну відповідь, забезпечуючи утворення специфічних антитіл і видалення чужорідного агенту з організму. головний комплекс гістосумісності – це група генів і кодованих ними антигенів клітинної поверхні, які відіграють найважливішу роль у розпізнаванні чужорідних антигенів і розвитку імунної відповіді. Молекули ГКГ є на поверхні клітин усіх вищих хребетних.

Будова ГКГ досить консервативна. Для отримання уявлення про його склад достатньо розглянути його структуру на прикладі будь-якого виду ссавців (рис.1.1).

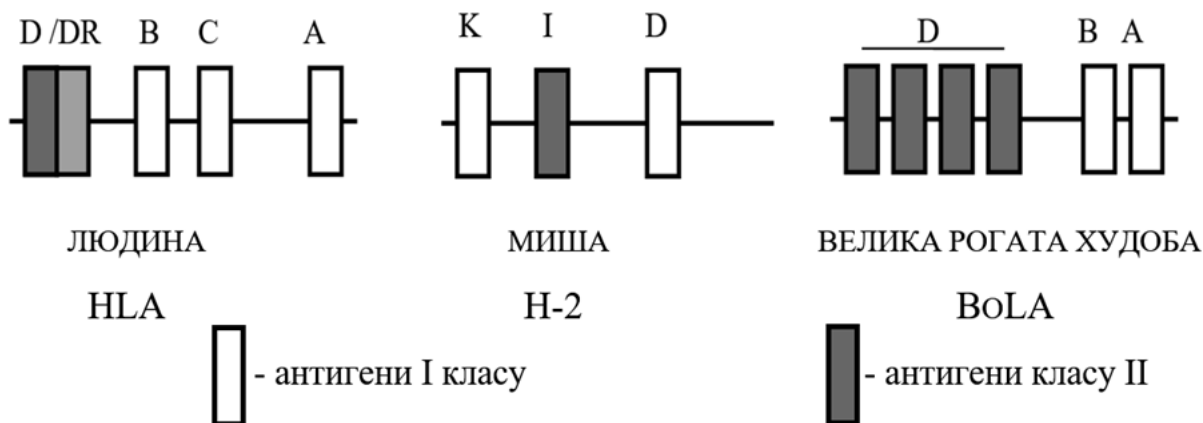


Рис. 1.1. Схема організації локусів, що кодують антигени класу I і антигени класу II, у деяких тварин і людини

Отже, хребетні мають здатність розпізнавати, руйнувати та розвивати імунологічну пам'ять на мікроорганізми, які потрапили в організм шляхом активації клітин і молекул системи імунітету. Для досягнення цих цілей є дві

гілки імунної системи (природний і набутий імунітет), які повинні взаємодіяти один з одним. Вроджена імунна система містить в основному клітини мієлоїдного походження, які розпізнають загальні структури широкого спектру мікроорганізмів. Деякі з цих клітин (макрофаги і дендритні клітини) також беруть участь в активації адаптивного імунітету шляхом захоплення та обробки антигенів і діючі як клітини, що представляють антиген для Т-лімфоцитів. Ефекторні клітини адаптивної імунної системи, що складаються з В- та Т-лімфоцитів здатні визначати дуже велику різноманітність антигенних пептидів. Вони мають бути пов'язані в межах ендоплазматичного ретикулюму з молекулами кодованими ГКГ. На сьогодні добре відома будова і функції молекул класу I та класу II головного комплексу гістосумісності людини, будова яких практично універсальна для усіх ссавців і висвітлена у ряді робіт, які стали класичними. Полігенні та поліморфні особливості ГКГ надають цим молекулам величезні можливості щодо презентації антигену.

Молекула МНС I класу являє собою гетеродимер, що включає важкий  $\alpha$ -ланцюг і однодомений  $\beta 2$ -мікроглобулін, нековалентно зв'язаний з основним поліпептидом. Важкий ланцюг має 3  $\alpha$ -домени. Конформація  $\alpha$ -3 домену і  $\beta 2$ -мікроглобуліну нагадує складчасту структуру Ig. Основні властивості антигенів I класу – зв'язування пептидів і презентація їх в імуногенній формі для Т-клітин залежить від  $\alpha$ -1 і  $\alpha$ -2 доменів. Ці домени мають  $\alpha$ -спіральні ділянки, які при взаємодії між собою утворюють щілину – місце зв'язування пептиду. Саме цей комплекс визначає імуногенність екзогенного пептиду, його можливість взаємодіяти з антигенрозпізнаючим центром Т-клітинного рецептора CD8-лімфоцитів.

Молекули МНС I класу:

- можуть входити до складу рецепторів гормонів (наприклад, зв'язування інсуліну після видалення з поверхні клітини МНС I класу);
- класичні трансплантаційні антигени;
- маркери диференціювання Т-лімфоцитів;
- є структурами розпізнавання при взаємодії між цитотоксичними Т-лімфоцитами та інфікованими вірусами клітинами-мішенями.

Молекули ГКГ II класу присутні на поверхні В-лімфоцитів, активованих Т-лімфоцитів, антигенпрезентуючих клітин (моноцитів, макрофагів, дендритних клітин, клітин Купфера, альвеолярних та перитонеальних макрофагів тощо). За будовою це теж гетеродимери, побудовані з нековалентно зчеплених  $\alpha$ - і  $\beta$ -ланцюгів, кожен з яких включає по 2 домени.

Антигензв'язуюча ділянка, як і в молекулі I класу, формується  $\alpha$ -спіральними ділянками доменів  $\alpha$ - і  $\beta$ -1. Між класами антигенів I і II є очевидною загальна структурна подібність (рис.1.2).



Взаємне розташування  $\alpha 1$  і  $\alpha 2$ -доменів в молекулі створюють «жолоб» («кишеню»), у формуванні якого беруть участь дві  $\alpha$ -спіралі – умовні «стіни» і антипаралельні  $\beta$ -складки – умовне «дно». Ця структура отримала назву «пептидзв'язуюча борозна» або щілина Бьоркмана на честь вченого, який вперше її виявив. Певна амінокислотна послідовність цієї борозни служить своєрідним «якорем» утримання в ньому пептиду. Саме таким чином молекула класу I презентує (представляє) специфічний пептид для його подальшого розпізнавання -  $\alpha$ - і  $\beta$  -ланцюгами Т-клітинного рецептора, який розпізнає антиген.

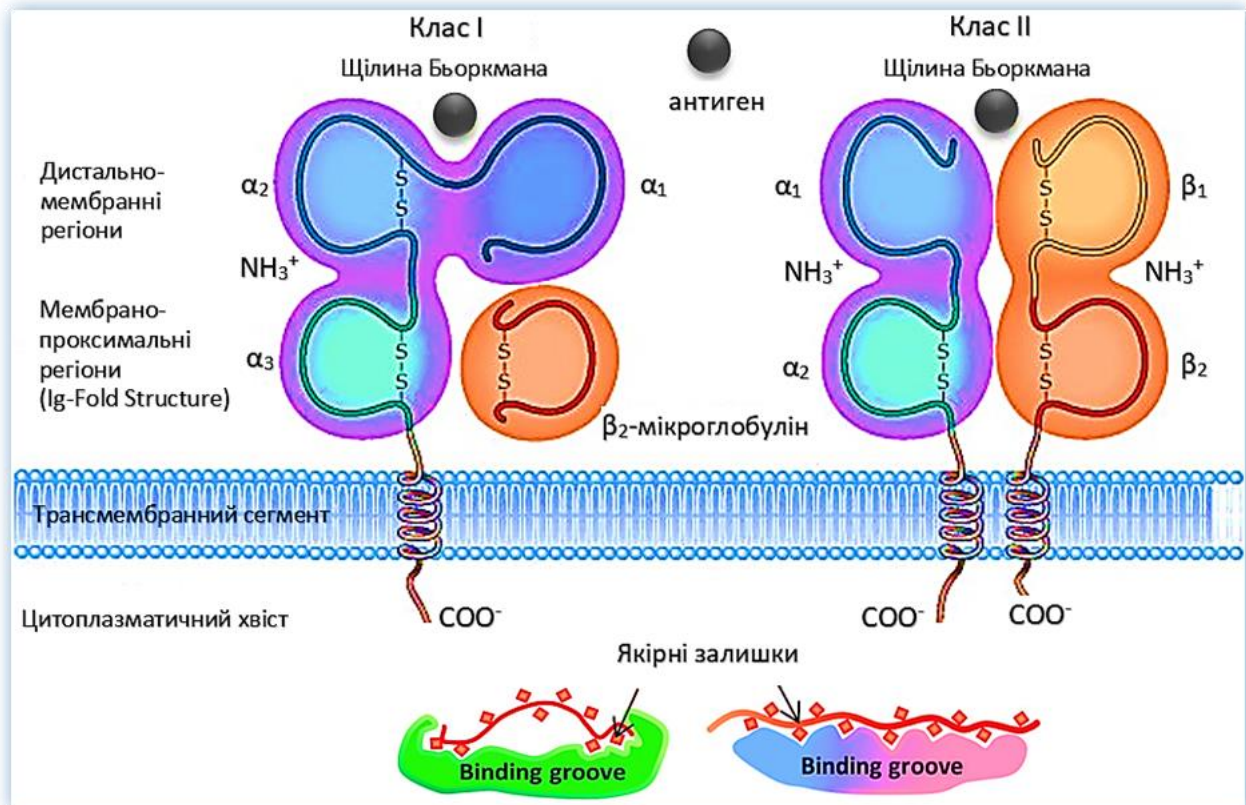


Рис. 1.2. Структура молекул МНС і сайтів зв'язування (власна реконструкція). Схематичне зображення класу I і класу II. Знизу: МНС-пептид, сайти зв'язування. Квадрати представляють собою окремі амінокислоти антигенних пептидів, які зв'язуються в щілині Бьоркмана (*binding groove*)

З поліморфізмом ГКГ пов'язаний генетичний контроль імунної відповіді. Якщо амінокислотні залишки, що формують щілину Бьоркмана у антигенів II класу не можуть зв'язати екзогенний пептид, Т-хелпери залишаються ареаактивними і їх допомога в синтезі антитіл В-лімфоцитами не реалізується. Саме ця обставина є причиною генетично детермінованого дефекту в імунному реагуванні.

Антигени МНС II класу можуть з'являтися на ендотелії капілярів та багатьох епітеліальних клітинах при активації  $\gamma$ -інтерфероном. Гени класу II ГКГ орієнтовані на антигени позаклітинних сторонніх агентів (віруси, бактерії, гельмінти тощо) і активні тільки в професійних антигенпрезентуючих клітинах, а відповідні їм білки активують не тільки CD8+, але і CD4+ лімфоцити (Т-хелпери і наївні Т-кілери).

Професійні антигенпрезентуючі клітини захоплюють антиген шляхом фагоцитозу або ендоцитозу, а потім представляють його фрагмент на своїй мембрані в комплексі з молекулами білків класу II ГКГ. Після контакту CD4+ лімфоцити з антигеном клітини продукують додаткові ко-стимулюючі молекули, що призводить до активації Т-клітини. Їх експресія характерна для професійних антигенпрезентуючих клітин. Гени класу II займають менше місця на хромосомі, ніж класу I. До складу цього класу входять:

- класичні гени (HLA-DP, HLA-DQ і HLA-DR);
- некласичні гени (HLA-DM і HLA-DO: DOA і DOB);
- псевдогени (вісім псевдогенів асоційовані з перерахованими вище локусами).

Оскільки білок, що представляє антиген, складається з двох субодиниць, то ген що, кодує  $\alpha$ -ланцюг, прийнято позначати буквою А (наприклад, HLA-DPA або HLA-DQA), а який кодує  $\beta$ -ланцюг - буквою В (наприклад, HLA-DRB або HLA-DPB). За назвою гена може йти цифра, що позначає локус даного гена, якщо він є має декілька копій (наприклад HLADPA1 або HLA-DRB4).

Між генами класів I і II на хромосомі людини розташовані гени класу III, що включають 62 гена з більш ніж 500-ми екзонами. Клас III практично не має псевдогенів, за винятком однієї дубльованої ділянки гена c4. Гени цього класу кодують продукти, які виконують ряд важливих біологічних функцій. Ген CYP21 здійснює контроль активності P450, порушення діяльності якого у людини веде до розвитку синдрому адреналової гіперплазії. Продукти генів комплексу крові c4a і c4b беруть участь в автоімунних процесах, а при визначених алелях забезпечують у людини схильність до системного червоного вовчаку. Гени теплового шоку hsp70 відповідають за вироблення білкових продуктів, що володіють захисною функцією при розвитку клітинного стресу (при підвищенні температури тіла, зміні рН і осмотичного тиску). Гени локусу фактору некрозу пухлин (tnf) в нормальному стані відповідають за розвиток септичного шоку та індукцію клітинного апоптозу.

До складу МНС крім генів і їх залишків входять повторювані ділянки, що містять довгі та короткі дисперговані повтори (LINE, SINE), довгі і короткі тандемні повтори (LTR, STR), а також ретроелементи. Варіабельність інтронних ділянок ДНК всередині комплексу гістосумісності вище, ніж поза ним, що,

швидше всього, пов'язано з явищем їх зчеплення з окремими генами ГКГ і участю в мутаційних та рекомбінаційних процесах.

Необхідно відмітити високу варіативність організації ГКГ. Послідовність генів і їх число сильно варіюють навіть в межах одного сімейства ссавців. так, наприклад, серед хижих (Carnivora) представники сімейства котячих (Felidae) в ході своєї еволюційної історії втратили повністю гени DQ, а ділянку DP зберегли в формі реліктового псевдогена. Ця втрата була компенсована появою нових семи генів DR. С іншого боку, псові (Canidae) зберегли в своєму комплексі гістосумісності ген DQ, але сам комплекс виявився рознесений на різні хромосоми. У ГКГ різних видів відзначені значні відмінності в співвідношенні G-C нуклеотидних пар, кількість і розташування диспергованих і тандемних повторів та ретроелементів.

В даний час відомо, що система МНС, забезпечуючи регуляцію імунної відповіді, здійснює такі найважливіші фізіологічні функції як взаємодію всіх імунокомпетентних клітин організму, розпізнавання своїх і чужорідних, у тому числі, змінених власних клітин, запуск і реалізацію імунної відповіді та, в цілому, забезпечує виживання людини і тварин в умовах екзогенної і ендогенної агресії. МНС-системі належить істотна роль у визначенні схильності до різних захворювань, також вона пов'язана з репродукцією і тривалістю життя.

Генетична різноманітність на амінокислотному і нуклеотидному рівнях, виявлена у ВРХ в локусі гістосумісності схожа з даними, отриманими для локусу HLA (ген HLA-DRB1). Для цього регіону, як у людини, так і у великої рогатої худоби, характерне переважання значущих замін над мовчазними, що передбачає дію відбору, який сприяє підтримці генетичної різноманітності. Порівняння DRB локусів людини і ВРХ показує значну схожість в розташуванні поліморфних ділянок і ступеня їх поліморфності. Велика частина поліморфних ділянок відповідає сайту впізнавання молекули класу II. Подібна подібність ймовірно обумовлена конвергентною еволюцією генів, продукти яких повинні забезпечувати розпізнавання однотипного спектру чужорідних антигенів.

Про існування головного комплексу гістосумісності великої рогатої худоби (BoLA) вперше було проголошено в 1978 році в Единбурзі на першій Міжнародній Робочій нараді. Цій події передувало незалежне дослідження дев'яти лабораторій, які виявили одну і ту ж лейкоцитарну систему антигенів великої рогатої худоби. Комплекс BoLA локалізований на 23-й хромосомі. Як і в людини, локус BoLA є досить складним і містить близько 154 функціональних генів, які охоплюють близько 4 сМ. На молекулярно-біологічному рівні трансляція BoLA-DRB3 забезпечує синтез білкового антигену, розташованого на зовнішній стороні мембрани В-лімфоцитів.

## Ген *BoLA-DRB3*: структура та функції

Ген *BoLA-DRB3* кодує антигени класу II головного комплексу гістосумісності ВРХ. Він розташований на зовнішній стороні мембрани В-лімфоцитів в області Па сублокусу DR системи *BoLA* і складається з шести екзонів. З шести екзонів *DRB3*, екзон 2, який кодує пептидзв'язуючу щілину Бьоркмана, є найбільш поліморфним.

Хоча всі АПК відіграють подібну роль у адаптаційному імунітеті, слід враховувати деякі важливі відмінності. Макрофаги та дендритні клітини – фагоцити, які поглинають і вбивають патогени, які проникають через бар'єри першого ряду (тобто шкіру та слизові оболонки). В-клітини, з іншого боку, не функціонують як фагоцити, але відіграють основну роль у виробленні та секреції антитіл. Макрофаги та дендритні клітини розпізнають патогени за допомогою неспецифічних взаємодій з рецепторами PAMP, TLRs та рецепторів опсонізації комплементу чи антитіл. В-клітини взаємодіють із сторонніми патогенами або їх вільними антигенами, використовуючи антиген-специфічний імуноглобулін як рецептор (мономерні IgD та IgM). Коли рецептори імуноглобуліну зв'язуються з антигеном, В-клітина засвоює його шляхом ендоцитозу, обробляє і представляє Т-клітинам (рис.1.3). Механізм, за допомогою якого епітопи відбираються для обробки та подання АПК, є складним і недостатньо зрозумілим. Однак, одразу після обробки найбільш імунодомінантний епітоп зв'язується в межах щілини

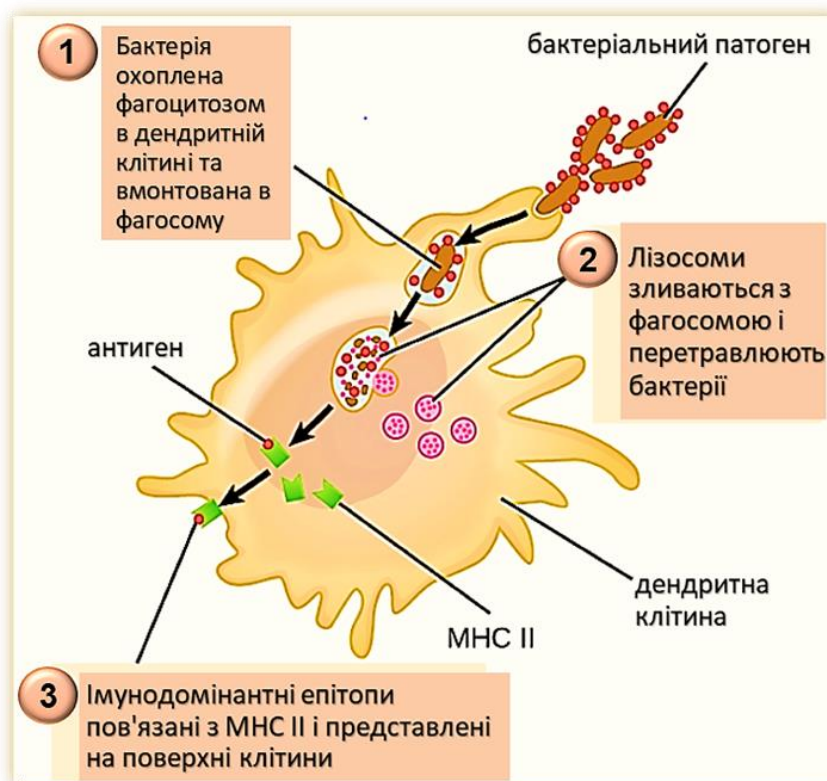


Рис. 1.3. Процес фагоцитозу, лізису та представлення епітопу в дендритній клітині

Бьоркмана молекули МНС II і переноситься на поверхню дендритної клітини для представлення Т-клітинам.

Перш ніж розпочати елімінацію заражених клітин, АПК повинні спочатку активувати Т-клітини, які беруть участь у клітинному імунітеті. Якщо внутрішньоклітинний збудник безпосередньо інфікує цитоплазму АПК, то обробка та представлення антигенів може відбуватися у протеасомах та на клітинній поверхні з МНС I. Однак, якщо внутрішньоклітинний патоген безпосередньо не заражає АПК, то застосовується альтернативна стратегія, яка називається крос-презентацією. При цьому антигени вводяться в антигенпрезентуючі клітини механізмами, які зазвичай призводять до презентації з допомогою МНС II (тобто через фагоцитоз), але антиген презентується молекулою МНС I для CD8 Т-клітин.

Точні механізми, за допомогою яких відбувається перехресне представлення, ще недостатньо вивчені, але, схоже, перехресна презентація – це функція дендритних клітин, а не макрофагів або В-клітин].

На сьогодні структура і функції гена *BoLA-DRB3* вивчена досить детально. Основні зусилля дослідників зосередженні на виявленні особливостей амінокислотних послідовностей екзона 2 у різних популяцій ВРХ. Сучасні методики секвенування різних ділянок генома ВРХ дають можливість отримати точні послідовності та розширювати алельну базу для вивчення питань пов'язаних з поліморфізмом МНС.

### ***Контрольні запитання***

1. Будова ГКГ людини.
2. Будова *BoLA* – системи.
3. Будова молекул класу I і II ГКГ.
4. Функції ГКГ.
5. Функції гена *BoLA-DRB3*.

## ТЕМА 4. ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ ТА ЇХ РОЛЬ В ДОСЛІДЖЕННІ ЗАХВОРЮВАНЬ. ІДЕНТИФІКАЦІЯ QTL-ГЕНІВ У ТВАРИННИЦТВІ

*Анотація:* У розділі розкрито поняття про генетичний маркер, про локуси кількісної ознаки, мету ПДРФ-аналізу ДНК – маркерів, особливості реакції ПЦР-ПДРФ та алель-специфічної ПЛР, поняття про геномну селекцію, поняття про мінісателіти, наведено приклади ДНК-маркерів молочної та м'ясної продуктивності ВРХ

Інтенсифікація тваринництва вимагає подальшого розвитку теоретичних основ і вдосконалення організаційних форм селекції сільськогосподарських тварин за рахунок залучення нових методів оцінки генотипів тварин. До таких методів належить використання різних типів молекулярних маркерів.

**Генетичний маркер** – це поліморфізм ДНК, який може бути легко встановлений при молекулярному або фенотипічному аналізі.

Розвиток молекулярних методів досліджень дає можливість створити нові тест-системи, що дозволяє аналізувати генетичний поліморфізм на рівні продуктів генів (білковий або біохімічний поліморфізм) і на рівні генетичного матеріалу клітини (поліморфізм ДНК).

Нині оформилися два напрями, засновані на використанні методів молекулярної генетики в селекції: виявлення поліморфізму структурних генів (маркери першого типу), пов'язаного з генетичними захворюваннями або продуктивними особливостями тварин, і використання поліморфізму анонімних нуклеотидних послідовностей (маркери другого типу) в маркерній селекції.

Основою перших молекулярних маркерів, використаними в дослідженнях домашніх тварин, став білковий поліморфізм. У численних дослідженнях, особливо в 1970-х роках, охарактеризовано різноманітність по групах крові і алельних формах ферментів. Проте, рівень білкового поліморфізму невисокий, що знижує ефективність його використання у вивченні біорізноманітності.

Класичним прикладом застосування маркерів першого типу є використання груп крові для контролю за селекційним процесом. Як поліморфні маркери при вивченні їх асоціацій з мультифакторними захворюваннями використовуються генетичні маркери (певні алелі гена) і антигени головного комплексу гістосумісності.

Підхід до селекції по маркерах другого типу набуває все більшого поширення через свою відносну простоту і дешевизну досліджень, а також їх високий генетичний поліморфізм. Ці елементи генома характеризуються високою варіабельністю і утворюють сімейства множинних псевдоалелів, що дозволяє говорити про перспективність використання їх як маркерів при селекції

за кількісними ознаками для маркування так званих локусів кількісних ознак – QTL.

Більшість господарсько-корисних ознак, цікавих для селекції, кількісні і мають комплексний (взаємозалежний) характер. Вони детермінуються полігенами і в значній мірі залежать від впливу факторів зовнішнього середовища. Адитивна генетична мінливість цих ознак складає від 2 до 50%. Природа генів, що лежать в основі цієї мінливості, вивчена погано. Крім того, зміна обмежуючих факторів середовища тягне за собою зміну спектру генів, що визначають фенотипічну мінливість ознак. Тим не менш, передбачається існування окремих ключових генів і груп зчеплених генів, які при будь-яких умовах додають свій внесок у формування кількісної ознаки.

Саме такі генетичні локуси необхідно розуміти під терміном «локуси кількісної ознаки» (ЛКО). *Локуси кількісної ознаки* – це генетичний локус, варіабельність якого на базі різних алелів веде до статистично значимих змін фенотипічного прояву ознаки. Необхідно відмітити, що за термінологією INTERBULL (<http://interbull2.slu.se/www/v1/>), **QTL – це локуси**, що впливають на фенотипічну варіацію ознак з безперервною мінливістю. До них належать такі відомі якості (ознаки) тварин, як удій, приріст, настриг вовни, плодючість, резистентність тощо. Важливо, що стійкість тварин до різних видів захворювань теж трактується як QTL.

Використовуючи молекулярно-генетичні методи, можна визначити відмінності між тваринами по багатьом ділянкам генома (сайтам). Їх можна розглядати як локуси генів-маркерів. Самі по собі вони, ймовірно, не являють QTL, але можуть бути зчепленими з ними. Тим самим стає можливим картувати QTL, генотипувати тварин і відбирати їх безпосередньо по генотипах, тобто в рамках традиційних програм селекції проводити сприяючий (уточнюючий та/або доповнюючий) відбір тварин за генетичними маркерами (MAS).

Перші молекулярні маркери були створені на основі аналізу білкового поліморфізму (біохімічні маркери). Використання декількох сотень біохімічних маркерів дозволило оцінити рівень генетичного поліморфізму більше 2000 біологічних видів (від мікроорганізмів до людини) і розробити основні теоретичні положення популяційної генетики. Тривалий термін досліджень дозволив виявити деякі обмеження в застосуванні білкових маркерів.

Аналіз білків дозволяє досліджувати поліморфізм тільки білок-кодуючих послідовностей і тільки у експресуючих генів. Якщо врахувати, що у вищих еукаріот усього близько 1% генома складають білок-кодуючі послідовності, то від уваги дослідників вислизає основна частина генома. При цьому з аналізу вилучаються такі функціонально-значущі ділянки, як промоторні області, енхансери, різні сайти регуляції, розташовані в інтронах, нетрансльованих



областях генів, а також поза генами, часто на значній відстані від кодуючої послідовності.

Перспективнішим представляється використання у якості маркерів системи поліморфних нуклеотидних послідовностей ДНК, що дозволяє тестувати генетичний поліморфізм безпосередньо на рівні генів, а не на рівні продуктів генів, як у разі використання методу білкового поліморфізму. ДНК-маркери дозволяють розв'язати проблему насичення генома маркерами і маркувати практично будь-які ділянки ДНК. Така маркерна система дає можливість використовувати для аналізу будь-які тканини і органи, незалежно від стадії розвитку організму і має цілий ряд переваг в порівнянні з іншими типами маркерів.

Відкриття і виділення рестрикційних ендонуклеаз (рестриктаз), які розщеплюють ДНК в ділянках зі строго певною послідовністю, дозволило розробити маркери на основі аналізу рестрикційного поліморфізму ДНК. Поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ, англ. RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism) вперше був використаний як генетичний маркер в 1974 р. при ідентифікації термочутливої мутації в геномі аденовірусу.

ПДРФ-аналіз зводиться до обробки ДНК рестриктазами з наступним електрофоретичним розподілом отриманої суміші і визначенням довжин отриманих фрагментів після блот-гібридизації із специфічним міченим зондом. Ендонуклеази мають строго специфічні місця розщеплення. Тому генетичні відмінності нуклеотидних послідовностей ДНК між індивідуумами (поліморфізм на рівні ДНК) приводить до різного розподілу сайтів рестрикції уздовж відповідних молекул ДНК і отримання продуктів рестрикції, в яких довжина гомологічних фрагментів буде різною. Таким чином, поліморфізм ДНК тестуватиметься як ПДРФ. Завдяки ПДРФ-маркерам були отримані результати для побудови молекулярно-генетичних карт багатьох видів рослин і тварин, накопичено достатньо відомостей про генетичний поліморфізм різних організмів, виявлені асоціації з QTL. Перевагою цього типу маркерів є висока відтворюваність результатів, а також кодомінантний тип наслідування. ПДРФ-локуси можуть мати множинні алелі, що значно підвищує їх інформативність.

Другий вид білкових маркерів – *мінісателіти*. Це тандемні повтори з довжиною періоду від 6 до 100 п.н. Такі повтори, що входять до складу структурного гена, можуть обумовлювати повтори в білках і білковий поліморфізм. ДНК-фінгерпринт (синонім – "дактилоскопія генома") дозволяє досліджувати поліморфізм безлічі локусів повторюваних послідовностей (мультилокусний аналіз). Аналіз проводиться тим же способом, що й у разі ПДРФ, але як специфічний гібридизаційний зонд використовуються мінісателіти. Потужним поштовхом для створення нових типів ДНК-маркерів став винахід полімеразної ланцюгової реакції. Метод ампліфікації *in vitro*



дозволяє швидко і з невеликими витратами матеріальних ресурсів і часу отримати більше 10 мільйонів копій певної послідовності ДНК. Різні модифікації методу ПЛР лягли в основу створення різноманітних типів ДНК-маркерів, широко використовуваних нині в різних областях біології і медицини.

*Розглянемо найбільш відомі:*

**ПЦР-ПДРФ.** Цей метод відноситься до ферментативних методів аналізу SNPs і аналогічний методу ПДРФ, але в його основі лежить використання ПЛР. Рестрикції (однією або декількома рестриктазами) в цьому випадку піддаються продукти ампліфікації, а не ДНК генома. Завдяки простоті і надійності метод набув широкого поширення і досі використовується для аналізу алельного поліморфізму генів у самих різних об'єктів. Обмеженням методу є те, що з його допомогою можна тестувати тільки відомі мутації, що зачіпають сайти рестрикції. У зарубіжних публікаціях широко використовується термін CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) – рестрикційний поліморфізм ампліфікованих послідовностей. CAPS-маркери вважаються вторинними маркерами, оскільки праймери для них створюються після виявлення SNP на основі аналізу нуклеотидної послідовності.

Методи детекції на основі ПЦР-ПДРФ досить дешеві, тому що ціна залежить тільки від ціни рестриктази, не вимагає високої кваліфікації персоналу і дорогого устаткування. Обладнання стандартне для будь-якої ПЛР-лабораторії, що займається, наприклад, діагностикою інфекцій. Можливо типування вибірок до декількох сотень зразків і до 10-20 поліморфних маркерів. Вартість витратних матеріалів: 2-12 грн. на пробу на один поліморфний маркер. З недоліків необхідно зазначити досить значні затрати часу – більше 6-8 годин до отримання результату, низька продуктивність, відсутність можливості автоматизації.

**Алель-специфічна ПЛР.** Алельні варіанти розрізняються за рахунок того, що 3'-кінцевий нуклеотид одного з праймерів гібридується безпосередньо з варіабельним нуклеотидом (позиція SNP), що обумовлює наявність або відсутність ПЛР. Специфічність реакції можна підвищити, вводячи додатковий, не спарений нуклеотид в другій або третій позиції з 3'-кінця цього ж праймера або використовуючи конкуруючу ПЦР в тій же пробірці. AS-PCR широко використовується для типування окремих алелів генів, або груп алелів, що несуть однакові мотиви, наприклад, при вивченні асоціацій, алелів VoLA DRB3 з лейкозами ВРХ.

Одним з основних положень про імунний статус є наявність в організмі природних генетично детермінованих маркерів, по яких можна визначати і прогнозувати майбутню реактивність біологічної особини. До таких маркерів відносяться антигени гістосумісності МНС-системи та алелі гена VoLA DRB3.

Відомо декілька робіт, в яких автори намагаються поєднати обидва типи маркерів для встановлення значимих асоціацій з резистентністю до

захворювання. Однак, дані роботи, спрямовані тільки на виявлення маркерів. Без уваги залишається питання взаємного аналізу їх зв'язку з хворобами, і саме головне, можливість доповнення інформації отриманої за допомогою одних маркерів іншими. В цьому випадку не використовується можливість підвищення точності результатів типування тварин, особливо при вивченні багатфакторних захворювань, таких як мастити.

На сьогодні в селекції із залученням ДНК-маркерів застосовують два основних методи. Перший, як вже згадувалось вище - маркер-асоційована селекція. Це підхід, який дозволяє проводити відбір за генотипом, використовуючи ДНК-маркери, які тісно зчеплені із бажаним геном. Метод MAS-селекції добре себе зарекомендував при беккросній та лінійній селекції, а також при створенні пірамід генів.

Процес запровадження ДНК-маркерів у MAS-селекцію вимагає проведення цілої низки заходів. По-перше, необхідно виділити спектр генів-кандидатів, які можуть слугувати в якості молекулярно-генетичних маркерів QTL та розробити тест-системи для аналізу їхнього алельного поліморфізму. Далі слід визначити частоти зустрічання алельних варіантів даних генів у різних порід сільськогосподарських тварин та провести кореляційні дослідження. Тільки після цього можна оцінити ефективність використання даних генетичних маркерів у селекційному процесі.

Так, загальноприйнятими ДНК-маркерами молочної продуктивності ВРХ вважаються гени, що приймають участь у формуванні якісного складу молока, а саме гени  $\kappa$ -казеїну (CSNK),  $\beta$ -лактоглобуліну (BLG) і  $\alpha$ -лактальбуміну ( $\alpha$ -LA), а також гени, що контролюють кількісні характеристики молочної продуктивності, такі як надій, жирномолочність і білкововмісність (гіпофізарний фактор росту-1 (Pit-1), гормон росту (GH), рецептор гормону росту (GHR), пролактин (PRL), інсуліноподібний фактор росту-1 (iGF-1), тощо).

Щодо маркування ознак м'ясної продуктивності ВРХ, то сюди відносять декілька маркерних генів, що пов'язані з метаболізмом ліпідів - тіреоглобулін (TG5), діацилгліцерол О-ацилтрансфераза (DGAT), лептин, міостатин, калпаїн і калпастатин.

Другий метод сучасної селекції, це метод геномної селекції (genomic selection). Метод геномної селекції дозволяє проводити відбір за генотипами навіть за відсутності даних про гени, що впливають на корисну ознаку, за рахунок використання рівномірно розподілених по геному ДНК-маркерів [90]. Розвиток даного підходу став можливим за рахунок зниження собівартості секвенування нуклеотидних послідовностей і стрімкого розвитку методів високопродуктивного секвенування. Секвенування та порівняння геномів різних представників того ж самого виду дозволяє виявляти поліморфні ділянки геному та розробляти маркери, які рівномірно і щільно вкривають геном. Як правило, це

SNP маркери. На сьогодні вже існують повногеномні SNP-чипи для автоматичного аналізу поліморфізму ДНК. Даний підхід вже успішно застосовується для деяких видів сільськогосподарських тварин та рослин. Не так давно з'явилась перспектива використання методу геномної селекції також для організмів, геном яких ще повністю не відсеквеновано або навіть не вивчено. Такої можливості надав інший підхід - високопродуктивне генотипування за допомогою DaT-маркерів. Останній тип маркерів не вимагає наявності даних щодо первинної послідовності НК організму.

Як перший, так і другий типи селекції засновані на використанні ДНК-маркерів та відбору за генотипом, але між ними існує і принципова різниця. Оскільки для застосування методу генної селекції не потрібна вихідна інформація щодо генів, які впливають на бажану ознаку, це значно прискорює селекційний процес. Крім того, геномна селекція має перевагу при відборі за ознаками, що мають складний полігенний контроль, в той час як MAS-селекція, як правило, ефективна лише у випадку моно- або олігогенного контролю ознак. Але якщо під час геномної селекції виникне небажана коселекція ознак, уникнути додаткових генетичних досліджень, подібних тим, що потрібні для MAS-селекції, не вдасться.

Геномну селекцію можна поділити на три етапи: «training generations» аналіз за використання методів фенотипування та генотипування, виявлення кореляцій між фенотипом і генотипом, подальший відбір за генотипом «selection candidates». Необхідною умовою проведення геномної селекції є достатня кількість «тренувальних» поколінь та ДНК-маркерів, а також правильне співвідношення числа маркерів і досліджуваних генотипів.

Найбільші програми з геномної селекції сільськогосподарських видів тварин (ВРХ, свині) проводилися в Нідерландах (TOPIGS), Франції (INRA), Казахстані (КазАгроІнновация), Данії і Швеції (VikingGenetics), Німеччині і Австрії (LFL-LGL-ZuchtData), а також ряді компаній у США. Економічну вигоду від геномної селекції важко переоцінити. Так, геномна селекція ВРХ дозволяє заощадити близько 92% коштів при проведенні заходів з оцінки биків-плідників та скоротити час оцінки з 6 років до 21 місяця.

### ***Контрольні запитання***

1. Що таке генетичний маркер?
2. Назвіть два напрями, засновані на використанні методів молекулярної генетики в селекції.
3. Маркери на основі аналізу рестрикційного поліморфізму ДНК.
4. Що таке мінісателіти?
5. Назвіть ДНК-маркерами молочної продуктивності ВРХ.
6. Назвіть ДНК-маркерами м'ясної продуктивності ВРХ.

## ТЕМА 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ДІАГНОСТИКА ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

*Анотація:* У розділі розкрито методи для експрес-діагностики вірусної інфекції, які дозволяють виявляти у біологічному матеріалі збудника, особливості реакцій радіоімунного аналізу (PIA), імуофлюоресценції (PIФ) та імуоферментного методу, наведено приклад тест-систем для виявлення збудників антропозоонозів

Особливості ведення сучасного сільського господарства у світовому масштабі призвели до виникнення низки нових проблем. Широкий обмін генетичним матеріалом між різними країнами та континентами супроводжується поширенням не тільки генетичних захворювань (BLAD, DUMPS, AHQS), але й різних інфекційних агентів (губчаста енцефалопатія ВРХ, лейкоз ВРХ, африканська чума свиней). У деяких випадках спостерігається дуже висока швидкість розповсюдження генетичних мутацій, вірусів та бактерій. Великі економічні збитки, що виникають під час поширення спадкових та інфекційних хвороб, призводять до необхідності запровадження суворого контролю щодо сільськогосподарських видів тварин.

До цього часу епізоотична ситуація в країнах ближнього і далекого зарубіжжя залишається напруженою, а небезпека потрапляння збудників різних хвороб до країни різко зросла, серед іншого, через збільшення імпорту тваринницької продукції з інших країн. За багатьох особливо небезпечних і карантинних інфекцій епізоотична ситуація перебуває під контролем. Однак зберігається загроза потрапляння таких хвороб як ящур, нодулярний дерматит ВРХ, африканська чума свиней, везикулярна хвороба свиней, віспа овець і кіз, катаральна лихоманка овець, губчаста енцефалопатія ВРХ, хвороба Ньюкасла, грип птахів та ін.

На сьогодні серйозну проблему представляють такі захворювання тварин як сибірська виразка, сказ, класична чума свиней, хвороба Ауески, туберкульоз, бруцельоз, лейкоз, респіраторно-репродуктивний синдром свиней, сальмонельози, чума м'ясоїдних, хвороба Марека, мікотоксикози та ряд інших. Найвищий рівень захворюваності інфекційними хворобами відзначається в одній із основних галузей - скотарстві.

За останні 20 років показник захворюваності за деякими хворобами ВРХ зріс - ешерихіоз, сальмонельоз, пастерельоз, некробактеріоз, лейкоз, сказ. У той же час знизилась захворюваність туберкульозом, трихофітозом, бруцельозом; стабільно на низькому рівні залишається захворюваність сибірською виразкою і емкаром, ліквідовано ящур. Питома вага різних захворювань у загальній інфекційній патології ВРХ складає: лейкоз – 30-35 %, туберкульоз – 18-21 %,

бруцельоз – 6-10 %, некробактеріоз, ешеріхіоз і сальмонельоз – 9 %, пастерельоз – 5 %.

Серед захворювань свиней основне місце займають ешеріхіоз і набрякова хвороба (25 %), пастерельоз (9 %), дизентерія, сальмонельоз, респіраторно-репродуктивний синдром, бешиха. Продовжує становити небезпеку чума свиней, хоча захворюваність нею різко знизилась. Серед інфекційної патології у МРХ переважають такі як копитна гниль (до 50 %) і клостридіози (13 %), іноді реєструється бруцельоз. У коней частіше за все реєструється ринопневмонія, інфекційна анемія та правець. У цілому захворюваність коней інфекційними хворобами знижується.

На початку 2000-х років сильна епізоотія ящура спостерігалася у Великобританії серед ВРХ, МРХ, свиней і диких копитних. Більше 130 тис. тварин довелося знищити. Захворювання затронуло й ряд європейських країн, зокрема Францію, Нідерланди і Ірландію, однак завдяки інтенсивним протиепізоотичним заходам осередки вдалося досить швидко ліквідувати. У РФ протягом 1991-2000 рр. так само реєструвалися окремі випадки ящура. Стосовно України, з 1992 р. вона має офіційно визнаний статус Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин (МЭБ) країни, вільної від ящура без вакцинації.

Сибірку зареєстровано в багатьох країнах світу і практично на всіх континентах. У країнах СНД спалахи сибірки реєструвалися в РФ (2011-13, 2016, 2019 рр.), Білорусі (2019 р.), Киргизії (2012,2013,2018 рр.), Молдові (2013 р.), Таджикистані (2013 р.), Вірменії (2013 р.).

З початку 90-х р. ХХ ст. спостерігався стійкий ріст захворюваності на сказ. Ця інфекція належить до погано контрольованих. В Україні сказ зустрічається у всіх областях, реєструється до 1,5 тис. випадків на рік.

Віспа овець і кіз реєструється в 40 державах, у тому числі у 18 країнах в Азії, 14 в Африці, 5 у СНД. У Європі віспа зареєстрована в Болгарії й Греції. На території нашої держави ця хвороба історично не реєструється.

Незважаючи на багаторічні зусилля й вакцинацію худоби в неблагополучних зонах, бруцельоз як і раніше залишається проблемною інфекцією. За даними ВООЗ, у світі щорічно реєструється біля 500 тис. нових випадків бруцельозу людей. В Україні випадки бруцельозу серед людей є спорадичними. За період 1994-2011 рр. позитивний діагноз підтверджено у 30 осіб. За даними інформаційного бюлетеня МОЗ України, у 2012, 2013 рр. зареєстровано по 1 випадку серед людей. За даними Державного комітету ветеринарної медицини, останній випадок бруцельозу серед корів підтверджено у 1992 р., серед свиней – у 2008 р., серед диких тварин – у 2010 р.

Лейкоз ВРХ поширений у багатьох країнах світу. За інформацією МЭБ, захворювання продовжують реєструвати у США, Канаді, Росії, Японії, Німеччині, Болгарії, Хорватії, Литві, Польщі та ін. Україна впродовж останніх

шестидесяти років є країною неблагополучною щодо даного захворювання. І хоча на сьогодні епізоотію подолано, однак щорічно продовжують реєструватися спорадичні випадки інфекції ВЛ ВРХ, що вказує на збереженість джерел збудника інфекції та загрозу розвитку нової епізоотії.

Для експрес-діагностики вірусної інфекції найчастіше використовують методи які дозволяють виявляти у біологічному матеріалі вірусні антигени (білки вірусів), вірусні тільця-включення, віріони та вірусні гемаглютиніни. До класичних методів діагностики можна віднести метод вірусоскопії за допомогою світлового мікроскопа. Метод вірусоскопії відрізняється простотою техніки і швидкістю, але вимагає значного досвіду при оцінці отриманих результатів. Крім того від дієвий лише при діагностиці крупних вірусів (віспа), при інших інфекціях його не застосовують. Що стосується електронної мікроскопії, то її застосовують лише для вивчення тонкої морфології вже відомих вірусів.

На присутність певного вірусу у клінічному матеріалі вказує наявність вірусних білків, як у складі цілих вірусних часток, так і у вигляді обломків віріонів. Як і всякі білки, вірусні білки мають антигенні властивості. Більш того, вони обумовлюють антигенні властивості самого вірусу. Тому, маючи у своєму розпорядженні сироватку, що містять антитіла до певних вірусів, можливо виявляти у біоматеріалі антигени до цих вірусів за допомогою серологічних реакцій. Дуже добре себе зарекомендували радіоімунний аналіз (РІА), реакція імунофлюоресценції (РІФ) та імуноферментний метод аналізу (ІФА). Менш чутливими і специфічними є реакції зв'язування комплементу (РЗК) і дифузійної преципітації (РДП).

Особливість методу РІА полягає в тому, що сироватку з антитілами до певного антигену обробляють радіоактивним йодом. Мічену  $^{125}\text{I}$  сироватку наносять на препарат з досліджуваним матеріалом. Після відмивання неспецифічних антитіл, що не зв'язалися, препарат досліджують за допомогою лічильника радіоімпульсів або авторадіографа на рентгенівській плівці.

Метод РІФ заснований на виявленні антигенів збудника за допомогою специфічних сироваток, які мічені флюорохромами. В основі реакції лежить утворення специфічного комплексу антиген-антитіло, який виявляють за допомогою люмінісцентного мікроскопа. У цілому даний метод має такі переваги як поєднання точності мікроскопії зі специфічністю сірологічних реакцій; дозволяє виявляти самі мінімальні кількості антигенів або антитіл; вирізняється простотою техніки і швидкістю одержання результатів.

ІФА (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) відрізняється від попереднього методу аналізу тим, що сироватку кон'югують не флюорохромом, а такими ферментами як пероксидазою хрому або лужною фосфатазою. Раніше даним кон'югатом обробляли культури клітин, мазки, відбитки або зрізи дослідного матеріалу. Під час нанесення на препарат розчину субстрату

відбувалась зміна забарвлення, яке досліджувалось за допомогою світлового мікроскопа. Останніми роками в діагностиці набув популярності різновид даного методу - твердофазний ІФА. Його особливість полягає в тому, що досліджуваний матеріал у вигляді суспензії вноситься у лунки полістиролових планшетів, які попередньо були сенсibiliзовані гамма-глобулінами з антитілами до досліджуваного антигену. Інтенсивність забарвлення визначається за допомогою рідера або спектрофотометра. Даний підхід дозволив автоматизувати процес і довести продуктивність досліджень до 2000 зразків на годину.

Інший підхід в діагностиці вірусних інфекцій - це визначення вірусної нуклеїнової кислоти. Сюди відноситься метод ДНК (або РНК)-зондів. Даний метод засновано на реакції гібридизації нуклеїнових кислот - здатності односпіральних комплементарних ланцюгів ДНК або РНК формувати двоспіральні структури. Реакція може протікати між комплементарними молекулами типу: ДНК/ДНК, ДНК/РНК, РНК/РНК. Зонд являє собою нуклеотидну послідовність обмеженого розміру, що комплементарна певній ділянці вірусного генома. Зонд мітять за допомогою радіоактивного фосфору  $^{32}\text{P}$ , біотину або флуороресційного барвника, що дає змогу його ідентифікувати, а відповідно й детектувати вірусну нуклеїнову кислоту, з якою він з'єднався під час молекулярної гібридизації. До переваг методу можна віднести його високу чутливість і специфічність, відносну швидкість аналізу, універсальність, відсутність необхідності стерильної роботи. Недоліки полягають у певних технологічних труднощах під час одержання зонду, крім того, заміна мітки на більш безпечну нерадіоактивну призводить до зниження чутливості більше ніж в 10 разів. Слід зазначити, що на сьогодні даний метод практично повністю витиснутий з діагностичної практики полімеразною ланцюговою реакцією.

Останні десятиліття велика увага приділяється розробці ПЛР діагностиків, що застосовуються в області інфекційних захворювань тварин. Простота постановки, висока чутливість, добра відтворюваність швидко перетворила цей метод в один з найбільш перспективних діагностичних інструментів. До основних переваг застосування методу ПЛР у діагностиці інфекційних хвороб можна віднести наступне: безпосереднє визначення збудника інфекції, швидкість одержання результату, можливість кількісного аналізу, висока чутливість і специфічність, можливість роботи з будь-яким біологічним матеріалом, одночасний аналіз декількох мішеней (патогенів), можливість повної автоматизації.

Застосування молекулярно-генетичних методів в діагностиці збудників інфекційних хвороб є актуальним напрямком сучасної мікробіології, генетики, біотехнології та цілої низки прикладних ветеринарних наук. Метод ПЛР на сьогодні вважається «золотим стандартом» молекулярної діагностики. Застосування методів молекулярної діагностики для виявлення збудників

інфекційних хвороб дуже тісно пов'язане з їх типуванням, виявленням поліморфізму генів, встановленням геному патогенних штамів, можливістю клонування генів і створення генно-інженерних вакцин.

Практична ПЛР-діагностика знайшла своє застосування в закладах медичного, ветеринарного та сільськогосподарського профілю. Метод ПЛР використовується не тільки для виявлення патогенів, але також для визначення антибіотикорезистентності, контролю динаміки інфекційного процесу, оцінки ефективності схем лікування. З кожним роком з'являються все нові модифікації методу ПЛР (SybrGreen, TaqMan, Scorpion), удосконалюється відповідне устаткування. Так, на сьогодні провідні фірми-виробники ампліфікаторів для проведення Real-Time PCR (Applied Biosystems, Bio-Rad, Qiagen) позиціонують прилади, що дозволяють виконувати одночасну детекцію до п'яти мішеней.

На теперішній час в області ветеринарної медицини вже розроблено тест-системи для діагностики методом ПЛР таких захворювань як туберкульоз, сибірська виразка, лейкоз, чума ВРХ, сказ, ящур, бруцельоз, кампілобактеріоз, лістеріоз, сальмонельоз, стафілококоз, хламідіоз, класична та африканська чума свиней, респіраторно-репродуктивний синдром свиней, трансмісивний гастроентерит свиней, хвороба Ауескі, везикулярна хвороба свиней, парвовірусна інфекція свиней, мікоплазмоз, хвороба Марека, реовірусна інфекція, хвороба Ньюкасла, нодулярний дерматит ВРХ і багатьох інших.

Але спектр інфекційних хвороб постійно поповнюється за рахунок раніше невідомих (вірусні лихоманки Ласса, Ебола, Марбург, хантавірусний легеневий синдром, коронавірусна інфекція COVID-19) та етіологічної розшифровки захворювань, що раніше вважалися неінфекційними (хронічні гепатити, лімфома Беркітта, саркома Капоші). На сьогодні не менш 300 відомих вірусів людини та тварин, що відносяться до 51 роду та 30 родин, здатні викликати пандемії (грип А, SARS-CoV-2, віспа, поліомієліт), епідемії (гарячка денге, західного Нілу), епідемічні спалахи (гепатити, сказ, АЧС) та спорадичні захворювання. Тому сьогодні як ніколи вкрай важливим є розвиток сучасної біотехнології, генної інженерії та молекулярно-генетичних методів діагностики.

### ***Контрольні запитання***

1. В чому полягає особливість методу РІА?
2. На чому заснований метод РІФ?
3. Чим відрізняється ІФА від РІФ?
4. Поясніть метод ДНК (або РНК)-зондів.
5. Назвіть захворювання, для яких розроблено тест-системи для діагностики методом ПЛР.



## ТЕМА 6. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІ КУЛЬТУРИ, МЕТОДИ І ПІДХОДИ ЩОДО ДІАГНОСТИКИ ГМО (ГМР)

*Анотація:* У розділі розкрито поняття про трансгенні організми, розвиток генетичної інженерії та створення за її допомогою генетично модифікованих (ГМ) сільськогосподарських культур, культивування біотехнологічних культур у світі, регулювання використання ГМО в Україні, розроблення методів визначення ГМО на основі ДНК-аналізу, дослідження вмісту ГМО методом ELISA

Протягом майже двох десятиліть, що пройшли з початку тисячоліття, світова потреба в продовольстві неухильно росте на тлі збільшення чисельності населення, рекордних урожаїв, підвищення рівня доходів і все більшої розмаїтості раціону харчування. Зростання виробництва продуктів харчування дещо відстає від стрімко зростаючого попиту на продовольство. За оцінками ООН, смерть від голоду загрожує 10 % населення світу, а кількість людей, що страждає від хронічного недоїдання, постійно збільшувалася, починаючи з 2015 року і досягла 821 млн чоловік у 2018 році. Глобальна фінансова криза 2008-2009 років завдала серйозного удару по продовольчій безпеці багатьох держав.

Згідно даних Доповіді про продовольчу безпеку й харчування у світі за 2019 рік, у багатьох країнах із середнім доходом, що зазнали сповільнення економічного росту, збільшилася кількість голодуючих. За постійного зменшення площ орних земель на особу та повторюваних економічних кризах у різних країнах збільшувати виробництво продовольства стає дедалі важче.

Розвиток генетичної інженерії та створення за її допомогою генетично модифікованих (ГМ) сільськогосподарських культур відкриває нові можливості для виживання людини у змінюваних середовищних умовах та за збіднення біоресурсів. Потенціал сучасної молекулярної генетики та біотехнології в умовах світової економічної кризи є надзвичайно великим.

Науковим досягненням, зокрема генетичній інженерії, належить важлива роль на шляху вдосконалення сільськогосподарського виробництва. За своєю суттю генетична інженерія продовжує напрям традиційної селекції з поліпшення генотипу господарсько цінних рослин, але при цьому використовуються сучасні методи, які значно скорочують процес отримання рослин з заданими ознаками і властивостями.

Успішне використання методів генетичної інженерії в селекційно-генетичних роботах з поліпшення сільськогосподарських рослин залежить передусім від можливості ізолювання генів, що контролюють задані господарсько-корисні ознаки.

Велика частина таких ознак успадковується полігенно. На сьогодні в різних галузях народного господарства використовують штами бактерій, грибів, дріжджів, клітинні лінії рослин і тварин, сорти рослин, отримані з використанням генно-інженерних прийомів. Змінені таким чином багатоклітинні організми називають «трансгенними» або генетично модифікованими.

**Трансгенні організми** – це рослини, тварини, риби, інші живі об'єкти, які мають у геномі генетичну інформацію, введену за допомогою методів генетичної трансформації. Поява трансгенних організмів пов'язана як з розвитком методів власне генетичної інженерії, технологій рекомбінантних ДНК, так і з розробленням методів введення реконструйованої ДНК в живі клітини і регенерації з них фізіологічно нормальних об'єктів. З моменту перших публікацій про одержання трансгенних еукаріотних організмів пройшло майже 40 років. Нині існує ряд міжконтинентальних комерційних фірм, основною метою яких є одержання трансгенних організмів з новими корисними властивостями.

Комерціалізація біотехнологічних сільськогосподарських культур / генетично модифікованих рослин (ГМР) відбувається вже майже 25 років. На 2018 р. генно-модифіковані культури вирощували у 26 країнах світу на площі 191,7 млн га. Це еквівалентно 12,8 % загальної світової площі під сільськогосподарськими культурами, яка становить 1,5 млрд га та приблизно у 113 разів більше порівняно з 1996 р. (1,7 млн га). Такі дані наводить галузева неурядова Міжнародна служба з моніторингу за застосуванням агробіотехнологій (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications – ISAAA).

З 26 країн, що культивували ГМ рослини у 2018 р., 21 належить до країн, що розвиваються та 5 до промислово-розвинених країн (рис. 1). В країнах, що розвиваються, розташовано 54% (103,5 млн. га) площ, відведених під біотехнологічні культури порівняно з 46% в промислових країнах. Ще 44 країни, з яких 26 - країни ЄС, офіційно імпортували біотехнологічні культури для виробництва харчової продукції, кормів або переробки. Таким чином, 68 країн світу в той або інший спосіб використовували біотехнологічні культури.

Найбільші посівні площі відведено під чотири основні біотехнологічні культури, а саме сою, кукурудзу, бавовник та ріпак. Біотехнологічна соя займає 78% від загальних посівних площ в світі, відведених під дану культуру. Відповідно біотехнологічний бавовник займає 76%, кукурудза 30%, ріпак 29%. Соєві боби вирощують на 95,9 млн га, що становить 50% від загальної площі, відведеної під біотехнологічні культури у 26 країнах світу. Далі йдуть кукурудза (58,9 млн га), бавовник (24,9 млн га) та ріпак (10,1 млн га) (рис. 2).

США була лідером з насаджень біотехнологічних культур у 2018 (75 млн га), далі Бразилія (51.3 млн га), Аргентина (23.9 млн га), Канада (12.7 млн га) та

Індія (11.6 млн га). Так, загальний обсяг біотехнологічних насаджень становив 174.5 млн га, що складає 91% загальної площі. Отже, культивування біотехнологічних культур принесло користь для більш ніж 1.95 білліона людей у п'яти країнах світу або 26% поточного світового населення у 7.7 білліонів.

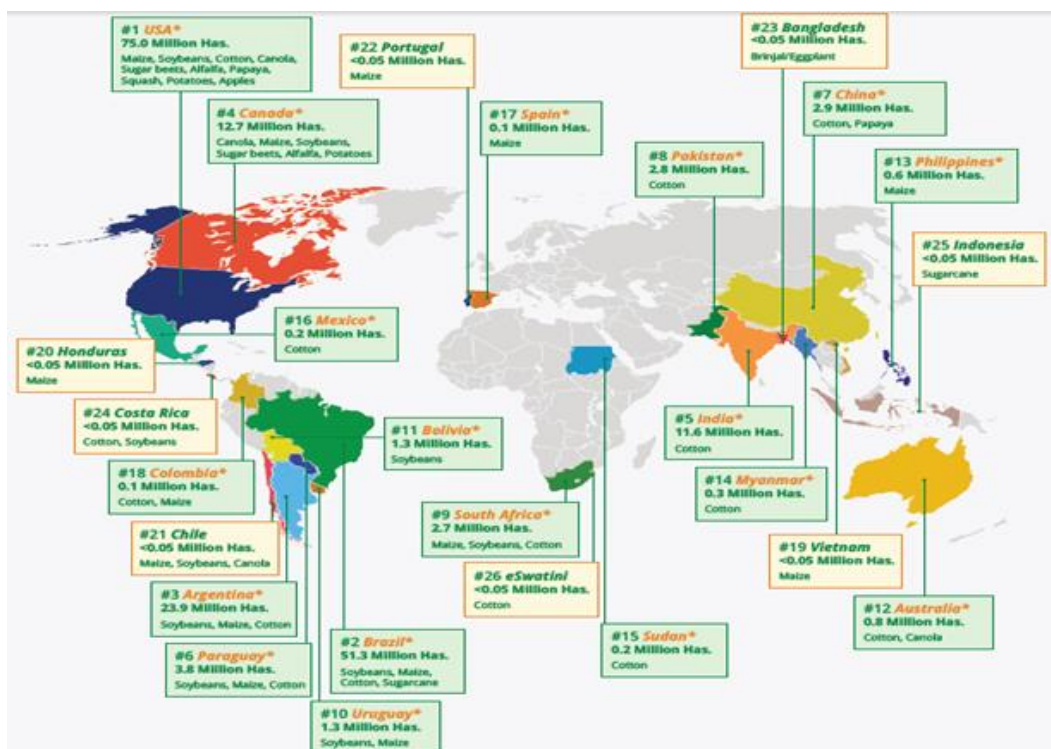


Рис. 1. Культивування біотехнологічних культур у світі. Кольором позначено 26 країн, які у 2018 році вирощували ГМР.

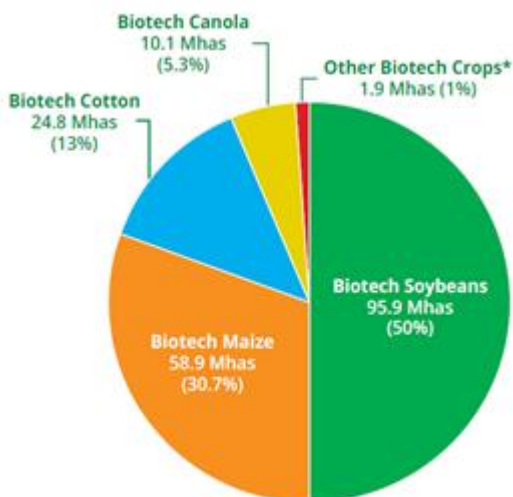


Рис. 2. Площі, на яких оброблялись основні ГМР у 2018 р. та їхній % від загальної площі, відведеної під біотехнологічні культури у світі. \* До інших культур належать: цукровий буряк, картопля, яблука, сквош, папайя та баклажани.

Зростання на 4% площ, відведених під культури з комбінованим типом ознак, які зчеплені зі стійкістю до комах та гербіцидів (42% від загальної площі), є доказом дотримання фермерами практики розумного сільського господарства з використанням інсектицидів не у великій та не в зменшеній кількості.

Гербіцидотолерантність у соєвих бобах, ріпакові, кукурудзі, люцерні, і бавовнику послідовно стає домінантною ознакою, котра у 2018 займала 46% загальної площі – зменшилась на 1% порівняно з 2017.

Переважає більшість оброблюваних у світі біотехнологічних культур представлена ГМО першого покоління, які характеризуються стійкістю до гербіцидів, комах, вірусів. Перше покоління ГМ рослин було створене для того, щоб підвищити якість та ефективність сільськогосподарського виробництва. На сьогодні вже розроблені та починають запроваджуватися ГМО другого покоління, які безпосередньо споживаються людьми у вигляді продуктів харчування. До другого покоління ГМ рослин належать рослини із вбудованими вакцинами і вітамінами, які повинні насамперед сприяти покращенню здоров'я людини (ГМ дерева, фрукти та овочі із затримкою дозрівання та збільшеним терміном зберігання, амілопектинова картопля Amflora, «золотий рис»). Проте як і у випадку з першим поколінням ГМО, дослідники з тривогою намагаються визначити чи є результати їхніх досліджень безпечними для людей та навколишнього середовища. Сьогодні у біотехнологічних лабораторіях ведуться активні роботи щодо розробки ГМО третього покоління. За прогнозами, культури третього покоління, крім наведених вище характеристик, матимуть змінені час квітування і плодоношення, розміри, форму і кількість плодів, підвищену ефективність фотосинтезу, вироблятимуть речовини з підвищеним рівнем асимілювання, а також фармацевтичні матеріали (гормони зростання, чинники згортання крові, індустриальні ензими, людські антитіла, контрацептивні білки, що пригнічують імунітет, цитокіни і таке інше).

Однак незважаючи на вже існуючі досягнення та багатообіцяючі перспективи на майбутнє, існує й цілий ряд ризиків та побоювань щодо безпеки використання ГМО. Такі ризики можна поділити на три основні групи: харчові, що пов'язані з небезпекою використання ГМО у продуктах харчування; екологічні, пов'язані з небезпеками впливу трансгенних рослин на довкілля та соціально-економічні – руйнування національної системи насінництва по стратегічно важливих культурах. Оскільки вірогідність появи будь-яких наслідків залежить від масштабів та тривалості використання, у багатьох країнах світу здійснюється контроль за обігом ГМО, який передбачає реєстрацію нових ГМО, пост-реєстраційний контроль та маркування харчових продуктів, виготовлених за їх допомогою.

Україна нині посідає провідні позиції в світі як виробник та експортер зернових культур, а також має великий потенціал розвитку виробництва харчової

продукції. Вкрай важливим та актуальним є створення ефективної та прозорої системи регулювання обігу та використання ГМО в країні. Чинне законодавство України у цій галузі є досить об'ємним, таким що відповідає міжнародним стандартам, але водночас недосконалим і тому потребує значного доопрацювання.

Регулювання використання ГМО в Україні забезпечує низка законодавчих актів, основними серед яких є закони: «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів», «Про охорону навколишнього природного середовища», «Про захист прав споживачів», «Про дитяче харчування», «Про якість та безпеку харчових продуктів та продовольчої сировини», «Про основні засади (стратегію) державної екологічної політики України на період до 2030 року».

Крім законів існує низка Постанов Кабінету Міністрів щодо генно-інженерної діяльності та ГМО, зокрема «Про затвердження тимчасових критеріїв безпеки поводження з генетично модифікованими організмами та провадження генетично-інженерної діяльності у замкненій системі», «Про затвердження Порядку видачі дозволу на ввезення на митну територію України незареєстрованих генетично модифікованих організмів для науково-дослідних цілей або державних апробацій (випробувань)», «Про затвердження Порядку видачі дозволу на транзитне переміщення незареєстрованих в Україні генетично модифікованих організмів», «Про затвердження Порядку видачі дозволу на проведення державної апробації (випробування) генетично модифікованих організмів у відкритій системі», «Про затвердження Порядку державної реєстрації генетично модифікованих організмів джерел харчових продуктів, а також харчових продуктів, косметичних та лікарських засобів, які містять такі організми або отримані з їх використанням», «Про затвердження Порядку етикетування харчових продуктів, які містять генетично модифіковані організми або вироблені з їх використанням та вводяться в обіг».

Натепер в Україні затверджено серію національних стандартів ДСТУ ISO, які регламентують загальні вимоги до випробувальних та калібрувальних лабораторій, обладнання та методів визначення генетично модифікованих організмів, їх похідних та продуктів з їхнім вмістом.

Відповідно до Закону України № 1778-VI Про внесення змін до Закону України «Про безпечність та якість харчових продуктів» щодо інформування громадян про наявність у харчових продуктах генетично модифікованих організмів (ГМО), який набрав чинності 30.12.2009 р., в Україні введено обов'язкове маркування продукції щодо вмісту або відсутності ГМО. Однак відповідно до Регламентів (ЄС) № 1829/2003, № 1830/2003 Європейського Парламенту і Ради від 22.09.2003 «Про генетично модифіковані продукти

харчування і корми» та «Про можливості контролю та етикетування генетично модифікованих харчових продуктів та кормів», обов'язковому маркуванню підлягають лише ті харчові продукти, які виготовляються з ГМ сировини рослинного походження, або містять інгредієнти, що виробляються з ГМ-сировини. З метою недопущення невинуватих витрат суб'єктів господарювання та приведення національного законодавства у відповідність з європейським, Міністерством економічного розвитку і торгівлі разом з Міністерством охорони здоров'я було розроблено та затверджено «Перелік харчових продуктів, щодо яких здійснюється контроль вмісту генетично модифікованих організмів», який набрав чинності 30.12.2010 р. Основою будь-якої технології виявлення ГМО є використання відмінностей між немодифікованими сортами рослин та генетично зміненими (трансгенними) аналогами, що може здійснюватись шляхом детекції нової ДНК, яку було введено шляхом біотехнологічних маніпуляцій, або *de novo* експресованого білка.

Затвердження нового методу аналізу є важливим етапом як для випробувальних лабораторій, так і для контролюючих організацій. В ідеалі, кожен метод повинен бути апробований певною кількістю лабораторій з висококваліфікованим персоналом для підтвердження його відтворюваності та повторюваності, встановлення чутливості та одержання специфічного результату. Об'єднаний науковий центр Європейської Комісії (Joint Research Centre, JRC) першим затвердив метод ELISA для аналізу сільськогосподарської сировини на вміст біотехнологічної сої Roundup Ready® та метод ПЛР для визначення сої Roundup Ready® і кукурудзи лінії Bt-176 як у сировині, так і в харчових продуктах, що зазнали термічної обробки. З того часу перелік розроблених та затверджених методів та підходів щодо визначення ГМО значно розширився завдяки постійному конструюванню і впровадженню дедалі нових біотехнологічних ліній та культур.

Одним із критичних моментів під час виявлення ГМО та визначення його кількісного вмісту як для методів на основі ДНК-аналізу, так і аналізу білків, є пробопідготовка зразків. При цьому важливо враховувати не тільки обмеження кожного з етапів пробопідготовки, але й специфіку аналізу. Також на кінцевий результат суттєво впливає розмір зразка та процедура його відбору. Не менш важливим етапом розроблення методів визначення ГМО на основі ДНК-аналізу є оптимізація процедури екстракції ДНК. Це пов'язано передусім з тим, що по-перше, зразки харчової продукції містять достатньо високу кількість інгібуючих агентів, а по-друге, переважна більшість з них зазнає термічної обробки.

Сьогодні існує низка підходів щодо визначення трансгенних організмів, однак найпоширенішими є два, зокрема імуноферментний метод та метод полімеразної ланцюгової реакції. Імуноферментний метод (ІФА, ELISA –

Enzyme-linked immunosorbent assay) включає тестування на присутність специфічних білків з використанням специфічного зв'язування між експресованим антигеном та антитілом. Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, PCR – Polymerase chain reaction) оснований на детекції послідовностей ДНК, введених у дану культурну рослину. Ці методи можуть бути використані як для проведення якісного аналізу, показуючи наявність або відсутність ГМО, так і для визначення кількісного (відсоткового) вмісту ГМО у досліджуваному зразку.

У методах тестування, основаних на аналізі білків, використовують специфічну реакцію антиген-антитіло, яка дає змогу визначати бажаний білок. За допомогою методу ІФА можна не тільки виявляти білок, але й вимірювати його кількісний вміст у досліджуваному зразку, який містить безліч інших білків. У методі ІФА використовують одне антитіло для зв'язування специфічного білка, інше антитіло – для посилення ефекту детекції (необов'язковий етап), а також антитіло, кон'юговане з ферментом, продукт якого дає забарвлення, що забезпечує візуалізацію присутності білка та можливість його кількісного визначення. Кількісне визначення здійснюється за рахунок порівняння інтенсивності забарвлення досліджуваного зразку з інтенсивністю забарвлення калібрувальної кривої, побудованої за стандартними зразками.

Імуноферментний метод вимагає наявності навченого персоналу, спеціального устаткування та ретельного виконання всієї процедури тесту. Це метод середньої складності, тривалість аналізу становить від 2 до 8 годин. Порівняно з методами ДНК-аналізу метод ELISA характеризується меншою чутливістю і водночас меншою здатністю до хибно-позитивних результатів, що виникають завдяки низьким концентраціям домішок. Розроблення та виробництво тест-систем на основі методу ELISA є більш витратним за рахунок одержання нових антитіл та стандартів білків, але в подальшому собівартість одного аналізу є нижчою порівняно з методом ПЛР. До недоліків цього методу можна віднести неможливість розпізнавання різних моделей експресії та видів трансгенних подій, які характеризуються експресією білків, близьких за характеристиками. Тестування методом ELISA є практичною та ефективною процедурою, коли йдеться про визначення цільового білка. Однак у деяких випадках продукт трансгена може продукуватися тільки на певних стадіях розвитку, або в певних частинах рослини, і тоді за допомогою методу ELISA визначити ГМО досить складно. Крім того, білки легко руйнуються під впливом високої температури та тиску, що робить досить проблематичним, а часом просто неможливим, застосування методу ELISA для визначення ГМО в харчовій продукції, що зазнала термічної обробки.

Аналітичні методи, основані на технології ПЛР, дедалі більше застосовують для детекції послідовностей ДНК, пов'язаних з ГМО. Метод ПЛР

дає можливість селективно ампліфікувати (множити) специфічні ділянки ДНК, які представлені в невеликій кількості в складній суміші інших послідовностей ДНК. Отримані фрагменти ДНК (амплікони) піддаються подальшому дослідженню за допомогою гель-електрофорезу або детектора випромінювання флуоресценції у випадку ПЛР у реальному часі для виявлення присутності бажаної послідовності. Розроблено численні методи на основі ПЛР, які можуть виявляти та визначати кількісний вміст ГМО в харчових продуктах та сировині рослинного походження. Крім того, визначення генетичної ідентичності дає змогу використовувати даний метод для сегрегації та відстеження просування ГМ-культур ланцюгом «від лану до столу».

ПЛР є лабораторною методикою, яка вимагає наявності кваліфікованого персоналу та спеціалізованого устаткування. До ключових характеристик ПЛР-діагностики можна віднести високу чутливість та специфічність, здатність визначення навіть однієї копії гена в генетичному матеріалі цілого організму. Така висока чутливість водночас має свої недоліки, оскільки може призводити до отримання хибно-негативних результатів. Даний метод не вимагає тривалої підготовки реагентів порівняно з імунологічним методом аналізу. Аналіз зразків займає приблизно один-два дні. Метод ПЛР дає змогу розрізняти різні типи генетичних модифікацій (трансформаційних подій) та встановлювати кількісний вміст ГМО у досліджуваному зразку.

Зазначене вище засвідчує той факт, що в практиці визначення ГМО обидва методи – ELISA і ПЛР – доцільно розглядати як ті, що доповнюють один одного, а не взаємо виключають.

### *Контрольні запитання*

1. Що таке трансгенні організми?
2. На сучасному етапі розвитку назвіть країни, що культивують ГМО (ГМР).
3. Назвіть біотехнологічні культури, під які відведено найбільші посівних площ.
4. Яка країна є лідером з насаджень біотехнологічних культур?
5. Для чого було створене перше покоління ГМ рослин?
6. Які рослини належать до другого покоління ГМР. В чому їх відмінність від ГМР першого покоління?
7. На сьогодні вміст яких ГМО досліджує метод ELISA?
8. На чому базується ПЛР для визначення ГМО?



## ТЕМА 7. МІКРОСАТЕЛІТНІ ЛОКУСИ В ДОСЛІДЖЕННЯХ ГЕНОФОНДІВ СОБАК

*Анотація:* У розділі розкрито мікросателітні локуси ДНК, які найчастіше застосовуються для ідентифікації та експертизи достовірності походження особин в собаківництві, ефективність використання 20 мікросателітів для генотипування собак, пояснено як застосування мікросателітів полегшило визначення ступеня консолідованості порід та розроблення планів розведення

Індивідуальна та популяційна оцінка генетичної структури собак за мікросателітними локусами ДНК, які є одними з найполіморфніших ділянок ДНК, з десятками алелів в кожному локусі та високими темпами мутацій, наразі є найактуальнішою. Оскільки мікросателітні локуси є селективно-нейтральними, вони не піддаються дії природнього відбору. Комбінація алелів таких локусів є унікальною характеристикою кожної особини.

Особливий інтерес до вивчення генетичної структури порід собак, який спостерігається протягом останніх десятиріч, зумовлений не лише тим, що це один з найраніше доместикованих видів тварин, що за деякими даними відбулось більше 14000 років тому, а й тим, що вони зазнали, мабуть, найбільшого впливу з боку людини. Що робить даний вид одним з найцікавіших об'єктів для вивчення генетичного різноманіття.

Світова кінологічна організація (WCO) визнає близько 400 порід, деякі з яких, такі як шар-пей, пекінес, чау-чау та тибетський мастиф є дуже давніми. При чому, згідно даних одержаних Д. Хартлом та А. Кларком, величезна фенотипова різноманітність собак зобов'язана своїм походженням насамперед постійним генетичним варіаціям, що існували у популяціях їхніх предків – сірих вовків, та будь-яким наступним мутаціям, що відбулися протягом порівняно короткої історії приручення.

В собаківництві мікросателітні локуси ДНК найчастіше застосовуються для ідентифікації та експертизи достовірності походження особин. При цьому корейські вчені використовували для цього 22 мікросателіти на Біглях, а Е. Каргіл й Л. Кларк зі співавт. оперували 155 мікросателітними маркерами зібраними у 48 мільтиплексних реакцій.

Незважаючи на високу генетичну однорідність племінних собак внаслідок інбридингу, мікросателіти можуть забезпечити належну основу для здійснення достовірної ідентифікації та експертизи походження у чистопородних особин. С. Мун та співавт. доповіли про високу достовірність досліджень за 10 мікросателітами ДНК близько 600 голів собак, з них 256 помісних і 344 особини, що належали до 30 різних порід, таких як пудель, мальтійська болонка, Ши Тсу, йоркширський тер'єр, померанець, та ін. Ф. Гентіліні зі співробітниками використали 17 мікросателітних локусів для дактилоскопії собак породи боксер. І. Ішикава з колегами досліджували за 20 мікросателітними локусами собак що належали до порід ретривер, бігль та лабрадор.

Останнім часом з'являється все більше літературних даних, заснованих на мікросателітному аналізі поголів'я собак, орієнтованому на оцінку популяційної генетичної структури та різноманіття, як окремих порід так і безпородних дворових псів, аналіз генофондів яких сприяє розумінню загальних механізмів, що регулюють генетичне різноманіття, еволюцію та адаптацію та розселення даного виду.

Дослідженню генетичного різноманіття на внутрішньо- та міжпородному рівнях у присвячено велику кількість робіт. Так, Г. Лерой зі співавт. аналізували генетичне різноманіття 61 породи собак за результатами дослідження 1514 особин, за поліморфізмом 21 мікросателітного локусу ДНК. П. Зенке з колегами для популяційно-генетичного аналізу 668 особин належних до 79 різних порід собак обрали 10 мікросателітних локусів. А. Р. Огден та ін. застосували 15 мікросателітів для ідентифікації та підтвердження батьківства у 375 голів що відносились до 12 порід. А. Радко та Є. Слота повідомили про поліморфізм польської популяції хортів породи Борзая, оцінений за 19 мікросателітними локусами. С. Арата з колегами довели високу достовірність результатів аналізу мікросателітного поліморфізму в 275 представників японської породи шиба іну за 18 локусами мікросателітів, М. Прібанова та ін. оцінювали 632 голови шести різновидів такс за 10 мікросателітами. І. Жак зі співавт. досліджено мінливість 19 мікросателітних локусів у племінних тварин порід хорт, лабрадор та німецька вівчарка. В усіх трьох породах зафіксовано значне зменшення внутрішньої мінливості популяцій. Це зменшення було особливо вираженим у породи хорт. М. Голман та ін. було проведено аналіз генетичної мінливості у 235 польських хортів за 21 мікросателітним локусом ДНК, К. Сан Хосе з колегами досліджували іспанських хортів Podenco Valenciano за 21 мікросателітом.

В 2015 році було опубліковано результати досліджень В. Ла Манна та ін. італійські гончі Segugio Dell'Appennino та Segugio Maremmano за 21 мікросателітним локусом. Д. Владімір, з колективом співавт. повідомляють про високий рівень поліморфізму за 10 мікросателітами 51 собаку найпоширенішої породи турецького походження – кангал. Генетичну варіабельність 30 уругвайських собак породи Cimarron Uruguayo досліджував колектив на чолі з Р. Гагліарді, найполіморфнішими вони визначили локуси FH 2361, FH 2305 та PEZ 03, В результаті визначення А. Радко з колегами генетичних варіацій в популяції 60 собак породи татрська вівчарка на основі поліморфізму 18 мікросателітних локусів найвищий поліморфізм був виявлений у локусі АНТ171, у якому діагностовано 8 алелів, а значення PIS та Ho за цим локусом перевищували 0,8. Найнижчий поліморфізм було виявлено для АНТ0211, у якому було визначено 3 алелі, а значення PIS та Ho становили 0,233 та 0,281 відповідно.

Згідно даних опублікованих Д. Бігі та ін. за використання 18 мікросателітів ДНК походження 4-х аборигенних італійських порід вівчарок Maremma, Bergamasco, Lupino del Gigante й Oropa характеризуються високим рівнем генетичної мінливості, та найбільшою філогенетичною близькістю до бордер коллі з 6 космополітичних порід. Д. Айрон та ін. аналізували внутрішньопородну

генетичну варіабельність й використовували специфічні для порід частоти алелів, щоб з'ясувати філогенез та генетичні відстані між 28 породами собак, що представляють сім визнаних породних груп Американського кінологічного клубу (АКС) за використання 100 локусів мікросателітної ДНК.

У Canidae мікросателіти набули популярності і у дослідженнях філогенії та молекулярної еволюції різних видів псових. великі генетичні дослідження чітко показують, що свійський собака походить лише від сірих вовків, а не від шакалів, койотів чи ефіопських вовків як вважалось раніше. Р. Стікарова та співавт. проводили порівняльний аналіз вовка та чеського вовчака, а Дж. Седдон з колегами використовували результати генотипування за мікросателітами ДНК для ідентифікації особин та оцінювання генетичного різноманіття та мікроеволюційних процесів в шведській та фінській популяціях скандинавського вовка.

А.К. Сандквіст отримав більш повну картину процесу одомашнення та походження порід собак завдяки застосуванню молекулярних маркерів в дослідженнях генетичної мінливості популяцій вовка та свійського собаки. Крім того, він розробив метод для більш надійної ідентифікації хижаків (вовка, собаку чи гібрида), відповідального за напад, за допомогою аналізу залишків слини, залишених на здобичі. Дж. Клуковська та ін. з метою порівняльного аналізу поліморфізму дев'яти мікросателітів, отриманих від собак (СРН1, СРН3, СРН6, СРН11, 2004, 2010, 2140, 2168 та 2319), у трьох видів сімейства Canidae досліджено зразки ДНК 151 собаки, 53 песців та 91 рудої лисиці. Для більшості локусів середній розмір алеля був більшим у собаки, ніж у двох видів лисиць. Розраховані генетичні відстані між обома видами лисиць були найменшими, тоді, як між собакою та песцем – найбільшими. М. Затон-Доброволска з колегами, повідомляють про виявлення, в результаті аналізу генетичного поліморфізму 200 рудих лисиць з польських звірівники ферм за 30 мікросателітними локусами ДНК, значного впливу десяти мікросателітних локусів на чотири економічно важливі ознаки (вагу тіла, довжину тіла, окружність тіла, довжину хвоста).

Причому, чотири з них були пов'язані з двома ознаками: локус FH2613 з вагою і окружністю тіла, локус FH2097 – з довжиною і окружністю тіла, ZUBESA6 з вагою і окружністю тіла, а REN75M10 був пов'язаний з довжиною тіла та хвоста.

Ефективність використання 20 мікросателітів для генотипування 33 осіб *Vulpes vulpes* за допомогою для вивчення їх популяційно-генетичного різноманіття продемонстровано в роботі А. Маніванна.

І. Хонг з колегами проводили популяційно-генетичне дослідження південно корейської популяції єнотовидного собаки за 12 мікросателітними локусами. В результаті чого було виявлено високий поліморфізм та наявність чотирьох різних генетичних субпопуляцій даного виду на території південної Кореї.

В. Сласка та ін. досліджували поліморфізм польської популяції китайського єнотовидного собаки за 17 мікросателітами.

Застосування мікросателітів полегшило визначення ступеня консолідованості порід та розроблення планів розведення. За даними М. Кошкінена використання баєсівського методу за розміру референтної вибірки від 50 голів забезпечує 100% вірності при віднесенні тварин до певної породи на основі 10 МСЛ, з високим рівнем достовірності. Що спростовує поширену думку про неможливість ідентифікації породної належності собак.

Мікросателіти ДНК особливо корисні для виявлення генетичних захворювань, які не мають фенотипового прояву, та виявлення носіїв рецесивних захворювань, наприклад для виявлення гена собачого мідного токсикозу та ін.

Таким чином, важливість цього виду для досліджень генетичних захворювань спонукала до створення високоякісної повної послідовності геному, загальнодоступної з 2004 р.

За даними, отриманими в вересні 2011 г., геном *C. familiaris* містить 2,392 × 10<sup>9</sup> п.н., 19 856 кодуєчих генів та 11 898 некодуєчих генів.

За результатами роботи Є. Острандера та Р. Вейна з 19000 собачих генів 14 200 є спільними для собаки, людини та мишей. Приблизно 5,4% нуклеотидів спільних для людини та собаки перебувають під дією селекції. Але роботи з розширення діапазону маркерів спрямовані на надання дослідникам якнайбільшого спектру інструментів для роботи.

Перші повідомлення про розробку інтегрованої мапи геному собаки, що включає мікросателіти та структурні гени датуються 2004 роком і були зроблені Бріном і співавт. Одночасно з ними Хайт та ін. опублікували результати розробки порівняльної мапи високої роздільної здатності (9000 рад), яка включає 10 348 собачих маркерів, 9850, з яких відповідають собачим ортологам людських генів, отриманих із 1,5-кратної послідовності пуделя і роботи в цьому напрямку постійно продовжуються. Роком пізніше мапу було уточнено, завдяки розшифровці послідовності геному Боксера, заповненої дослідниками з Інституту Брод.

В останні роки завдяки накопиченим даним збільшується кількість досліджень мікросателітів у зв'язку з криміналістикою. Через велику кількість собак в людських популяціях вони часто причетні до злочинів. Іноді на місцях злочинів можна знайти собачі біологічні докази, такі як слина, плями крові та волосся. Відповідно, собача ДНК може бути використана як криміналістичний доказ. Використання мікросателітних локусів (STR) з біологічних доказів є цінним інструментом для судових розслідувань різноманітних злочинів, таких як жорстоке поводження з тваринами, напади на собак, вбивства, пограбування, а також зниклі та покинуті собаки. Для розширення криміналістичних можливостей ведуться роботи з розробки єдиного набору локусів STR, який можна одночасно застосовувати для ідентифікації декількох видів. Також, все частіше, повідомляється про використання результатів ДНК типування собак у

судових справах, що включають нещасні випадки, напади собак або аналіз біологічних доказів, які можуть допомогти в ідентифікації злочинця людини як „мовчазних свідків“.

### ***Контрольні запитання***

1. Скільки порід собак визнає Світова кінологічна організація (WCO)?
2. Для чого найчастіше застосовуються мікросателітні локуси ДНК у собаківництві?

## Рекомендовані джерела інформації

1. Дубінін С. І., Пілюгін В.О., Ваценко А.В., Улановська-Циба Н.А., Передерій Н.О. Сучасні проблеми молекулярної біології. Полтава. 2016. 393 с.
2. Молекулярна біологія : підручник / А.В. Сиволоб. – К. : Видавничополіграфічний центр “Київський університет”, 2008. – 384 с.
3. Ратнер В. А. Генетический код как система. Соросовский образовательный журн. 2000. № 3. С. 17-22.
4. Трофименко О.Л.. Популяційна генетика - К: КВІЦ. 2006. -640 с.
5. Димань Т.М., Глазко В.І. Полімеразна ланцюгова реакція: Методичні рекомендації// Біла Церква. - 2004. - 62 с.
6. Електронний посібник до вивчення курсу «Організація лабораторної справи з системою управління якістю лабораторних досліджень» / Т. М. Шевченко, П.М. Полушкін – Д.: ДНУ, 2014. – 128 с.

## Інформаційні ресурси

1. База даних локусів кількісних ознак [https:// www. animalgenome. org/QTLdb/faq/](https://www.animalgenome.org/QTLdb/faq/)
2. База даних фенів не лабораторних тварин <https://omia.org/home/>
3. База даних National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information
4. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9615&build=3.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9615&build=3.1)
5. Національна бібліотека України імені В. І. Вернадського. Електронний фонд <http://www.nbuv.gov.ua/>

