

ПЦР-ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛОШАДЕЙ

ЮРИЙ КУРИЛЕНКО

03041 Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
г. Киев, ул. Героев Оборони, 15

Наследственные заболевания возникают в результате мутации одного или двух генов и характеризуются простым наследованием по законам Менделя. В настоящее время у лошадей обнаружено около 30 летальных генов и благодаря прогрессу по изучению ДНК их количество постоянно увеличивается (**Tangen N.** 2010; **Храброва Л. А.** 2006). База данных по наследственным заболеваниям лошадей сейчас насчитывает 212 генетических заболеваний, в том числе 40 однолокусных дефектов (<http://omia.angis.org.ua>).

В арабской верховой породе лошадей, как известно, одной из древнейших, в последнее время участились случаи проявления летальных синдромов. В Украине тоже разводят эту породу, но генетического контроля импортируемых особей на предмет наличия у них тех или иных наследственных заболеваний не проводится, что может быть опасно, учитывая попадание в популяцию отечественных арабских лошадей нежелательных летальных аллелей.

Среди изученных однолокусных дефектов лошадей особый интерес представляет жесткий комбинированный иммунодефицит (SCID). Он имеет аутосомный рецессивный тип наследования и встречается у 0.4-2% арабских лошадей. Жеребята, рецессивные гомозиготы по данной мутации, рождаются здоровыми, но после достижения двухмесячного возраста (окончание колострального иммунитета) заболевают и умирают от любой инфекции. Молекулярной основой мутации SCID является делеция пяти пар нуклеотидов в гене ДНК-зависимой протеинкиназы C, в результате чего фермент теряет свою активность и как следствие нарушается защитная функция лейкоцитов (**Georgescu S.E.**, 2006; **Zavrtanic J.**, 2005).

Гиперкалиемический периодический паралич (HYPP - Hyperkalemic periodic paralysis) – наследственное заболевание лошадей, характеризующееся попеременными приступами мышечной слабости и паралича скелетных мышц, сопровождается гиперкалиемией. Первые сведения о болезни были опубликованы двумя независимыми группами исследователей в 1985-1986 годах (**Georgescu S. E.**, 2007., **Naylor J. M.**, 1994). Симптомы заболевания часто наблюдаются у лошадей 2-3 летнего возраста с ярко выраженным мышечным фенотипом. Поскольку болезнь наследуется по доминантному аутосомному типу, то на-

иболее выраженная клиническая картина наблюдается у гомозигот (AA). Пораженные лошади часто страдают от спорадических приступов мышечного тремора, слабости, в основном лежат. В особо тяжелых случаях может наступить смерть животного в результате паралича гортанных мышц и сердечной недостаточности (**Robinson R.**, 1989). Обычно приступы возникают во время тренировки, при переохлаждении, транспортировке и длятся от нескольких минут до нескольких часов (**Naylor J. M.**, 1994). Болезнь является следствием генной точечной мутации в гене α -субъединицы белка натриевых каналов поперечно-полосатых мышц (SCN4A). Эта миссенс-мутация приводит к аминокислотной замене (фенилаланина на лейцин) в 3 сегменте 4 домена α -субъединицы белка натриевых каналов (**Tangen N.**, 2010).

В наше время выявление генетических заболеваний лошадей в Украине не осуществляется, что негативно отражается на экономическом состоянии отрасли. Существуют некоторые заболевания лошадей, которые из-за повышения гомозиготности в популяции по нежелательным рецессивным аллелям, то есть при переходе из гетеро- в гомозиготное состояние проявляются в фенотипе как летальные или полuletальные. Поэтому своевременное выявление роли наследственности в появлении заболеваний имеет важное значение не только у выборе методов лечения, но и для избежания заболеваний целенаправленной селекцией.

Целью нашей работы было выявление лошадей-носителей наследственных заболеваний (HYPP та SCID).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили волосяные фолликулы лошадей украинской верховой породы ($n = 30$) – при генетическом мониторинге HYPP и арабской верховой породы ($n = 16$) – при детекции мутации SCID.

Геномную ДНК выделяли из волосяных фолликулов лошадей по собственным модификациям (**Carter M. J.**, **Milton I. D.**, 1993) с помощью комплекта реактивов «ДНК-сорб В» (АмплиСенс, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Начальный этап лизиса проводили в течение 2 часов при 65°C. Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра СФ-26.

Для идентификации животных-носителей нежелательных мутаций мы применили метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами, с помощью которых амплифицируются необходимые фрагменты генов. Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик» (Россия).

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 17 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween-20, 0.2 mM дНТФ, 1.0 ед. Tag-полимеразы, 50 нг ДНК (100 нг для детекции мутации SCID), 2.0 mM MgCl₂ и по 0.3 мкМ каждого праймера. Оптимальную концентрацию каждого из компонентов реакции подбирали экспериментально.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации гена SCN4A проводили в 3%-ном агарозном геле, используя 1 × TBE-буфер при постоянного напряжения 200 V в течение 20 минут. После окончания электрофореза гель обрабатывали бромистым этидием (0.5 мкг/мл), визуализировали под УФ-лучами и фотографировали цифровой камерой Panasonic DMC-FS42. Для определения молекулярной массы использовали маркер GeneRuler 100 bp («Fermentas», Литва). Рестрикцию продуктов ПЦР проводили за использование эндонуклеазы *TaqI* согласно рекомендациям производителя («Сибензим», Россия).

Для электрофоретического разделения продуктов амплификации гена ДНК-зависимой протеинкиназы С (DNA PKcs) использовали 8% полиакриламидный гель (ПААГ) и 0,5×TBE-буфер. Молекулярную массу ПЦР-продуктов определяли за маркером GeneRuler 20 bp (Fermentas, Литва).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Как известно, причиной НУРР является однонуклеотидная замена (С → G) в гене α -субъединицы белка натриевых каналов поперечно-полосатых мышц (Georgescu S. E., 2007; Naylor J. M., 1994). Мы применили достаточно простой метод выявления мутации НУРР, используя специфические праймеры, с помощью которых амплифицировали необходимый фрагмент гена размером 92 п.н. Нами экспериментально была подобрана оптимальная температура отжига праймеров, что позволило получить желаемый амплификат и устранить появление неспецифических продуктов ПЦР. Поскольку в месте мутации есть сайт узнавания для эндонуклеазы рестрикции *TaqI* (T ↓ CGA → TGGA), то генотипирование животных было проведено с использованием метода ПЦР-ПДРФ. Генотипы исследованных животных

Таблица 1. Характеристика праймеров

Table 1. Characteristic of the primers

Заболевание Disease	Последовательность нуклеотидов Sequence of nucleotides	
НУРР	F:	5' – GGGGAGTGTGTGCTCAAGATG – 3'
	R:	5' – AATGGACAGGATGACAACCAC – 3'
SCID	F:	5' – GTTGGTCTTGTCATTGAGCTG – 3'
	R:	5' – GCATCCGGATATCTGTTTGTC – 3'

Таблица 2. Временной и температурный режим амплификации

Table 2. Time and temperature mode of amplification

Этап Stage	SCID	НУРР
I. Начальная денатурация I. First denaturation	4 min. 94°C	4 min. 94°C
II. Количество циклов II. Number of cycles	36	40
1. Денатурация 1. Denaturation	20 s 94°C	30 s 94°C
2. Отжиг 2. Annealing	20 s 56°C	30 s 63°C
3. Элонгация 3. Extension	20 s 72°C	30 s 72°C
III. Терминальная элонгация III. Final extension	5 min. 72 °C	

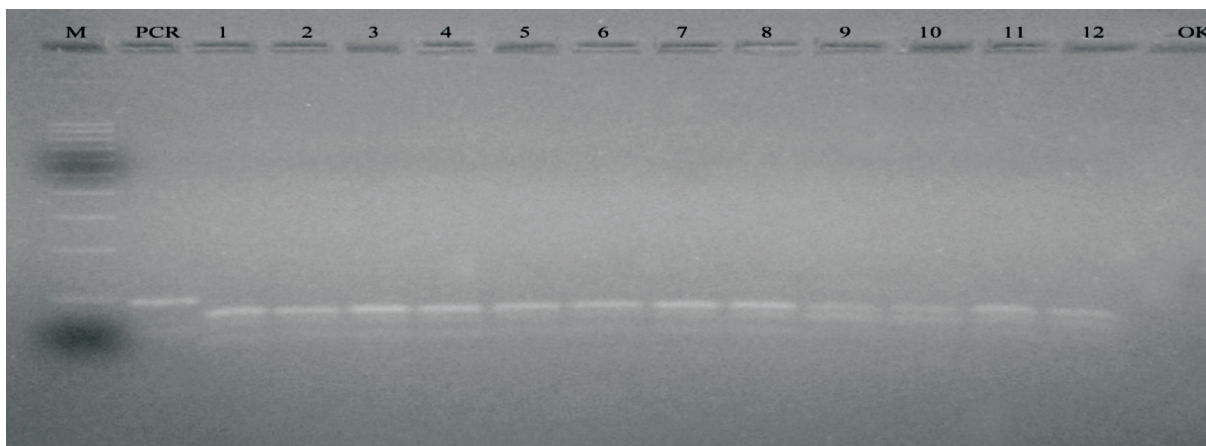


Рис. 1. ПЦР-ПДФ анализ гена HYPB лошадей: M - маркер молекулярных размеров GeneRuler 100 bp, PCR - продукт амплификации, 1-12 - продукты рестрикции, ОК - отрицательный контроль ПЦР.

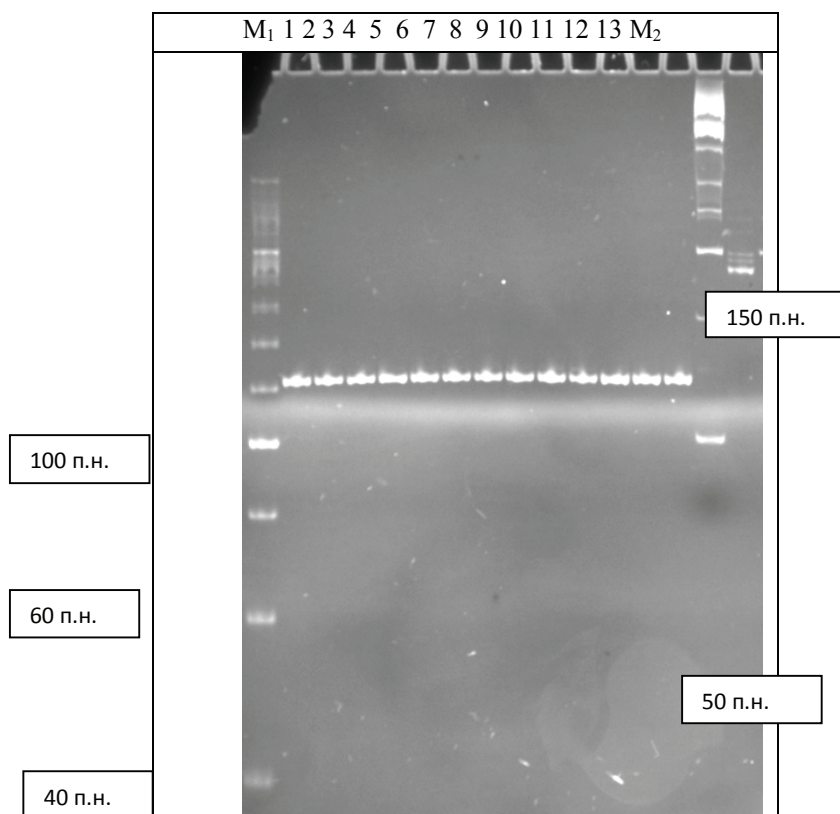


Рис. 2. Электрофореграмма результатов ПЦР анализа фрагмента DNA-РКс: M1 – маркер молекулярных размеров GeneRuler 20 bp., M2 – маркер молекулярных размеров GeneRuler 50 bp

определяли по молекулярной массе продуктов ПЦР: NN (64, 28 н.п.) – здоровые животные, NB (92 н.п., 64 н.п. и 28 н.п.) – гетерозиготные по мутации животных, BB (92 н.п.) – больные гомозиготы. В результате проведенной рестрикции нами не было обнаружено образцов, характерных для больных гомозигот и гетерозиготных особей, носителей мутации HYPB (рис. 1).

Причиной SCID является выпадение 5 bp в гене ДНК-зависимой протеинкиназы, что приводит к преждевременной термации транскрипции (Piro M., 2008; Zavrtnic J., 2005). Поэтому мы применили достаточно простой метод выявления мутации SCID, используя специфические праймеры, для амплификации необходимого фрагмента гена размером 136 или 131 п.н.

у здоровых и мутантных особей соответственно. В результате тщательно проведенного электрофореза нами не было выявлено различий между длинами фрагментов, свидетельствующих о наличии делеции, и следовательно о наличии гетерозиготных особей (рис. 2).

ВЫВОДИ

С целью выявления мутации НУРР проведен скрининг лошадей украинской верховой породы. Среди исследованных животных не обнаружено носителей мутации НУРР. В ходе исследований оптимизированы параметры проведения ПЦР, подобрана оптимальная температура отжига праймеров и концентрация компонентов реакционной смеси для амплификации необходимого фрагмента гена.

По результатам проведенного нами мониторинга популяции лошадей арабской породы на наличие мутации в гене ДНК-зависимой протеинкиназы С (DNA-ПКс) среди исследованных животных носителей SCID также не было обнаружено.

Учитывая вероятность импорта на территорию Украины арабских лошадей и необходимость контроля распространения данных заболеваний считаем целесообразным продолжить ПЦР-диагностику мутации НУРР и SCID.

ЛИТЕРАТУРА

1. Храброва, Л. А., 2006. Генетические аномалии и болезни лошадей / Л. А. Храброва // Коневодство и конный спорт. №6 — С. 19-21.

2. Carter, M. J., Milton I. D., 1993. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles / M. J. Carter, I. D. Milton // Nucleic Acids Res. — Vol.21. — P.1044-1046.

3. Georgescu, S. E., 2007. Diagnostication of hyperkalemic periodic paralysis in horses / S.E. Georgescu, Manea Maria Adina et al. // Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii. - Vol. 40(1). — P. 96-99.

4. Georgescu, S. E., 2006. Molecular basis and diagnostication of SCID in Arabian Horses / S.E. Georgescu, E. Condac, Anca Dinischiotu, Marieta Costache // Roumanian Biotechnological Letters. — Vol. 11(№5). — P. — 2875-2879.

5. <http://omia.angis.org.ua>

6. Naylor, J. M., 1994. Equine hyperkalemic periodic paralysis: Review and implications / J.M. Naylor // Canadian Veterinary Journal. - - V. 35. - P. 279-285.

7. Piro, M., 2008. Frequency of the severe combined immunodeficiency disease gene among horses in Morocco / M. Piro, A. Benjouad, N.S. Tligui et al. // Equine Veterinary Journal. — Vol.40. — P. 590-591.

8. Robinson, R., 1989. Genetic defects in the horse / Robinson R. // Journal of Animal Breeding and Genetics. — No. 106. - P. - 475-478.

9. Tangen, N., 2010. Genetic disorders of horses – a critical review: diplomawork / Szent István University, Faculty of Veterinary Science Budapest,

10. Zavrtnic, J., 2005. Genetic monitoring for severe combined immunodeficiency carriers in horses in Slovenia / J. Zavrtnic, M. Mesaric, G. Majdic // Slovenian veterinary research. - - No. 42. - P. 37-41.

PCR-DIAGNOSTICATION OF INHERITED DISEASES OF HORSES

Y. Kurilenko

*03041 National University of Life and Enviromental Sciences of Ukraine,
Kyiv, Heroiv Oborony St., 15*

SUMMARY

PCR-diagnostication of two inherited diseases of horses: severe combined immunodeficiency and hyperkalemic periodic paralysis was conducted. There were not found carriers of mutations among the tested animals. The parameters of PCR, the optimum primer annealing temperature and the concentration of the reaction mixture for amplification of the desired gene fragment were optimized.

Key words: *arabian horse breed, immunodeficiency, mutation, DNA-PKcs, polymerase chain reaction, mutation HYPР, Ukrainian race breed of horses.*

E-mail: Yura236@ukr.net