

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 309 (2015), 27 – 33

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF EDILBAY SHEEP BREEDS

**B. O. Bekmanov, A. S. Amirgalieva, A. S. Mussayeva, M. D. Tulekei, K. Zh. Dosibayev,
Z. S. Orasimbetova, E. M. Khussainova, R. Zh. Zhapbasov, A. M. Zhomartov**

LLP «KazCytoGen», Almaty, Kazakhstan.

E-mail: aimus_@mail.ru

Keywords: ISSR-markers, genetic polymorphism, Edilbay breed, PCR, sheep.

Abstract. The comparative analysis of ISSR-markers polymorphism of Edilbay sheep breed from LLP «Birlik mal zauyty», Uralsk, Kazakhstan was undertaken. 140 animals (100 ewes, 40 rams) were chosen for the study. Genomic DNA was extracted from peripheral blood using a standard reagent kit. Genotyping was performed using specific ISSR-primers. Out of 8 tested ISSR-primers two ((AG)₉C and (GA)₉C) effective for polymorphism analysis of sheep were identified. Edilbay sheep ISSR (AG)₉C spectrum of DNA amplification products revealed 20 DNA fragments ranged in length from 220 to 1520 bp. The spectrum of amplification products for ISSR (GA)₉C included 19 fragments ranged in length from 470 to 1935 bp. When primer (AG)₉C was used monomorphic amplicon with 500 bp length was found. When (GA)₉C primer was used conservative amplicon – 530 bp was found. So, primers (AG)₉C and (GA)₉C are recommended for molecular genetic analysis of Edilbay sheep DNA polymorphism.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОВЕЦ ЕДИЛЬБАЙСКОЙ ПОРОДЫ

Б. О. Бекманов, А. С. Амиргалиева, А. С. Мусаева, М. Д. Тулекей, К. Ж. Досыбаев,
З. С. Оразымбетова, Э. М. Хусайнова, Р. Ж. Жапбасов, А. М. Жомартов

ТОО «KazCytoGen», Алматы, Казахстан

Ключевые слова: ISSR-маркеры, генетический полиморфизм, Едильбайская порода, ПЦР, овцы.

Аннотация. Выполнен сравнительный анализ полиморфизма ISSR-маркеров Едильбайской породы овец взятых из ТОО «Бірлік мал зауыты», Уральск, Казахстан. Для исследования были выбраны 140 голов (100 маток, 40 баранов). Образцы геномной ДНК были выделены из периферической крови с помощью стандартных наборов реагентов. Генотипирование проводили с использованием специфических ISSR-праймеров. В результате из 8 протестированных ISSR-праймеров два ((AG)₉C и (GA)₉C) позволили выявить полиморфизм участков ДНК овец. Анализ ISSR-спектров овец Едильбайской породы с праймером (AG)₉C выявил 20 фрагментов ДНК, длина которых варьировала от 220 до 1520 п.о. В спектре продуктов амплификации, полученных при использовании в качестве праймера (GA)₉C, было обнаружено 19 фрагментов ДНК, длина которых варьировала от 470 до 1935 п.о. При использовании праймера (AG)₉C был обнаружен мономорфный ампликон длиной 500 п.о. С помощью праймера (GA)₉C найден консервативный участок размером 530 п.о. Праймеры (AG)₉C и (GA)₉C рекомендованы для молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК у овец Едильбайской породы.

В настоящее время метод ISSR-PCR (*Inter Simple Sequence Repeat – Polymerase Chain Reaction*) широко используется при обнаружении внутривидового полиморфизма, в первую очередь у близкородственных генотипов растений и животных [1-5]. Этот метод начал развиваться в 1994 г., а к настоящему времени получил широкое распространение [6]. Применение нейтральных молекулярных маркеров, таких как ISSR, сравнительно равномерно распределенных по геному, позволяет одновременно определить изменчивость по группе не связанных между собой локусов, что особенно ценно для сохранения и использования генетических ресурсов. Для создания ISSR-маркеров используют праймеры, комплементарные микросателлитным повторам и несущие на одном из концов последовательность из двух (трех или четырех) произвольных нуклеотидов и одного селективного нуклеотида на 3'-конце праймера, например, 5'-CACACACACACACACAG ((CA)₉G) [7]. Такие праймеры позволяют амплифицировать фрагменты уникальной ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями. В результате амплифицируется большое число фрагментов, представленных на электрофореграмме дискретными полосами (ISSR-фингер-принтинг). Полученные ПЦР-продукты относятся к маркерам доминантного типа наследования, полиморфизм которых тестируется по наличию/отсутствию полосы. Для создания ISSR-маркеров не требуется предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК. Метод обладает хорошей воспроизводимостью и может быть с успехом использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации групп растений и животных различного таксономического ранга, а в ряде случаев и для индивидуального генотипирования [8-11]. В связи с этим, цель данной работы было получить качественно новую информацию при оценке генетической структуры Едильбайской породы овец с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК.

Материалы и методы исследования

Изучено 140 голов (100 маток, 40 баранов) Едильбайской породы овец, разводимых в ТОО «Бірлік мал зауыты», Уральск, Казахстан. Для оценки генофонда применяли метод ISSR-PCR, который позволяет получать полилокусные полиморфные спектры. Каждый ампликон рассматривали как отдельный локус. Для экстракции геномной ДНК использовали набор реагентов *QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, USA)*. Количественную и качественную оценку выделенных ДНК

проводили с помощью ДНК-фотометра (*Biofotometer Plus, Eppendorf, Германия*) и электрофоретического анализа. Для проведения амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб использовали ПЦР-смесь (*PCR MasterMix, ThermoScientific, USA*) с *Taq*-полимеразой. Амплификацию проводили в автоматическом режиме на программируемом амплификаторе *Mastercycler nexus Gradient (Eppendorf, Германия)*. ПЦР проходила в следующих условиях: «горячий старт» – 2 мин/94°C, 40 циклов (денатурация – 30 с/94°C, отжиг праймера – 30 с (температура отжига в зависимости от G/C-состава праймеров варьировала от 55° до 63°C), синтез – 2 мин/72°C), дополнительный синтез – 10 мин/72°C, охлаждение до 4°C. Все праймеры были синтезированы на синтезаторе ASM-800 (Новосибирск, Россия) в лаборатории молекулярной генетики Института общей генетики и цитологии КН МОН РК.

Таблица 1 – Праймеры, использованные для ISSR-PCR метода овец

Название праймер	Последовательность (5' → 3')
<i>Для двух-нуклеотидного микросателлитного повтора</i>	
(AG) ₆ C	AGAGAGAGAGAGAGAGAGc
(GA) ₆ C	GAGAGAGAGAGAGAGAGAc
(AC) ₆ G	ACACACACACACACACAcg
(CA) ₆ G	CACACACACACACACACAg
(AC) ₆ T	ACACACACACACACACAcT
(CA) ₆ T	CACACACACACACACACAT
<i>Для трех-нуклеотидного микросателлитного повтора</i>	
(CTC) ₆ G	CTCCTCCTCCTCCTCCTCg
(GTG) ₆ C	GTGGTGGTGGTGGTGGTGc

Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 5% полиакриламидном и 2%-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере (0,89 М Трис, 0,1 М ацетат натрия, 0,05 М ЭДТА), pH 7,8 с бромистым этидием (5 мкг/мл) и обрабатывали с использованием геледокументирующей системы *Quantum-ST5-1100, Vilber Lourmat, Франция*. Размер каждого фрагмента определяли путем сравнения с маркерными фрагментами ДНК *GeneRuller 100 kb DNA Ladder (ThermoScientific, USA)*.

Результаты и их обсуждение

Изменчивость ISSR-спектров. ISSR-анализ может рассматриваться как один из наиболее простых и эффективных молекулярно-генетических методов, который находит применение в селекционной практике (для оценки консолидированности и чистоты разных пород и линий; при восстановлении исчезающих пород и видов и сохранении их генетического разнообразия и др.). Суть метода ISSR-PCR заключается в применении микросателлитных локусов как участков отжига праймеров и амплификации участков, находящихся между их инвертированным повтором. Праймеры состоят из повторяющейся последовательности, например, (CA)_n и «якорного» участка на 5' или 3' концах (CA)₆G или (CA)₈C, который определяет место отжига праймера. Такой подход увеличивает точность отжига, воспроизводимость амплифицированных фрагментов и уменьшает их «анонимность» [12].

В работе для оценки эффективности ISSR-маркеров были использованы маркеры двух- и трех-нуклеотидных повторов (таблица 1). Из 8 протестированных ISSR-праймеров 2 показали высокую эффективность для овец, так как выявили четко амплифицирующиеся фрагменты ДНК. Эффективность праймеров по выявлению полиморфизма ДНК рассчитывали в соответствии со шкалой 1–5: от низкой (1) до высокой (5) [13]. Каждый праймер индивидуально был анализирован в ПЦР с геномной ДНК исследуемых овец (таблица 2).

При использовании тринуклеотидных ((CTC)₆C и (GAG)₆C) и двухнуклеотидных праймеров ((AC)₆G, (CA)₆G, (AC)₆T, (CA)₆T) результаты были неинформативными относительно внутрипородного типа.

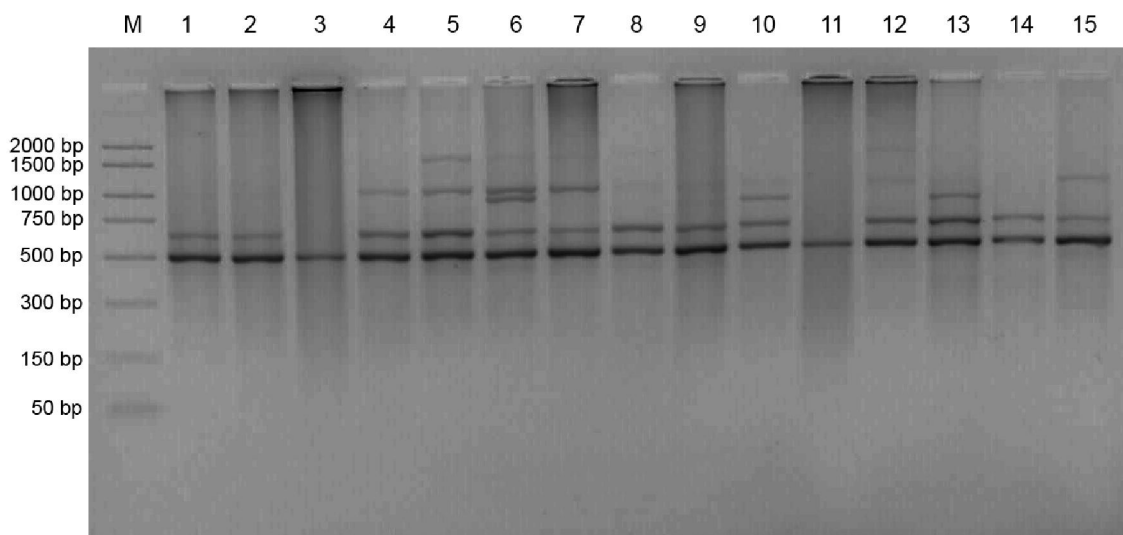
Таблица 2 – Эффективность ISSR-праймеров

№	Праймер	Температура отжига (Tm, °C)	Эффективность праймера*
1	(AG) ₉ C	63	5
2	(GA) ₉ C	63	5
3	(AC) ₉ G	58	2
4	(CA) ₉ G	55	2
5	(AC) ₉ T	57	2
6	(CA) ₉ T	58	2
7	(CTC) ₆ G	55	1
8	(GTG) ₆ C	58	1

*Эффективность праймеров от 1 (низкая) до 5 (высокая) определена по шкале, предложенной С. В. Боронниковой и Р. Н. Календарем [13].

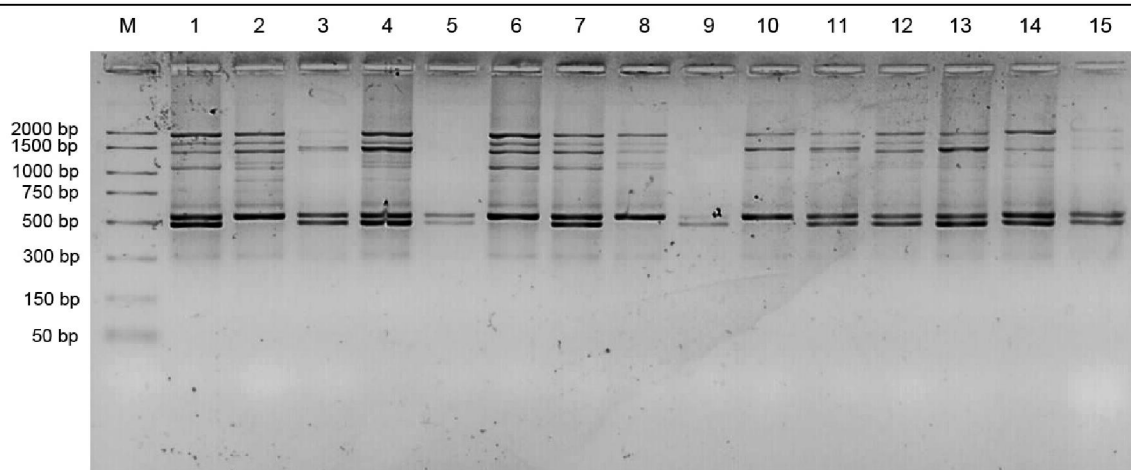
Среди продуктов амплификации, полученных с помощью ПЦР в качестве праймера последовательность (AG)₉C, наиболее надежно выявлялись 20 ампликонов, каждый из которых в дальнейшем рассматривался как отдельный локус и в пределах от 220 до 1520 п.о. В спектре продуктов амплификации, полученных при использовании в качестве праймера (GA)₉C, было обнаружено 19 фрагментов ДНК, длина которых варьировала от 470 до 1935 п.о. На рисунках 1 и 2 видно отчетливые полосы (локусы) по праймерам (AG)₉C и (GA)₉C.

По предварительным данным ампликоны длиной 500 п.о. мономорфны и встречаются у всех изученных нами животных. По данным В. И. Глазко и др. (2009), ампликоны размером 1000 и 650 п.о. характерны для овец породы асканийский многоплодный каракуль и таких аборигенных, выведенных народной селекцией пород как сокольская, кулундинская, романовская [14, 15]. Постоянно встречающийся ампликон у Едильбайской породы размером 500 п.о. (по праймерам (AG)₉C) возможно может быть охарактеризован как породоспецифичные, потому что этот ампликон не был описан ни у одной из пород овец по литературным данным [16, 17].



М – маркер молекулярных масс. 1-15 – номера проб ДНК

Рисунок 1 – Спектр продуктов амплификации, полученных с использованием в качестве праймера (AG)₉C в полимеразной цепной реакции на геномной ДНК овец Едильбайской породы



М – маркер молекулярных масс. 1-15 – номера проб ДНК

Рисунок 2 – Спектр продуктов амплификации, полученных с использованием в качестве праймера $(GA)_9C$ в полимеразной цепной реакции на геномной ДНК овец Едильбайской породы

При использовании праймера $(GA)_9C$ также найден консервативный участок ДНК – ампликон с размером 530 п.о. Данный ампликон стабильно встречается у всех исследованных овец Едильбайской породы. Кроме того, четко амплифицируемый локус длиной 490 п.о. у Едильбайской породы показывает полиморфный характер. Таким образом, по информативности праймеры $(AG)_9C$ и $(GA)_9C$, содержащие динуклеотидные повторы рекомендуется для проведения внутривидовых молекулярно-генетических анализов полиморфизма ДНК овец.

Работа выполнена при финансовой поддержке Всемирного Банка и Министерства образования и науки Республики Казахстан (в рамках проекта «Коммерциализация Технологий», соглашение о Гранте №541 от 27 ноября 2012 г.). Авторы выражают глубокую благодарность д.с.-х наук Жумадила К. за помощь в проведении экспедиции, директору ТОО «Бірік мал зауыты» Ешимову К.М., а также Беккалиеву О.И. и Абишеву Н.Б. за доступ и сбор биологических материалов.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Глазко В.И., Гладырь Е.А., Феофилов А.В. и др. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геномах сельскохозяйственных видов млекопитающих // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 2. – С. 71-76.
- [2] Мельникова М.Н., Сенчукова А.Л., Павлов С.Д. Разработка новых популяционно-генетических маркеров для вида *Parasalmo (oncorhynchus) mykiss* на основе вариабельности межсателлитной ДНК // Доклады академии наук. – 2010. – Т. 435, № 1. – С. 138-141.
- [3] Нечаева Ю.С., Боронникова С.В., Видякин А.И. Молекулярно-генетический анализ популяций хвойных видов растений на Урале и Востоке Европейской части России для сохранения и возобновления лесных ресурсов // Известия Самарского научного центра РАН. – 2014. – Т. 16, № 1(3). – С. 878-882.
- [4] Нечаева Ю.С., Боронникова С.В., Юсупов Р.Р., Хайнце Б. Изучение полиморфизма ISSR-маркеров в природных и искусственных популяциях лиственницы // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 6. – С. 1426-1431.
- [5] Гладырь Е.А., Горелов П.В., Маурчева В.Н. и др. Оценка результативности тест-системы на основе микросателлитов в проведении ДНК-экспертизы крупного рогатого скота // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 8. – С. 51-54.
- [6] Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. – 1994. – Vol. 20(2). – P. 176-183.
- [7] Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // Журнал общей биологии. – 2004. – Т. 65, № 4. – С. 278-305.
- [8] Shivakumar Bakkappa, Talebi E., Subramanya G. Role of molecular markers (RAPD and ISSR) in silkworm conservation // International journal of advanced biological research. – 2011. – Vol. 1(1). – P. 1-7.
- [9] Chen D.X., Li L.Y., Zhang X. et al. Genetic diversity and population structure of wild *Dipsacus asperoides* in China as indicated by ISSR markers // Genet. Mol. Res. – 2014. – Vol. 13(3). – P. 6340-6349.
- [10] Pashaei S., Azari M.A., Hasani S. et al. Genetic diversity in mazandarani native cattle: a comparison with Holstein cattle, using ISSR marker // Pak. J. Biol. Sci. – 2009. – 12(9). – P. 717-721.
- [11] Шейкина О.В., Прохорова А.А., Новиков П.С. и др. Разработка методики идентификации клонов плюсовых деревьев Ели обыкновенной (*Picea abies* L.) с использованием ISSR-маркеров // Научный журнал КубГАУ. – 2012. – № 83(09). – С. 1-14.

- [12] Kalendar R., Grob T., Regina M. et al. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based ДНК fingerprinting techniques // Theor. Appl. Genet. – 1999. – Vol. 98. – P. 704-711.
- [13] Молекулярная генетика: учеб.-метод.пособие / Под ред. С. В. Боронниковой. – Пермь: Перм. ун-т, 2007. – 150 с.
- [14] Глазко В.И., Столповский Ю.А., Феofilов А.В. и др. Распределение фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами ди- и тринуклеотидных микросателлитов, в геномах серого украинского скота // Известия ТСХА. – 2009. – № 1. – С. 155-162.
- [15] Столповский Ю.А., Кол Н.В., Лапшин А.В. и др. Полиморфизм молекулярно-генетических маркеров у овец романовской породы // Известия ТСХА. – 2008. – № 2. – С. 48-54.
- [16] Юлдашбаев Ю.А., Аббасов М.Р., Лоретц О.Г. Молекулярно-генетический анализ овец разного происхождения // Аграрный вестник Урала. – 2013. – № 6 (112). – С. 37-40.
- [17] Дымань Т.Н., Городная А.В., Тарасюк С.И. и др. Участие маркеров структурных генов и анонимных последовательностей ДНК в генетической дифференциации у видов рода *Ovis aries hivicola borealis* // Цитология и генетика. – 2000. – № 6. – С. 49-59.

REFERENCES

- [1] Glazko V.I., Gladyr E.A., Feofilov A.V., et al. ISSR-PCR markers and mobile genetic elements in the genomes of mammals. Agricultural Agricultural Biology. - 2013. - № 2. - p. 71-76. (in Russ.).
- [2] Melnikova M.N., Senchukova A.L., Pavlov S.D. Development of new population genetic markers for type Parasalmo (oncorhynchus) mykiss based on the variability of DNA mezhsatellitnoy. Reports of the Academy of Sciences. - 2010. - V. 435, № 1. - p. 138-141. (in Russ.).
- [3] Nechayeva Yu.S., Boronnikova S.V., Vidyakin A.I. Molecular genetic analysis of populations of coniferous species of plants in the Urals and the European part of Russia for the preservation and restoration of forest resources. Bulletin of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. - 2014. - V. 16, № 1 (3). - p. 878-882. (in Russ.).
- [4] Nechayeva Yu.S., Boronnikova S.V., Yusupov R.R., Heinze B. Study of polymorphism ISSR-markers in natural populations of artificial and larch. Basic Research. - 2013. - № 6. - p. 1426-1431. (in Russ.).
- [5] Gladyr E.A., Gorelov P.V., Maurcheva V.N. et al. Assessment of performance test systems based on micro-satellites to conduct DNA examination of cattle. Scientific and technological agriculture. - 2011. - № 8. - p. 51-54. (in Russ.).
- [6] Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. 1994. Vol. 20(2). P. 176-183.
- [7] Bannikova A.A. Molecular markers and modern phylogenetics mammals. Journal of General Biology and Gia. - 2004. - V. 65, № 4. - pp 278-305. (in Russ.).
- [8] Shivakumar Bakkappa, Talebi E., Subramanya G. Role of molecular markers (RAPD and ISSR) in silkworm conservation. International journal of advanced biological research. 2011. Vol. 1(1). P. 1-7.
- [9] Chen D.X., Li L.Y., Zhang X. et al. Genetic diversity and population structure of wild *Dipsacus asperoides* in China as indicated by ISSR markers. Genet. Mol. Res. 2014. Vol. 13(3). P. 6340-6349.
- [10] Pashaei S., Azari M.A., Hasani S. i dr. Geneticheskoye raznoobraziye v mazandaraniyan rodnykh krupnogo rogatogo skota: sravneniye s golshinskiy skota, ispol'zuya ISSR markera. Pak. J. Biol. Sci. 2009. 12 (9). P. 717-721.
- [11] Sheykina O.V., Prokhorova A.A., Novikov P.S., et al. Development of methodology for identification of clones of plus trees of Norway spruce (*Picea abies* L.) using ISSR-markers. Scientific Journal KubGAU. - 2012. - № 83 (09). - P. 1-14. (in Russ.).
- [12] Kalendar R., Grob T., Regina M. et al. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based ДНК fingerprinting techniques. Theor. Appl. Genet. 1999. Vol. 98. P. 704-711.
- [13] Molecular genetics: manual. Ed. S.V. Boronnikova. - Perm: Perm. University Press, 2007. - 150 p. (in Russ.).
- [14] Glazko V.I., Stolpovsky Yu.A., Feofilov A.V., et al. The distribution of DNA fragments flanked by inverted repeats of di- and trinucleotide microsatellites in the genome of the gray Ukrainian cattle. News of TAA. - 2009. - № 1. - p. 155-162. (in Russ.).
- [15] Stolpovsky Yu.A., Kol N.V., Lapshin A.V., et al. Polymorphism of molecular genetic markers in sheep Romanov breed. News of TAA. - 2008. - № 2. - p. 48-54. (in Russ.).
- [16] Yuldashbaev Yu.A., Abbasov M.R., Lorets O.G. Molecular genetic analysis of sheep of different origin. Agrarian Herald Urals. - 2013. - № 6 (112). - p. 37-40. (in Russ.).
- [17] Dyman T.N., Gorodnaya A.V., Tarasyuk S.I., et al. Participation markers structural genes and anonymous DNA se--fore in the genetic differentiation of y species *Ovis aries hivicola borealis*. Cytology and Genetics. - 2000. - № 6. - p. 49-59. (in Russ.).

ЕДІЛБАЙ ТҰҚЫМДЫ ҚОЙЛАРҒА МОЛЕКУЛАЛЫ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТАЛДАУЛАР ЖҮРГІЗУ

**Б. О. Бекманов, А. С. Әмірғалиева, А. С. Мусаева, М. Д. Түлекей, Қ. Ж. Досыбаев,
З. С. Оразымбетова, Э. М. Хусаннова, Р. Ж. Жапбасов, А. М. Жомартов**

ЖШС «KazCytoGen», Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: ISSR-маркерлер, генетикалық полиморфизм, Еділбай тұқымы, ПТР, қойлар.

Аннотация. «Бірлік мал зауыты» ЖШС (Орал, Қазақстан) тиесілі Еділбай тұқымды қойларда ISSR-маркерлері арқылы ДНК молекуласы полиморфизміне салыстырмалы талдаулар жүргізілді. Зерттеуге Еділбай

тұқымына жататын 140 қой (100 аналық және 40 аталық) таңдап алынды. Геномдық ДНҚ молекуласын бөлу қан клеткаларынан стандартты жиынтықтардың көмегімен іске асырылды. Генотиптеуде арнайы ISSR-праймерлері қолданылды. Нәтижесінде, тексерілген 8 ISSR-праймерлердің тек екеуі ғана ((AG)₉C және (GA)₉C) қойдың ДНҚ молекуласы полиморфизмін талдауға болатындығы анықталды. Еділбай тұқымды қойларда (AG)₉C праймері 220-1520 ж.н. аралығында 20 жолақпен сипатталатын ISSR-спектрді көрсетті. (GA)₉C праймерімен жүргізілген зерттеуде көлемі 470-1935 ж.н. аралығында жататын 19 спектр байқалды. Сондай-ақ, (AG)₉C праймерін қолданғанда ұзындығы 500 ж.н. болатын мономорфты ампликон анықталды. Ал, (GA)₉C праймерінен көлемі 530 ж.н. болатын консервативті бөлік табылды. (AG)₉C және (GA)₉C праймерлері келесі ретте Еділбай тұқымды қойларда ДНҚ молекуласын молекулалы-генетикалық талдауда қолдануға болатындығы ұсынылды.