



УКРАЇНА

(19) UA (11) 45109 (13) U  
(51) МПК (2009)  
A01K 67/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ЕКСПРЕС-ГЕНОТИПУВАННЯ СВИНЕЙ ЗА ГЕНАМИ ЕСТРОГЕН- ТА МЕЛАНКОРТИН-4-РЕЦЕПТОРІВ**

1

2

(21) u200905293

(22) 27.05.2009

(24) 26.10.2009

(46) 26.10.2009, Бюл.№ 20, 2009 р.

(72) КОНОВАЛ ОКСАНА МИКОЛАЇВНА, КОСТЕНКО СВІТЛАНА ОЛЕКСІЇВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

(57) Спосіб експрес-генотипування свиней за генами естроген- та меланокортин-4-рецепторів, що

включає відбирання біоптату, попередню підготовку досліджуваного матеріалу, екстракцію нуклеїнової кислоти (ДНК), проведення полімеразної ланцюгової реакції, рестрикційний гідроліз, електрофорез, візуалізацію та аналіз отриманих даних, який **відрізняється** тим, що генотипування здійснюють одночасно для обох генів в оптимальному температурному та часовому режимі ампліфікації.

Корисна модель відноситься до ДНК-технології і може бути застосована у селекційній програмі із свинарства, тобто генотипування тварин за генами ESR (естроген-рецептор) та MC4R (меланокортин-4-рецептор) може бути використане для селекції з метою підвищення репродуктивних якостей свиноматок, приросту живої маси тварин, зниження витрат на виробництво свинини.

Відомий спосіб генотипування свиней за геном ESR (див. Інструкція з проведення тестування племінних тварин за ДНК-маркерами), згідно якої проводять ДНК-аналіз свиней за геном ESR окремо. Для ампліфікації фрагмента гена використовують праймери:

ESR 3: 5' - CCCTCTATGACCTGCTGCTG - 3';

ESR 4: 5' - TCAGATTGTGGTGGGGAAGTTC - 3'

У результаті ПЛР синтезується фрагмент ДНК розміром 185п.н., використовують рестриктазу Aval.

Недоліком відомого способу генотипування є те, що для кожного з генів підібрані різні умови

проведення полімеразної ланцюгової реакції. Генотипування вимагає за кожним геном окремо додаткового часу, а також розхідних матеріалів (буфер для рестриктази, агароза).

Метою корисної моделі є експрес-діагностика тварин за обома генами естроген- та меланокортин-4-рецепторів (ESR та MC4R, які знаходяться на хромосомі 1 в локусах p2.5-2.4 та q22-27 відповідно) одночасно за рахунок оптимізації режиму ампліфікації для обох генів, таким чином знижуючи затрати реактивів та час проведення реакції.

Суть запропонованого способу полягає в тому, що генотипування свиней здійснюють для обох генів одночасно за визначеними оптимальними параметрами ампліфікації за наступними етапами: відбирання біоптату та попередня підготовка досліджуваного матеріалу; екстракція нуклеїнової кислоти (ДНК); проведення полімеразної ланцюгової реакції; рестрикційний гідроліз; електрофорез, візуалізація та аналіз отриманих даних. При цьому використовується наступний режим ампліфікацій для обох генів (див. таблицю 1):

(19) UA (11) 45109 (13) U

Таблиця 1

## Встановлені параметри ампліфікації

Ампліфікатори з активним регулюванням температури (за об'ємом рідини в пробірці - 25мкл)			
Етапи ампліфікації	Температура	Час	Кількість циклів
початкова денатурація ДНК	95°C	1хв	1
денатурація	94°C	20с	35
відпал праймерів	60°C	20с	
синтез	72°C	20с	
фінальний синтез	72°C	5хв	1
	4°C	зберігання	

Праймери-затравки мають наступну структуру  
9 (див. таблицю 2):

Таблиця 2

## Послідовності праймерів

Локус	Послідовність	
ESR	F:	5' -CCTGTTTTTACAGTGACTTTTACAGAG-3'
	R:	5' -CACTTCGAGGGTCAGTCCAATTAG-3'
MC4R	F:	5' -TACCCTGACCATCTTGATTG-3'
	R:	5v -ATAGCAACAGATGATCTCTTG-3'

Для рестриктазного гідролізу ампліфікованих фрагментів використовують ферменти рестрикції Pvu II, для гену ESR та Taq I для гену MC4R. Зразки інкубують протягом 12-16 годин (залишають на ніч) при 37°C (або близько 3 год. додавши в два рази більше ферменту). По закінченню проводять електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції.

Під час ДНК-ідентифікації свиней за геном ESR після обробки рестриктазою Pvu II, генотип AA дає фрагмент розміром 120п.н., AB-120 п.н. і 55п.н., а генотип BB - 55п.н. відповідно (Фіг.1). Під час ДНК-ідентифікації свиней за геном MC4R після обробки рестриктазою Taq I, генотип MM характеризується

наявністю продуктів розмірами 156п.н. і 70п.н., PM - 226, 156 і 70, PP - 226п.н., відповідно (Фіг.2).

Запропонований спосіб експрес-генотипування апробований на свинях породи велика біла. Свині мали різне походження: у БАТ «Маки», ДПДГ «Христинівське» УААН - тварини місцевої селекції, у СП ТОВ «Нива Переяславщини» - датської і у БАТ агрокомбінаті «Калита» - англійської селекції. З використанням даної методики проаналізовано 119 тварин за геном MC4R та 123 тварини за геном ESR. В результаті проведених досліджень виявлено частоти генотипів (див. таблицю 3).

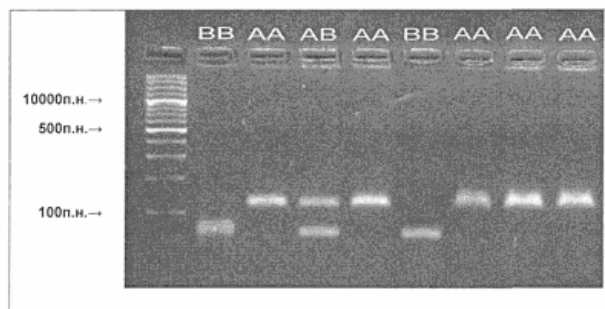
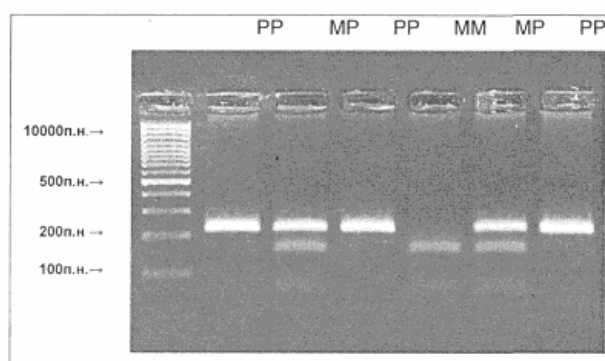
Таблиця 3

## Частоти генотипів генів ESR та MC4R у свиней великої білої в різних господарствах

Ген	N	БАТ «Маки»	N	СП ТОВ «Нива Переяславщини»	N	БАТ агрокомбінат «Калита»	N	ДПДГ «Христинівське» УААН	EN
ESR	25	AA-9 AB-14 BB-2	36	AA-27 AB-7 BB-2	62	AA-39 AB-6 55-17	-	-	123
MC4R	20	PP-13 PM-7 MM-0	30	PP-6 PM-13 MM-11	49	PP-20 PM-2S MM-1	20	PP-20 PM-0 MM-0	119

Таким чином, за допомогою нового способу експрес-генотипування свиней за генами естрогена та меланокортин-4-рецепторів були виявлені генотипи тварин, використання яких в селекції дозволить збільшити показники плідності і швидкості

росту у нащадків. Запропонований спосіб генотипування свиней (*Sus scrofa* L.) за генами ESR та MC4R одночасно, методом ПЛР-ПДРФ, за рахунок оптимізації режиму дозволяє знизити затрати реактивів та час проведення реакції.

**Φir.1****Φir.2**