



МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ



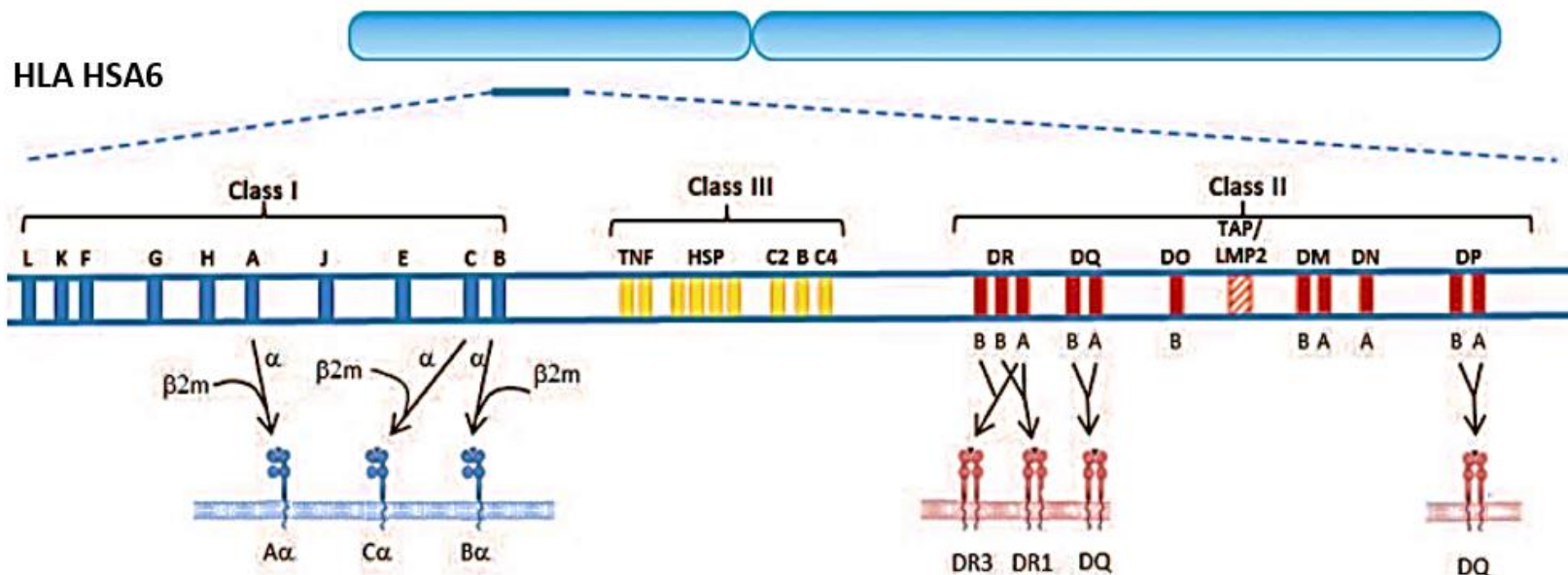
**Тетяна СУПРОВИЧ, доктор сільськогосподарських наук, професор
Заклад вищої освіти Подільський державний університет
Кам'янець-Подільський, Україна**

В Україні 2021 року було отримано 8,719 млн тон молока. Найбільшою проблемою для виробників молока є мастити корів. На них хворіють від 18.8 до 34.7% тварин, з них на клінічні форми припадає від 3.62 до 12.6%. Втрати від цього захворювання становлять близько 75 доларів на одну корову.

Породи	Всього хворих на мастит			Субклінічний мастит			Клінічний мастит		
	всього	хворих	%	всього	хворих	%	всього	хворих	%
Українська чорно-ряба молочна	4688	1431	30.5	3459	781	22.6	3219	257	7.98
Українська червоно-ряба молочна	1545	445	28.8	1545	389	25.2	1545	56	3.62
Голштейн	3324	960	28.9	1982	476	24.0	1982	157	7.92
Червона худоба	1789	337	18.8	-	-	-	-	-	-

ГЕНЕТИЧНА ОРГАНІЗАЦІЯ ГКГ ВРХ НА 23 ХРОМОСОМІ *BOS TAURUS* У ПОРІВНЯННІ З ГКГ ЛЮДИНИ

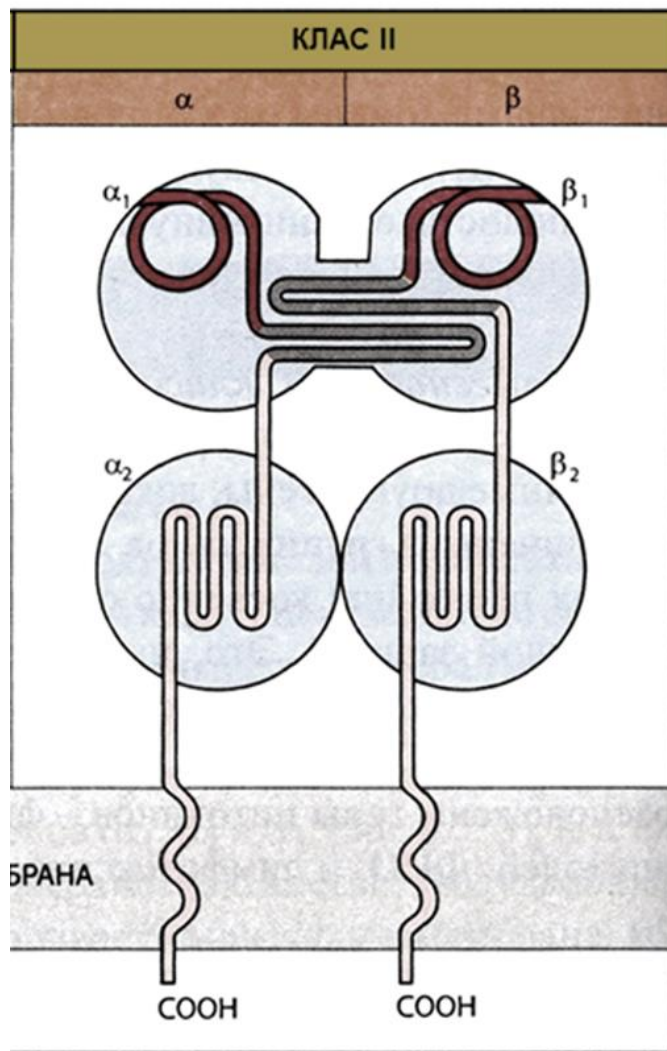
HLA HSA6



BoLA BTA23



Структура молекули антигенів класу II (Рабсон, 2006)



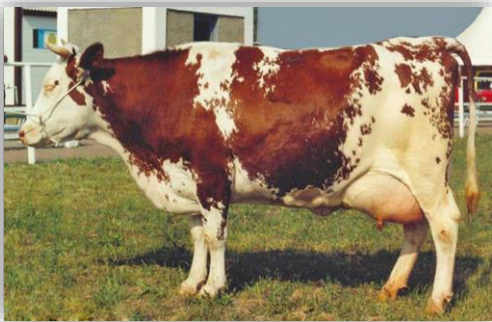
МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Пошук алелів (ДНК-маркери) асоційованих з маститом

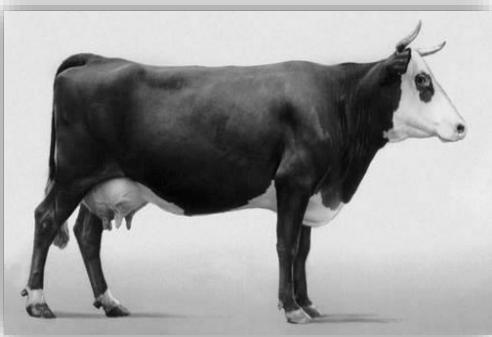


ПОРОДИ, ЯКІ ДОСЛІДЖУВАЛИСЯ

Українська чорно-ряба молочна
(УЧРМ)



Українська червоно-ряба молочна
(УЧерРМ)



Українська білоголова
(УБ)

РЕСТРИКЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ПРОДУКТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ ПЛР-ПДРФ

Для ампліфікації екзона 2 гена BoLA-DRB3 використовували:

Перший раунд

праймери HLO-30 (5'-3': TCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC)
HLO-31 (5'-3': ATTCGCGCTCACCTCGCCGCT)

Другий раунд

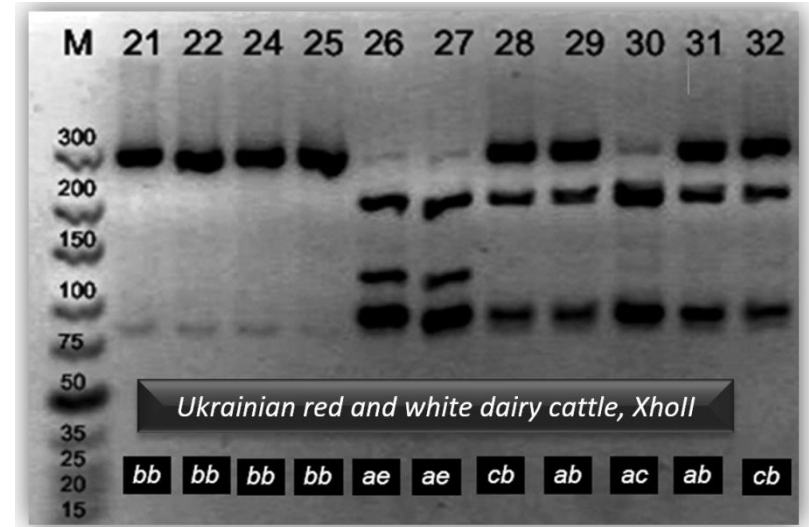
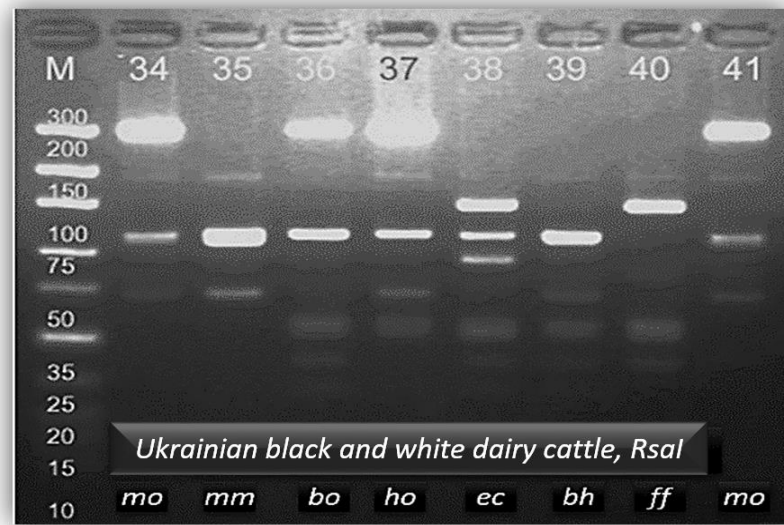
праймери HLO-30 (5'-3': TCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC)
HLO-32 (5'-3': TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC)

Ендонуклеази рестрикції

Назва	Аналоги	Сайт обмеження (5'-3')	Температура інкубації, °C
<i>RsaI</i>	-	GT↓AC	37
<i>HaeIII</i>	BsuRI	GG↓CC	37
<i>XhoII</i>	BstYI, BstX2I, PstI	(A/G)↓GATC(C/T)	37

Рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації екзона 2 гена

BoLA-DRB3 різними ендонуклеазами



Фрагменти рестрикції розділені у електрофорезі в 4% агарозному гелі:

зверху - порядковий номер зразка крові, знизу – зразок обмеження. М - маркер GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder маркер. Fermentas, Канада

СЛАЙД 8. Поліморфізм гена BOA-DRB3.2 українських порід

Алелі	УЧРМ			УЧерРМ			УБ		
	стійкі (n = 100)	чутливі (n = 62)	всього (n = 162)	стійкі (n = 59)	чутливі (n = 58)	всього (n = 117)	стійкі (n = 50)	чутливі (n = 27)	всього (n = 77)
*01	0.02	0.008	0.015	0.059	0.095	0.077	-	-	-
*02	0.03	0.016	0.025	-	-	-	0.01	0.019	0.013
*03	0.055	0.065	0.059	0.034	0.069	0.051	0.09	0.056	0.078
*04	0.025	0.016	0.022	0.009	0.017	0.013	-	-	-
*06	-	-	-	-	-	-	0.01	0.037	0.019
*07	0.05	0.048	0.049	0.093	0.216	0.154	-	-	-
*08	0.09	0.048	0.074	0.017	0.078	0.047	0.01	0.074	0.032
*09	-	-	-	0.017	0.009	0.013	-	-	-
*10	0.06	0.04	0.053	0.042	0.052	0.047	0.01	0.019	0.013
*11	0.005	0.032	0.015	0.11	0.078	0.094	0.04	0.148	0.078
*12	0.03	0.048	0.037	0.009	0.017	0.013	0.03	0.019	0.026
*13	0.075	0.016	0.053	-	-	-	0.1	0.019	0.071
*14	-	-	-	-	-	-	0.01	0.019	0.013
*15	0.01	0.032	0.019	0.017	0.017	0.017	0.08	0.093	0.084
*16	0.01	-	0.006	0.059	0.043	0.051	0.04	0.019	0.032
*18	0.01	0.048	0.025	-	-	-	0.02	0.019	0.019
*20	0.01	0.008	0.009	0.009	0.017	0.013	-	-	-
*21	0.01	0.032	0.019	-	-	-	-	-	-
*22	0.15	0.073	0.12	0.195	0.069	0.131	0.13	0.037	0.097
*23	0.02	0.016	0.019	-	-	-	0.09	0.019	0.065
*24	0.09	0.161	0.117	0.117	0.052	0.087	0.05	0.259	0.123
*25	0.01	-	0.006	0.025	0.026	0.026	-	-	-
*26	0.02	0.081	0.043	-	-	-	0.02	0.019	0.019
*27	-	-	-	0.042	0.009	0.026	-	-	-
*28	0.065	0.097	0.077	0.051	0.026	0.034	-	-	-

Поліморфізм гена BOLA-DRB3.2 українських порід (продовження)

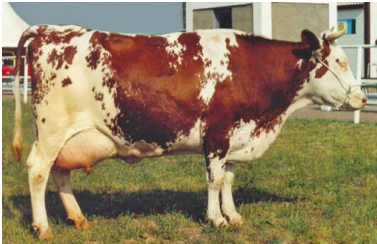
Алелі	УЧРМ			УЧерРМ			УБ		
	Стійкі (n = 100)	Чутливі (n = 62)	Всього (n = 162)	Стійкі (n = 59)	Чутливі (n = 58)	Всього (n = 117)	Стійкі (n = 50)	Чутливі (n = 27)	Всього (n = 77)
*31	0.01	-	0.006	-	-	-	-	-	-
*32	0.04	0.016	0.031	0.017	0.009	0.017	0.02	0.019	0.019
*33	-	-	-	-	-	-	0.02	0.074	0.039
*35	-	-	-	0.025	-	0.013	0.02	-	0.013
*36	0.05	-	0.031	-	-	-	0.02	0.019	0.019
*37	0.04	0.024	0.034	-	-	-	-	-	-
*39	-	-	-	-	-	-	0.02	-	0.013
*41	-	0.016	0.006	-	-	-	-	-	-
*42	0.005	0.008	0.006	0.042	0.052	0.047	-	-	-
*43	-	-	-	-	0.026	0.013	-	-	-
*45	-	-	-	-	0.035	0.017	0.04	-	0.026
*48	0.01	0.048	0.024	-	-	-	-	-	-
*54	-	-	-	-	-	-	0.03	-	0.019
*mdb	-	-	-	-	-	-	0.02	-	0.013
*iab	-	-	-	-	-	-	0.02	-	0.013
*gbb	-	-	-	-	-	-	0.02	0.019	0.019
*fbd	-	-	-	-	-	-	0.02	-	0.013
*naa	-	-	-	-	-	-	0.01	-	0.006
Всього алелів	27	24	28	20	21	22	28	20	28
Σ P(A)>5%	0.685	0.477	0.553	0.684	0.761	0.645	0.54	0.704	0.596
Середня частота	0.037	0.0415	0.0357	0.0495	0.0482	0.0455	0.0357	0.0503	0.0355

СЛАЙД 10. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФИЗМУ АЛЕЛІВ ГЕНА BOLA-DRB3.2 УКРАЇНСЬКИХ ПОРІД



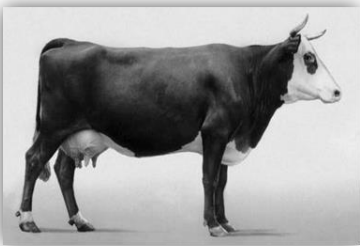
Українська чорно-ряба молочна порода.

Виявлено 28 алелів, 7 з яких мали частоту понад 5%: *03, *08, *10, *13, *22, *24 и *28. Загальна частота "значущих" варіантів становить 55,3%. Алель *22 є найбільш часто виявленою у вибірці (12%).



Українська червоно-ряба молочна порода.

Виявлено 22 алелі, 7 з яких мали частоту понад 5%: *01, *03, *08, *12, *16, *22 и *24. Їхня сумарна частота становила 64,5%. Найпоширенішим виявився алель BoLA-DRB3.2*07 (15,4%).



Українська білоголова порода.

Виявлено 28 алелів, з яких 9 виявилися "значущими" (59,6%): *03, *11, *13, *15, *22, *23 и 24. Найбільш поширеним варіантом у породі був BoLA-DRB3.2*24 (12,3%). Виявлено п'ять алелів "без встановленої номенклатури" (6,5%).

СЛАЙД 11. ВИЗНАЧЕННЯ АСОЦІАЦІЙ МІЖ АЛЕЛЯМИ ТА МАСТИТОМ

Зв'язок у парі "алель - захворювання" виявляли шляхом порівняння частот алелів у хворих і здорових корів на основі відносного ризику, який показує, у скільки разів ризик розвитку захворювання більший за наявності в генотипі певної алелі, ніж за її відсутності:

$$RR = ac/b/d$$

a, c - тварини, сприйнятливі до захворювання, які мають/не мають алель;

b, d - тварини, стійкі до захворювання, що мають/не мають алель.
Достовірність виявленої асоціації визначали за критерієм Пірсона:

$$p = 0.95 \rightarrow \chi^2 = 3.84; p = 0.99 \rightarrow \chi^2 = 6.63; p = 0.999 \rightarrow \chi^2 = 10.8.$$

ДНК-маркер, це алель, що відповідає наступним вимогам:

$$RR \geq 2 \text{ or } RR \leq -2, \chi^2 \geq 3.8 \text{ i } \chi^2_{min} = \text{true}.$$



АЛЕЛІ BoLA-DRB3.2 У КОРІВ УКРАЇНСЬКОЇ ЧОРНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ, АСОЦІЙОВАНІ З МАСТИТОМ

Алелі BoLA-DRB 3.2	$P(A)$	χ^2	RR	Тест на обмеженість вибірки (χ^2_{min})			
				$\frac{(a+b) \times (a+c)}{N}$	$\frac{(a+b) \times (b+d)}{N}$	$\frac{(c+d) \times (a+c)}{N}$	$\frac{(c+d) \times (b+d)}{N}$
*11	0.015	3.85	6.83	1.91	3.18	60.1	96.9
*13	0.053	5.65	-5.29	6.51	9.13	55.5	89.5
*18	0.025	4.81	5.25	3.06	5.14	58.9	95.1
*22	0.12	5.02	-2.52	14.9	19.0	47.1	75.9
*24	0.117	4.33	2.17	14.5	23.9	47.5	76.5
*26	0.043	7.13	4.62	5.36	9.16	56.6	91.4
*36	0.031	6.61	-14.5	3.83	5.56	58.2	93.8
*48	0,025	4.81	5.25	3.06	5.14	58.9	95.1

Примітка: У таблиці вказані алелі, для яких виконується одна з умов: $\chi^2 \geq 3.8$ або $RR \geq 2$ or $RR \leq -2$

У популяції **Української чорно-рябої молочної породи** виявлено чотири алелі, що мають тісну та достовірну асоціацію з маститом і можуть використовуватися як ДНК-маркери.

Алелі асоційовані зі сприйнятливістю до маститу

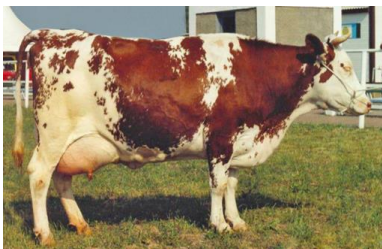
BoLA-DRB3.2*24 ($RR = 2.17$; $P(A) = 0.117$; $P < 0.05$)

BoLA-DRB3.2*26 ($RR = 4.62$; $P(A) = 0.043$; $P < 0.01$)

зі стійкістю до маститу :

BoLA-DRB3.2*13 ($RR = -5.29$; $P(A) = 0.053$; $\chi^2 = P < 0.05$)

BoLA-DRB3.2*22 ($RR = -2.52$; $P(A) = 0.12$; $\chi^2 = P < 0.05$)



АЛЕЛІ BOLA-DRB3.2 У КОРІВ УКРАЇНСЬКОЇ ЧЕРВОНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ, АСОЦІЙОВАНІ З МАСТИТОМ

Алелі BoLA- DRB 3.2	$P(A)$	χ^2	RR	Тест на обмеженість вибірки (χ^2_{min})			
				$\frac{(a+b) \times (a+c)}{N}$	$\frac{(a+b) \times (b+d)}{N}$	$\frac{(c+d) \times (a+c)}{N}$	$\frac{(c+d) \times (b+d)}{N}$
*07	0.154	8.21	3.31	17.9	22.5	40.2	40.9
*08	0.047	5.05	5.24	5.45	6.21	52.6	53.5
*22	0.131	11.11	-4.66	14.9	11.0	43.1	43.9
*24	0.087	4.52	-2.96	10.4	8.97	47.6	48.4
*45	0.017	4.21	9.83	1.98	2.15	56.0	57.0

Примітка: У таблиці вказані алелі, для яких виконується одна з умов: $\chi^2 \geq 3.8$ або $RR \geq 2$ or $RR \leq -2$

У популяції **Української червоно-рябої молочної породи** виявлено чотири алелі, що мають тісну та достовірну асоціацію з маститом і можуть використовуватися як ДНК-маркери.

Алелі асоційовані зі сприйнятливістю до маститу:

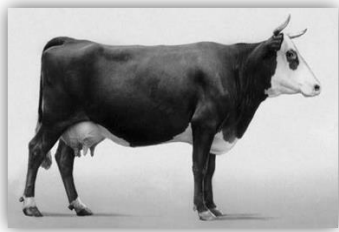
BoLA-DRB3.2*07 ($RR = 3.31$; $P(A) = 0.154$; $P < 0.01$)

BoLA-DRB3.2*08 ($RR = 5.24$; $P(A) = 0.047$; $P < 0.05$)

Алелі асоційовані зі стійкістю до маститу:

BoLA-DRB3.2*22 ($RR = -4.66$; $P(A) = 0.131$; $P < 0.001$)

BoLA-DRB3.2*24 ($RR = -2.96$; $P(A) = 0.087$; $P < 0.05$)



ВІЯВЛЕННЯ АЛЕЛІВ BOLA-DRB3.2 У КОРІВ БІЛОГОЛОВОЇ ПОРОДИ, АСОЦІЙОВАНИХ ІЗ МАСТИТОМ

Алелі BoLA- DRB 3.2	$P(A)$	χ^2	RR	Тест на обмеженість вибірки (χ^2_{min})			
				$\frac{(a+b) \times (a+c)}{N}$	$\frac{(a+b) \times (b+d)}{N}$	$\frac{(c+d) \times (a+c)}{N}$	$\frac{(c+d) \times (b+d)}{N}$
*08	0.032	8.52	4.74	1.75	3.44	25.3	46.8
*11	0.078	4.84	6.23	4.21	8.42	22.8	42.2
*13	0.071	-6.5	3.8	3.86	5.86	23.1	42.9
*22	0.097	-4.39	3.86	5.26	7.6	21.7	40.3
*23	0.065	-5.71	3.17	3.51	5.45	23.5	43.5
*24	0.123	9.69⁺	16.5	6.66	14.6	20.3	37.7

Примітка: У таблиці вказані алелі, для яких виконується одна з умов:
 $\chi^2 \geq 3.8$ або $RR \geq 2$ or $RR \leq -2$: $\chi^2 \geq 3.8$ или $RR \geq 2$ or $RR \leq -2$

У дослідженій популяції **Української білоголової породи** виявлено два алелі, що мають тісну та достовірну асоціацію з маститом і можуть використовуватися як ДНК-маркери.

Алелі асоційовані зі сприйнятливістю до маститу:

BoLA-DRB3.2*22 ($RR = 4,39$; $P(A) = 0.097$; $P < 0.05$)

Алелі асоційовані зі стійкістю до маститу:

BoLA-DRB3.2*24 ($RR = -9,69$; $P(A) = 0.123$; $P < 0.01$)

ДНК МАРКЕРИ УКРАЇНСЬКИХ ПОРІД ВРХ АСОЦІЙОВАНІ З МАСТИТОМ

Порода	Алелі BoLA-DRB3.2	
	сприйнятливість	резистентність
Чорна – ряба молочна	*24	*13
	*26	*22
Червоно – ряба молочна	*07	*22
	*08	*24
Білоголова	*22	*24

Поширення алелів BoLA-DRB3.2 в зв'язку із резистентністю (сприйнятливістю) до лейкозу у корів українських молочних порід

Породи			червоно- ряба	чорно-ряба
Алелі BoLA-DRB3.2	що зумовлюють резистентність до лейкозу (Р)	*7	12	9
		*11	8	2
		*23	0	7
		*28	3	17
		всього	23	35
		%	29,5	16,2
	що зумовлюють сприйнятливіс ть до лейкозу (С)	*8	3	11
		*16	4	10
		*22	10	18
		*24	7	38
		всього	24	77
		%	30,8	35,6
	Нейтральні (Н)	всього	31	104
		%	39,7	48,1
Зразки крові			39	108

Примітка: нейтральні алелі: чорно-ряба порода: *01,*02,*03,*04,*06,*09,*10,*12,*13,*14,*15,*18,*19,*20,*21,*25,*26,*31,*32,*36,*37,*41,*42,*48,*51;
червоно-ряба порода: *1,*3,*4,*9,*10,*12,*15,*20,*25,*27,*35,*42,*43,*45.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ЗАХВОРЮВАНOSTІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ НА НЕКРОБАКТЕРІОЗ



Мікробні асоціації при некробактеріозі корів

Показники	Виділенні мікроорганізми	
	кількість	%
Всього досліджено проб	32	-
Кількість проб в яких виявлені збудники інфекції	32	100,0
Всього виявлених мікроорганізмів, в тому числі:	81	-
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	29	90,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	65,6
<i>Clostridium perfringens</i>	11	34,3
<i>Escherichia coli</i>	7	21,8
<i>Streptococcus spp.</i>	5	15,6
Інші	8	25

Біологічна проба при некробактеріозі





Рис. 1. Фрагменти електрофореграм продуктів ампліфікації гена BoLA-DRB3, отриманих на ДНК корів різними рестриктазами

для оцінки довжин фрагментів використано маркер (M) молекулярних мас «GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder» фірми «Fermentas», Литва. Зверху вказані номери зразків крові, знизу – варіанти ДНК-патернів.

Біометричні показники алелів BoLA-DRB3 корів української чорно-рябої молочної породи в зв'язку із захворюваністю на некробактеріоз (n = 293)

Алелі BoLA-DRB 3.2	Частота $P(A)$	Критерій відповідності χ^2	Ризик захворюваності RR	Алелі BoLA-DRB 3.2	Частота $P(A)$	Критерій відповідності χ^2	Ризик захворюваності RR
*01	0,0478	4,882	-2,768	*22	0,0990	16,817	-4,224
*02	0,0119	0,455	0,569	*23	0,0580	23,523	6,885
*03	0,0631	15,913	-6,836	*24	0,1195	1,456	1,394
*04	0,0102	0,147	0,716	*25	0,0051	0,829	2,915
*05	0,0017	0,696	-2,096	*26	0,0205	1,317	-2,140
*06	0,0119	0,777	1,954	*28	0,0751	0,115	0,892
*07	0,0444	0,474	0,744	*29	0,0034	0,068	1,445
*08	0,0700	0,377	0,808	*31	0,0034	0,068	1,445
*10	0,0324	0,011	1,052	*32	0,0154	1,348	-2,488
*11	0,0256	0,380	0,709	*35	0,0051	0,829	2,915
*12	0,0222	1,798	-2,393	*36	0,0239	2,318	-2,648
*13	0,0273	0,055	1,129	*37	0,0239	0,022	1,086
*14	0,0119	2,754	3,717	*39	0,0034	2,903	7,321
*15	0,0102	0,147	0,716	*41	0,0068	0,427	-2,100
*16	0,0734	34,082	8,493	*42	0,0051	0,073	0,718
*18	0,0205	5,997	4,595	*45	0,0102	1,494	-3,542
*19	0,0034	2,903	7,321	*48	0,0068	0,427	-2,100
*20	0,0034	0,068	1,445	*51	0,0068	5,846	13,403
*21	0,0171	0,004	0,960				

У дослідженій популяції **української чорно-рябої молочної породи** виявлено два алелі, що мають тісну та достовірну асоціацію з некробактеріозом і можуть використовуватися як ДНК-маркери.

Алелі асоційовані зі сприйнятливістю до некробактеріозу:

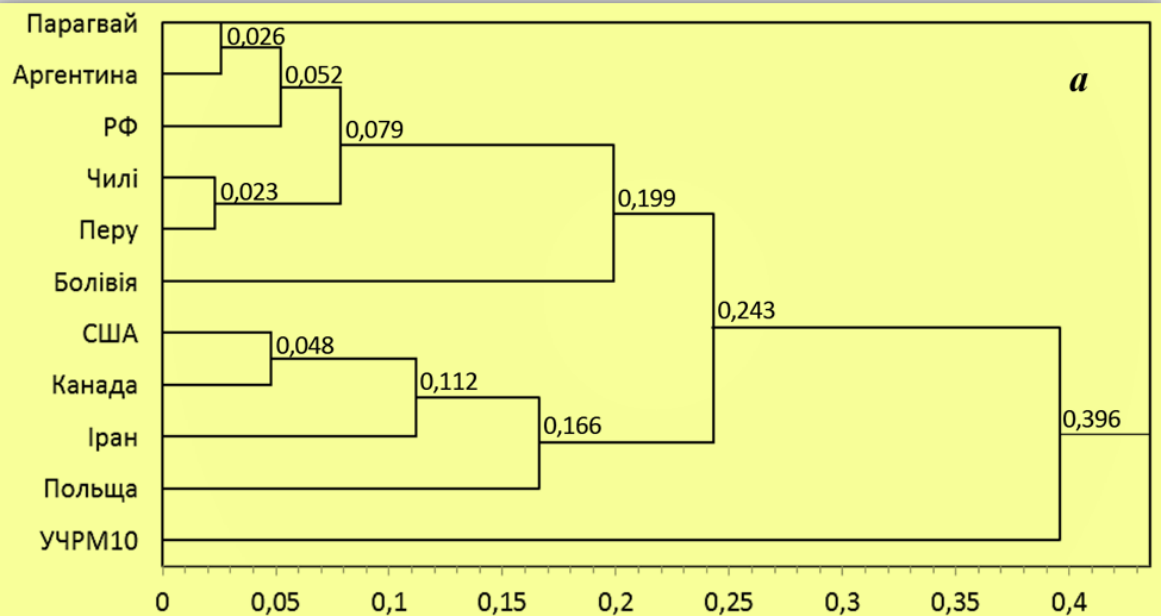
BoLA-DRB3.2*16 ($RR = 24,1$; $P(A) = 0.053$; $P < 0.05$)

BoLA-DRB3.2*23 ($RR = 4,41$; $P(A) = 0.044$; $P < 0.05$)

Алелі асоційовані зі стійкістю до некробактеріозу:

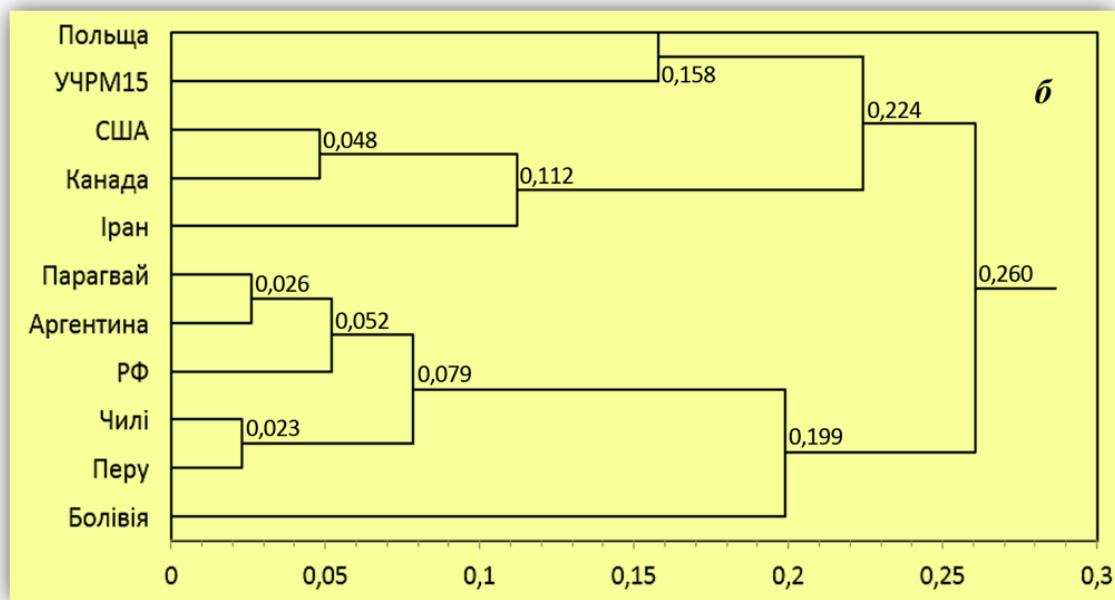
BoLA-DRB3.2*03 ($RR = -7,71$; $P(A) = 0.053$; $P < 0.01$)

BoLA-DRB3.2*22 ($RR = -3,57$; $P(A) = 0.079$; $P < 0.01$)



Дендрограми
генетичних
взаємовідносин
між популяціями
УЧРМ10 (**a**),
УЧРМ15 (**б**) і
дослідженими
стадами ВРХ за
даними
генетичних
дистанцій

Cophenetic
Correlation: $R_a = 0,757$,
 $R_b = 0,631$; DF = 53; P
= 0. Distance Matrix;
Cluster Method =
Group Average
(UPGMA)





**Thank you for
your attention!**