

МИКРОСАТТИЛЛЕТ ДАРААЛЛЫГ АШИГЛАН АДУУНЫ (*Equus caballus*) ЭЦЭГ ТОДОРХОЙЛСОН ДҮН

Э.Батмагнай¹, Б. Гантуяа^{1,2}, Б.Даваасүрэн¹, Б.Баттөр¹, Б.Батцэцэг¹

1-Мал эмнэлгийн хүрээлэн, Молекул генетикийн лаборатори
2- МУИС, Биологи Биотехнологийн сургууль

bata07@gmail.com

ХУРААНГУЙ

Манай оронд адууны хулгайг илрүүлэх болон цэвэр угшлын адууны үр төлийн худалдаа наймаанд жинхэнэ гарвалыг шалгах зэргээр адууны эцэг, үр төлийн хамаарлыг тогтоох шаардлага сүүлийн жилүүдэд эрс нэмэгдсэн. Өндөр полиморф чанартай ДНХ дараалал дахь давталтат элементүүд нь бодгаль хоорондын ялгаа, адууны удмын хамаарлыг тогтооход хамгийн тохиромжтой бөгөөд өртөг зардлын хувьд хямд арга юм. Энэхүү судалгааны нь адууны үр төлийг генетикийн хамаарлаар тогтоож адууны эцэг тодорхойлох арга зүйг боловсруулах зорилгоор хийгдлээ. Нийт шилэн сонголот хийж шалгарсан 8 микросаттеллит маркерүүдийг ашиглан 4 азарга, 6 гүү, 9 үрээ нийт 19 адууны эцэг үр төлийн харьцааг тодорхойллоо. Судалгааны үр дүнгээс үзэхэд адууны эцэг тодорхойлох арга зүй нь цаашид манай оронд хэрэглэгдэх бүрэн боломжтой нь харагдаж байна.

ТҮЛХҮҮР ҮГ: Полиморфик микросаттиллет локус, ПГУ, маркер

ОРШИЛ

Монгол адууны цусны уургийн полиморфизмын судалгаагаар Галшар, Тэс, Дархад, Мянгад, Шанх омгийн адуунууд генетик тогтолцооны хувьд өөр хоорондоо ялгагдах бие даасан үүлдэр бус, харин нэгэн үүлдрийн доторх омгууд болохыг харуулсан. Гэхдээ Монгол адууны цусны улаан цогцосын болон ийлдсийн 33 локусыг шинжилж үзэхэд тэдгээрийн 63,6 хувь буюу 0,636 нь полиморф, 0,364 нь мономорф болохыг тогтоожээ. Энэ нь монгол адууны популяцийн генетик хувьсал хангалттай түвшинд байгааг харуулж байна. (1) Адуу сонирхогчид, уяачид болгон өөрийн гэсэн хурдан угшил үүлдрийн адуун сүрэгтэй болохыг эрмэлзэж, нутгийн монгол үүлдрийн адууг аль нэг гадаад үүлдрийн адуутай эрлийзжүүлэн, шинэ үүлдрийн адуу гаргасан мэтээр “Орчин цагийн монгол адуу” хэмээн нэрлэх явдал газар авч байна. Шинээр гаргаж байгаа олон үүлдэрүүд жинхэнэ үүлдэр үү эсвэл угшил уу гэдгийг хянаж үнэн бодитой хариулт өгөхөд орчин үеийн дэвшилтэд арга зүй түүний дотор молекул генетикийн аргыг өөрийн оронд нэвтрүүлэх шаардлагатай байна. Манай оронд адууны хулгайн гэмт хэрэг, адуу алдагдах явдал их гарсаар байна.

Зарим тохиолдолд малчид адуугаа алдаад 2-3 жилийн дараа олдог боловч өөр өмчлөгчтэй болчихсон байх тохиолдол гардаг. Үүнээс шалтгаалан малчид, уяачдын дунд маргаан үүсдэг ба шүүх дээр ийм төрлийн маргааныг шийдвэрлэх хэрэгцээ байнга гарч байдаг. Тиймээс малчид, уяачид алдагдсан адууныхаа генийн шинжилгээг хийлгэж эцэг тодорхойлуулснаар маргаанаа эцэслэн шийдвэрлүүлэх боломжтой болж байгаа юм. Сүүлийн үед Монголд адуу сонирхогч уяачид спорт-уналгын чиглэлээр цэвэр угшил, үүлдрийн азарганы үр төлийг ихээр наймаалцах болсон. Ийнхүү өөр хоорондоо адууны худалдаа хийхдээ худалдан авч байгаа уяач нь өндөр үнээр худалдан авч байгаа адуу, унага маань үнэхээр тухайн хурдан азарганы үр төл мөн эсэхэд найдвартай баталгаа авах зорилгоор адууны эцэг тодорхойлуулах шаардлага их гарч байна. Эдгээр бодит үндэслэлээр бидний судалгааны ажлын зорилго нь адууны үр төлийг тогтоож, адууны эцгийг өндөр нарийвчлалтай тодорхойлох арга зүйг боловсруулан дээрх тохиолдлуудад шинжлэх ухааны үндэстэй үнэн зөв хариулт өгөхөд оршиж байна. 1994 онд Швед улсын эрдэмтэд (TG)_n ба (TC)_n гэсэн танигч молекулуудыг

ашиглан геномын сангаас хайлт хийж микросателлит ДНХ-г ялган авч 10000 рекомбинант клониос (TG)_n бүхий 30 клон, (TC)_n бүхий 4 клон олж нуклеотидын дарааллыг нь тодорхойлсноор нилээд олон микросателлитуудыг илрүүлжээ. Мөн аллелийн уртын ялгаа нь давталтын нэгж хэдэн нуклеотидоос тогтохоос хамаарч 2,4 ба 6 нуклеотидоор ялгагдаж буйг тодорхойлсон байна. (2)

Япон улсын эрдэмтдийн 20 микросателлит локус ашиглан явуулсан ази, европын адууны генетик хамаарлыг судалсан судалгааны ажлын үр дүнд монгол адуу генетикийн олон янз байдлаараа хамгийн өндөр мөн япон адуунд олдсон бүх аллелиуд монгол адуунд байсан. Эндээс Япон адуу нь Монгол адуунаас үүсэлтэй байж болох юм гэсэн таамаглалыг дэвшүүлсэн (3).

Markuland нар (TG)_n бүхий 9 клон (HTG₇₋₁₅) ялган авч нуклеотидын дарааллыг тогтоосноор 12-19 удаа давтагдсан дарааллуудыг илрүүлсэн. (2)

Guerin нар HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7, HMS8 микросателлитуудыг (TG)₁₀, (TC)₁₀ пробуудыг ашиглан хайлт хийснээр олж илрүүлжээ.(4)

Naeringen нар болон Breen нар (CA)₁₇ микросателлит агуулсан VHL20 ба (AAAG)₁₂ микросателлит агуулсан MPZ001-ийн талаарх эрдэм шинжилгээний өгүүлэл хэвлүүлжээ(5), (6).

Эдгээр бүх микросателлит ДНХ нь полиморф чанартай бөгөөд микросателлит бүрд илэрсэн

аллелийн тоо нь уургийн локус дахь илэрсэн аллелиас олон байна (7), (8).

СУДАЛГААНЫ АРГА ЗҮЙ

Эхний шинжилгээнд 2 үрээ (хар үрээ, цавьдар үрээ), 1 азарга (Халтар азарга), 1 гүүний (Хүрэн гүү) нийт 4 цусны дээж ирүүлсэнийг хоёр дахь шинжилгээнд 3 үрээ, 1 азарга, 1 гүүний эцэг үр төлийн хамаарлыг эцэст нь Хэнтий аймгийн Баянхутаг суманд байх адуун сүргээс нийт 10 адууг сонгон авч шинжиллээ. Цусны дээж бүрээс 50 микролитрийг авч цусны эдийн ДНХ ялгах лабораторийн протоколын дагуу ДНХ ялган Nanodrop 1000 багажийг ашиглан концентраци, цэвэршилтийг шалгав.

ПГУ-ын арга зүй. Микросателлит тус бүрийн шууд ба урвуу праймерийг ашиглан ПГУ-ыг явуулсан бөгөөд урвалын холимогоор AmpliTaq® Gold PCR Master mix-ийг хэрэглэсэн. Урвалын холимогийг дараах байдлаар бэлтгэв. Үүнд: 200 нгр ДНХ дээж, 12,5 мкл AmpliTaq® Gold PCR бэлэн холимог, шууд ба урвуу праймер тус бүр 1,5 мкл нийт эзлэхүүн 25 мкл. Урвал тус бүрийн праймерийг хүснэгт 1-т үзүүлэв.

ABI 9700 загварын ПГУ-ын машиныг ашиглан 95⁰С-т 8 минут анхдагч денатураци, 95⁰С- 30 секунд, 59⁰С- 30 секунд, 72⁰С- 1 минутыг 35 мөчлөг явуулж эцсийн олшруулалтын шатыг 72⁰С-т 10 минут явуулав.

Хүснэгт 1

Судалгаанд хэрэглэгдсэн микросателлит локусууд (9)

№	Микросателлит локус(адуу)	Хромосомын байрлал	ПГУ-ын бүтээгдэхүүний хэмжээ
1	VHL20	30	89-107
2	ASB17	15	89-131
3	HTG10	21	89-171
4	ASB2	2	222-256
5	AHT5	8	126-144
6	HMS6	4	151-169
7	HTG4	9	127-139
8	AHT4	24	144-164

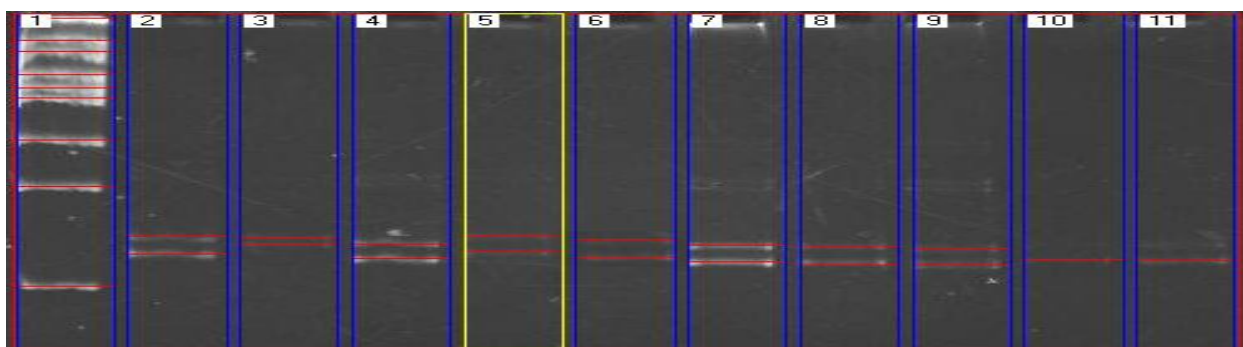
ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг 1%-ийн агарозын гель, 16%-ийн полиакриламидын гель дээр гүйлгэж этидиум бромидоор будан үр дүнг шалгалаа. Biosens Gel

Imaging System програмыг ашиглан ПГУ-ын бүтээгдэхүүний уртын хэмжээг тодорхойлов.

СУДАЛГААНЫ ҮР ДҮН

Судалгааны нийт 19 адууны цусны дээжээс ДНХ ялгаж концентраци болон цэвэршилтийг NanoDrop спектрофотометрээр хэмжиж үзэв. ДНХ концентраци 44,5 ng/μl-441,7 ng/μl хооронд гарсан бөгөөд цэвэршилт нь (260/280) нь 1.57-1.91 хооронд гарав. VHL20, HTG10, ASB17, ASB2, АНТ5, HMS6, HTG4, АНТ4 нийт 8 микросателлит локусуудийг танигч

праймер ашиглан ПГУ-аар ДНХ-ийг олшруулсан үр дүнг полиакриламидын гель гүйлгэж (зураг 2) харьцуулан үзэхэд VHL20, HTG10, ASB17, ASB2, HMS6, HTG4 локус дахь аллелийн ялгаа тод АНТ4, АНТ5 локусуудын ялгаа бага харагдаж байв. Гэвч “BioSens Gel Imaging System” програмд уншуулахад АНТ4, АНТ5 локусуудын ялгаа илэрсэн.



Зураг 1. HTG4 локуст илэрсэн аллель тус бүрийн хэмжээ “BioSens Gel Imaging System” програмд уншуулсан байдлаар. 1-маркер, 2-11 аллелиуд (хүснэгт 2)

HTG4 локуст илэрсэн аллелиуд						Хүснэгт 2
Гель дахь дугаараар	2	3	4	5	6	
Адууны нэр	Англи хар азарга	Сартай хар	Эрлийз бор гүү	Хар даага	Хүрэн гүү	
Аллель	DI	IG	GC	IE	HE	
Гель дахь дугаараар	7	8	9	10	11	
Адууны нэр	Үнэт хүрэн азарга	Сартай хээр	Бандагай хүрэн гүү	Эрлийз Хээр гүү	Хар байдас	
Аллель	GB	GA	FA	CC	CC	

Эрлийз цагаан бор гүүний үрээ Сартай хар морь нь Англи хар азарганы үр төл мөн болохыг, Хар даага нь Хүрэн гүү болон Англи хар азарганы үр төл мөн болохыг, Сартай хээр нь Бандгай хүрэн гүү ба Үнэт хүрэн азарганы үр төл мөн болохыг, Хар байдас нь Эрлийз хээр гүү ба Үнэт хүрэн азарганы үр төл болохыг, Хар үрээ нь Халтар азарга ба Хүрэн гүүний

үр төл болохыг, Цавьдар үрээ нь Халтар азарга ба Хүрэн гүүний үр төл мөн болохыг Хонгор халзан үрээ нь Хонгор азарга ба Хар гүүний үр төл болохыг хээр үрээ, хүрэн үрээ нь тэдгээрийн үр төл биш болохыг тус тус ПГУ-д олширсон удамшлын материалын тохироонд үндэслэн тодорхойлов.

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Адууны эцгийг баталгаажуулахад микросателит арга нэвтрэхээс өмнө цусны бүлэг тодорхойлох аргыг өргөн хэрэглэдэг байлаа. Хамгийн анх хүн, мал, бусад зүйл дээр эцэг тодорхойлох тест 1950-1960 онд цусны бүлэг тодорхойлох аргаар хөгжсөн. Цусны бүлэг тодорхойлох арга нь цусны бүлгийн болон биохимийн 27 маркер ашигладаг ба бүх маркер бүх адуунд тохирдоггүй. Тодорхой хэсэг адуунд зарим нэг маркер тохирдог байсан учир үнэмшил багатай мөн их өртөг зардалтай арга юм. Бидний туршин сорьсон ДНХ

тестийн арга нь цусны бүлэг тодорхойлох аргаас олон давуу талтай. Өнөө үед 12 ДНХ системийн стандарт тест голчлон хэрэглэгдэж байгаа ба өөр эцэгтэйг илрүүлэх боломж 99.99% байна. ПГУ-ын бүтээгдэхүүний хэмжээг тодорхойлоход бодгаль тус бүрт аллелиуд өөр хоорондоо харилцан адилгүй гарч байна. Микросателлитүүд Менделийн хуулийн дагуу удамшдаг ба нэг аллелийг эхээс, нөгөө аллелийг эцгээс авдаг учраас тооцоолоход харьцангуй хялбар, үр дүнтэй арга юм.

ДҮГНЭЛТ

Хурдан үүлдрийн азарганы үр төл мөн эсэхийг тогтооход бидний туршин сорьсон ДНХ тестийн аргыг ашиглан тогтоох боломжтой юм. Мөн адуутай холбоотой өмчлөгчдын маргааныг эцэслэн шийдүүлэхэд тохиромжтой арга тул энэ зорилгоор цаашид шинжилгээнд ашиглах бүрэн боломжтой.

АШИГЛАСАН НОМ ХЭВЛЭЛ

1. Жанчив.Ч., “Популяцийн генетик”, УБ 2008.
2. Markland. S., Ellegren.H., Ericson.S., Sandberg.K., Anderson.L., “Parentage testing and Linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites”, Animal Genetics, 25, p 19-23, 1994.
3. Tozaki.T., Takezaki., Hasegawa.T., Ishida.N., Tomita.M., “Microsatellite variation in Japanese and Asian Horses and Their Phylogenetic Relationship Using a European Horse Outgroup”, Journal of Heredity, p 374-380, 2003.
4. Guйrin G, Bertaud M, Amigues Y. “Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS4, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8” Anim Genet. 1994 Feb;25(1):62.
5. H van Haeringen^{1,*}, A T Bowling², M L Stott², J A Lenstra³, K A Zwaagstra³ “A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20” Animal Genetics Volume 25, Issue 3, 207, June 1994
6. M Breen^{*}, P Downs, Z Irvin, K Bell “An equine tetranucleotide repeat: microsatellite MPZ001” Animal Genetics Volume 25, Issue 2, 123, April 1994
7. Maeda. Y., Hashiguchi Ts., “The present studies on DNA analysis in the Horse” . Vol.6, No.2 p 31-53, 1994.
8. Гантуяа. Б, Батцэцэг. Б, Баярлхагва. Д “ПГУ ашиглан адууны эцэг тодорхойлох нь” 2012 он.
9. Даваасүрэн.Б., Батмагнай. Э, “Адууны эцэг тодорхойлох шинжилгээ”, 2010. МЭХ-ийн эрдэм шинжилгээний бүтээл.

EQUINE PARENTAGE TESTING METHOD USING MICROSATELLITES

Batmagnai E¹, Gantuya B^{1,2}, Davaasuren B¹., Battur B¹. and Battsetseg. B¹

Since 1997 blood type parentage testing method has been gradually replaced by more reliable and faster DNA testing method. In recent years the need of equine parentage test has been increased in Mongolia to recognize horsenapping and to verify reliability in the market of purebred offspring. Highly polymorphic microsatellite locus is the most convenient and the cheapest approach (repeated elements in the sequence) for distinguishing among individuals and relation among flock of horse. The main objective of the study was to work out parentage testing method and to test the method on different samples. Since we started parentage testing we have tested 4 stallions, 6 mares, 9 foals, total 19 horses for identifying parentage relations using 8 microsatellite markers. To summarize from these results it has been verified that the parentage testing method is applicable for further investigations. The approach, which is based on the theory that foal inherits an allele from each parents has high precision. The advantage of the DNA testing method compared with blood typing method is that we can isolate DNA from any tissues.

Key words: polymorphic microsatellite locus, PCR, marker.