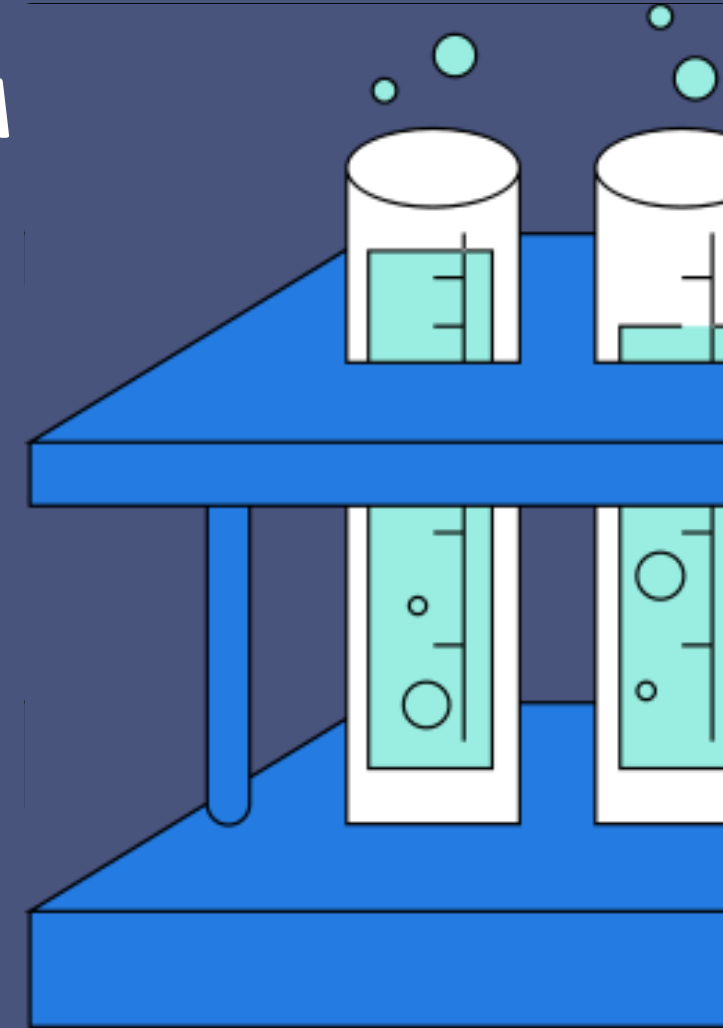
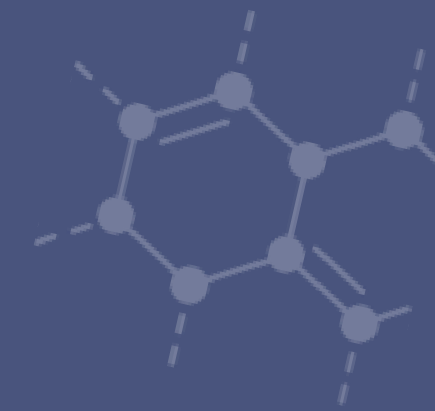
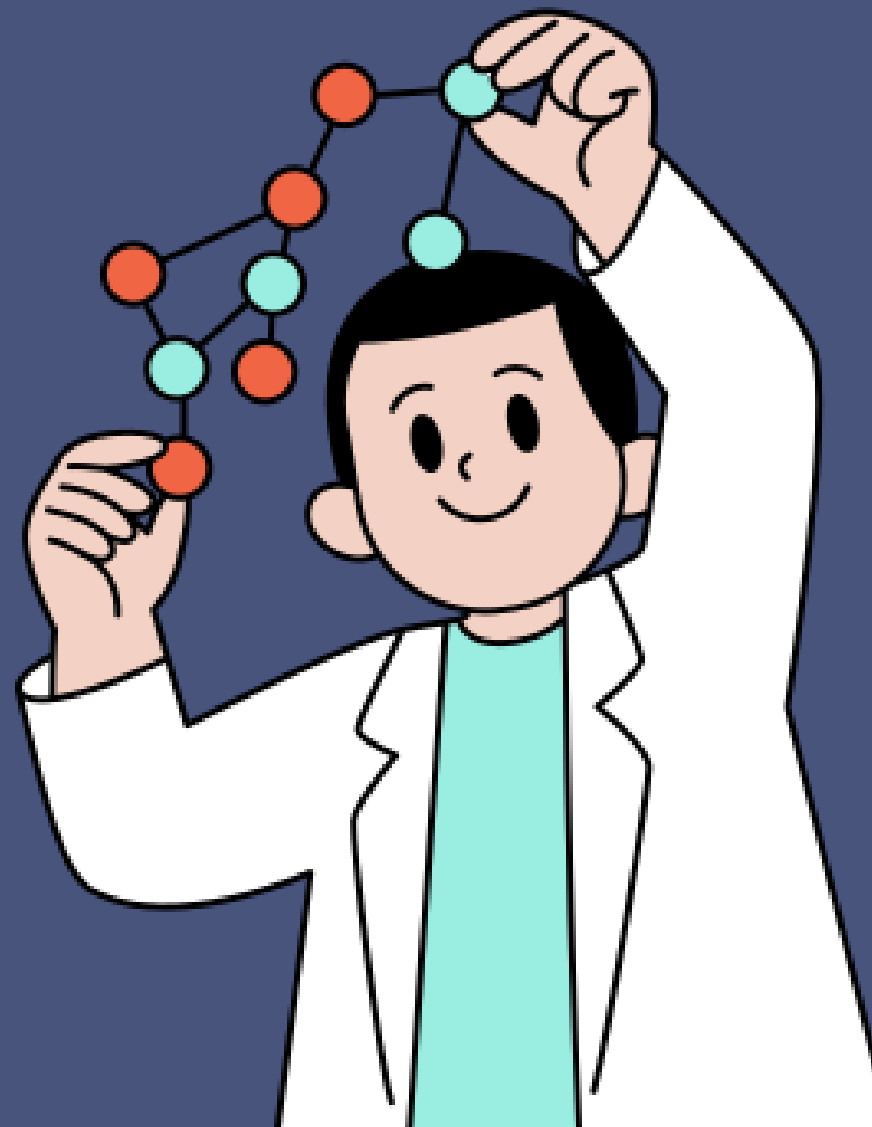
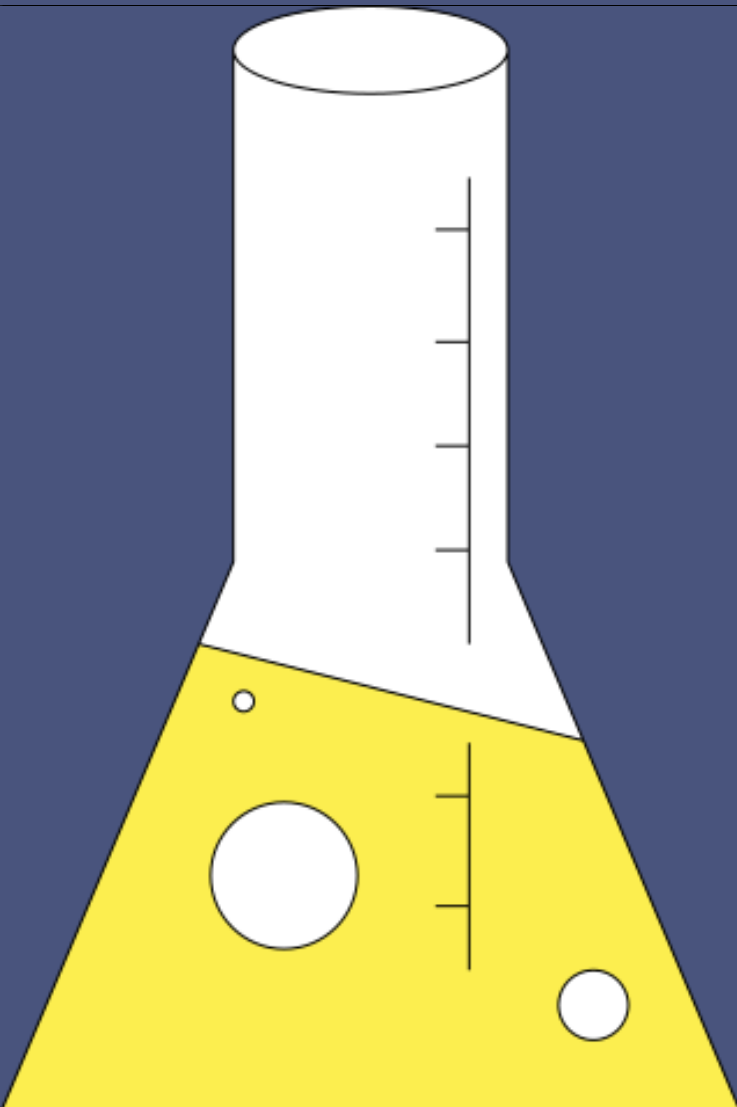


II Всероссийская Школа-конференция «Клеточные и геномные технологии
для совершенствования сельскохозяйственных животных»

ВНИИГРЖ

Поиск генетических ассоциаций с качеством
спермы быков-производителей
м.н.с. Богданова С.С.




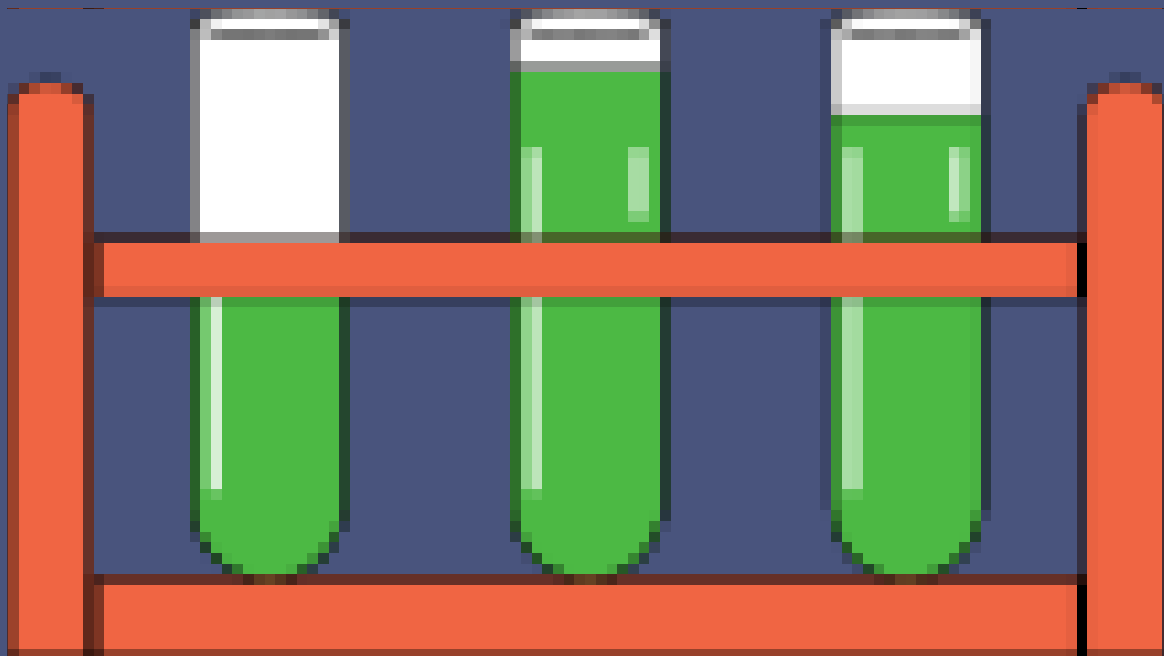
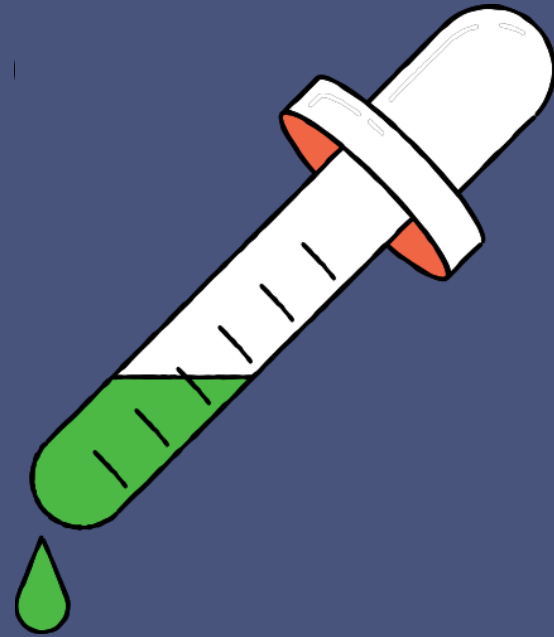


Материалы и методы

Сперму 53 быков получали в ОАО «Невское». Всего было проанализировано 110 образцов спермы быков.

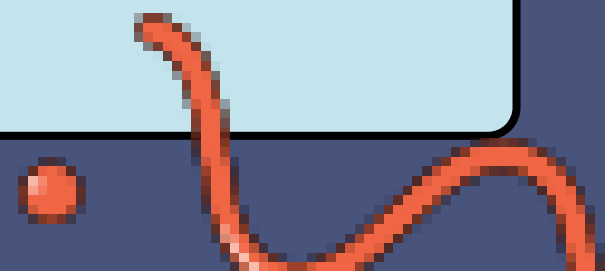
Объем эякулята определяли мерным стаканом. Концентрацию и прогрессивную подвижность сперматозоидов определяли с помощью Аргус-CASA (АргусСофт, Россия) - методика «Подвижность» и микроскопа Motic BA 410 (Motic, Китай). Морфологию сперматозоидов изучали, используя набор для дифференцированного окрашивания биопрепаратов Дифф-Квик («АБРИС+», Россия), с помощью Аргус-CASA, - методика МОРФОЛОГИЯ и микроскопа Motic BA 410. Целостность мембран определяли при помощи окрашивания образцов красителем нигрозин-эозин (Диаэм, Россия) и микроскопа Motic BA 410. Дыхание сперматозоидов определяли на приборе Эксперт-001 с помощью амперометрического датчика для измерения скорости клеточного дыхания. Функциональное состояние энергетической системы оценивали по реакции дыхания на добавление разобщителя дыхания и фосфорилирования – динитрофенола (2,4-ДНФ) (Мороз, Шапиев, 1978; Шапиев и др., 1989). Полярографический метод оценки сперматозоидов основан на способности 2,4-ДНФ усиливать дыхание в сперме с хорошо сопряженным дыханием и фосфорилированием и отсутствием стимуляции дыхания в разобщенной системе.





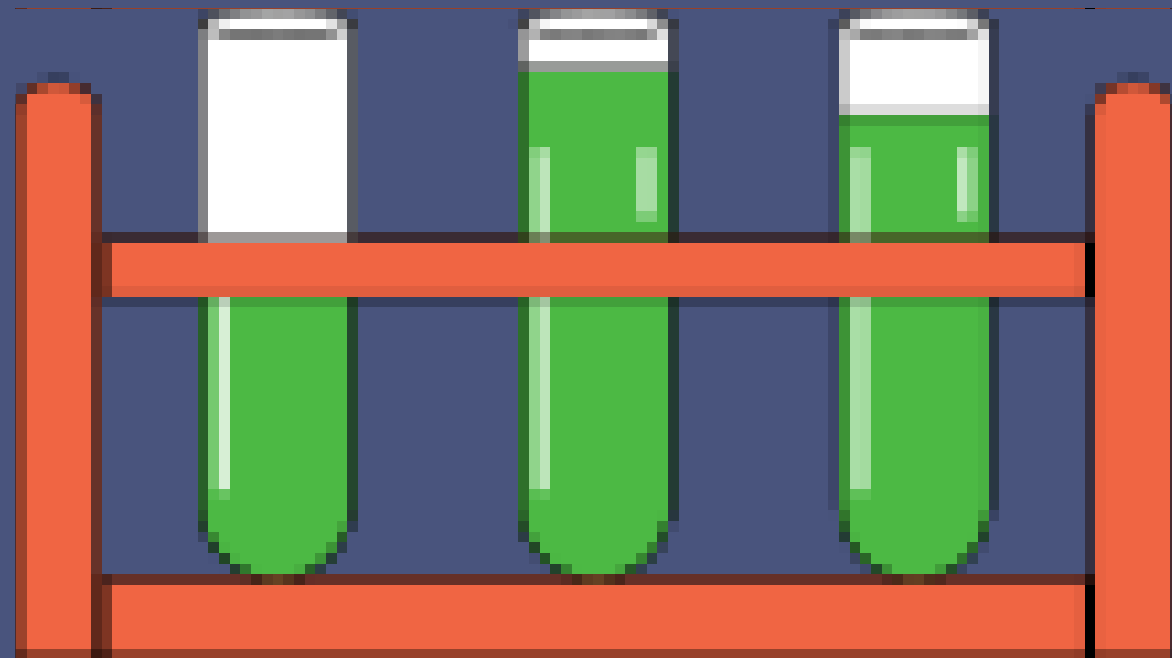
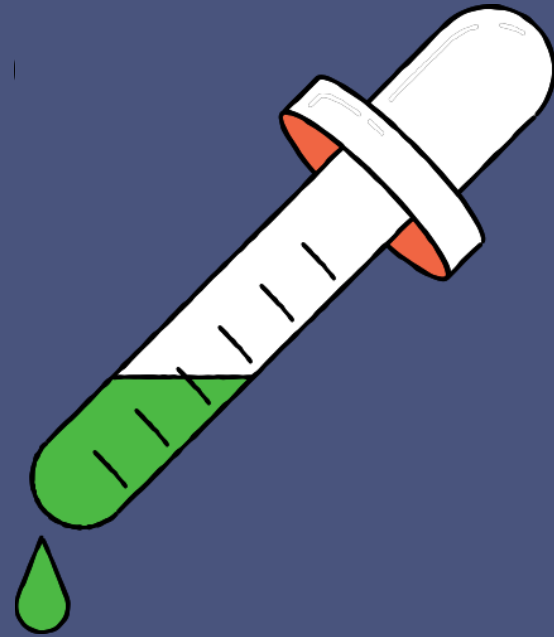
Все показатели качества спермопродукции, характеризуются высокой индивидуальной изменчивостью. В нашей выборке были животные как с очень хорошим качеством спермы, так и с плохим. Были животные, у которых качество спермы сильно варьировало. Полученные данные позволили провести первоначальную оценку влияния генов на сперматогенез и качество спермы.

Для анализа связи показателей качества спермы с полиморфизмом SNP выбирали образцы с лучшим качеством от каждого самца. Анализ связи показателей качества спермы с SNP проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа в программе IBM Statistics.



ДНК для проведения генетического анализа выделена из спермы фенольно-хлороформным методом. При выделении использовался меркаптоэтанол.

Секвенирование по Сенгеру проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer с помощью коммерческих наборов Kit BigDye[®] Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя. Выравнивание и обработка сиквенсов проводилось с помощью программного обеспечения Mega-6





В ходе GWAS анализа были выбраны кандидатные гены, которые

могут отвечать за качество спермы быков

NME7

Ген NME7 кодирует семейства не метастатически экспрессируемых нуклеозиддифосфаткиназ.

Мутации в этом гене могут быть связаны с венозной тромбоэмболией.

NME8

Ген NME8 кодирует белок с N-концевым тиоредоксиновым доменом и тремя C-концевыми доменами нуклеозиддифосфаткиназы.

Мутации в этом гене связаны с первичной целиарной дискенезией 6 типа.

ESR

Ген ESR кодирует рецептор эстрогена и фактор транскрипции, активируемый лигандом.

Белок, кодируемый этим геном регулирует транскрипцию многих индуц. Эстр. генов, участвующих в росте, метаболизме, развитии рака мж, половом созревании.



Частота генотипов и аллелей по генам *NME7*, *NME8* и *ESR* приведена в таблице 21



Таблица 21. Частота генотипов генов *NME*, *NME8*, *ESR*

Генотип	Частота генотипов, %		
	GG	GT	TT
<i>NME7</i> 474 G>T	80,0	12,0	8,0
<i>NME7</i> 469 C>T	88,0	4,0	8,0
<i>NME7</i> 257 G>A	84,0	16,0	0
<i>NME7</i> 171 G>A	68,0	32,0	0
<i>NME8</i> 612 T>C	10,0	10,0	80,0
<i>NME8</i> 613 G>A	86,7	6,7	6,6
<i>ESR</i> 616 T>A	27,8	72,2	0
<i>ESR</i> 623 C>A	19,4	80,6	0
<i>ESR</i> 665 G>C	66,7	33,3	0
<i>ESR</i> 696 G>C	2,9	31,4	65,7

Видно отсутствие генотипов AA по *NME7* 257 G>A, *NME7* 171 G>A, *ESR* 616 T>A и *ESR* 623 C>A, а также генотипа CC по *ESR* 665 G>C.

Достоверных связей таких показателей качества спермы быков, как объем эякулята, концентрация и общее количество сперматозоидов, подвижность сперматозоидов быков с анализируемыми SNP не обнаружено. Исключение составили SNP *NME7* G>A и *ESR 665* G>C по которым обнаружена достоверная связь с концентрацией сперматозоидов быков ($p < 0,05$) (рис.11 и 12).

Выявлено достоверное влияние генотипа по *NME7* 474 G>T на количество повреждений в области хвоста и шейки сперматозоидов ($p < 0,001$) и количество нормальных сперматозоидов ($p < 0,05$) (рис.13 и 14).





Рис. 11 Эффект замещения аллеля G на A в SNP NME7 G>A на концентрацию сперматозоидов быков

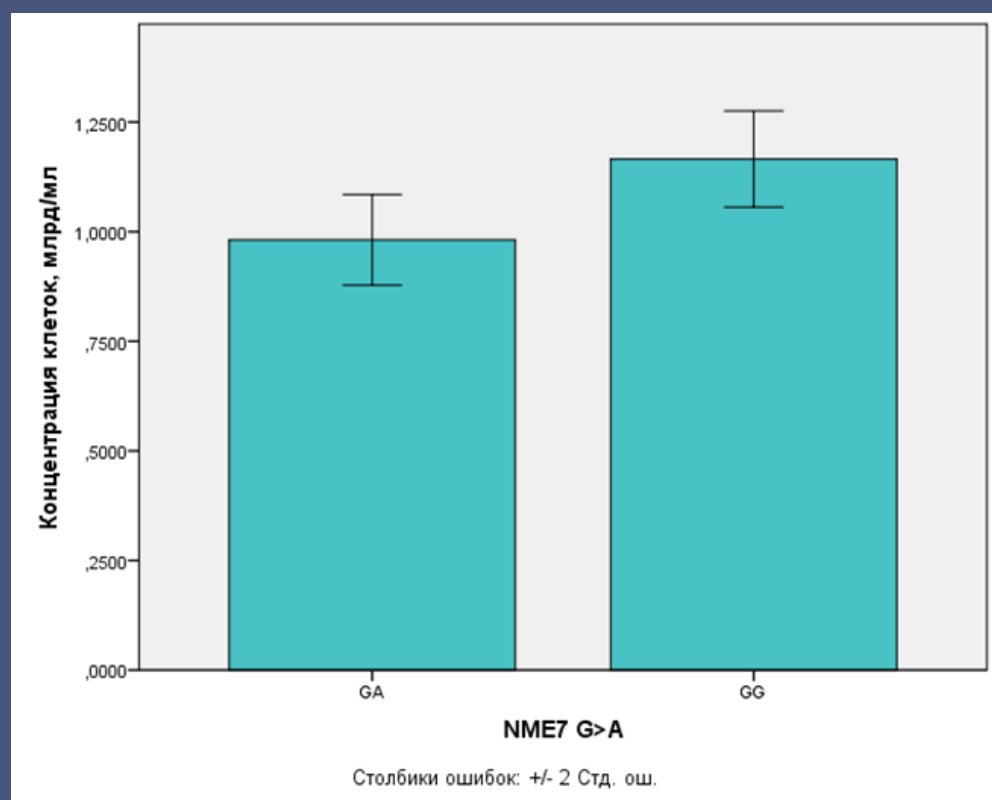


Рис. 13 Эффект замещения аллеля G на C в SNP ESR 665 G>C на концентрацию сперматозоидов быков

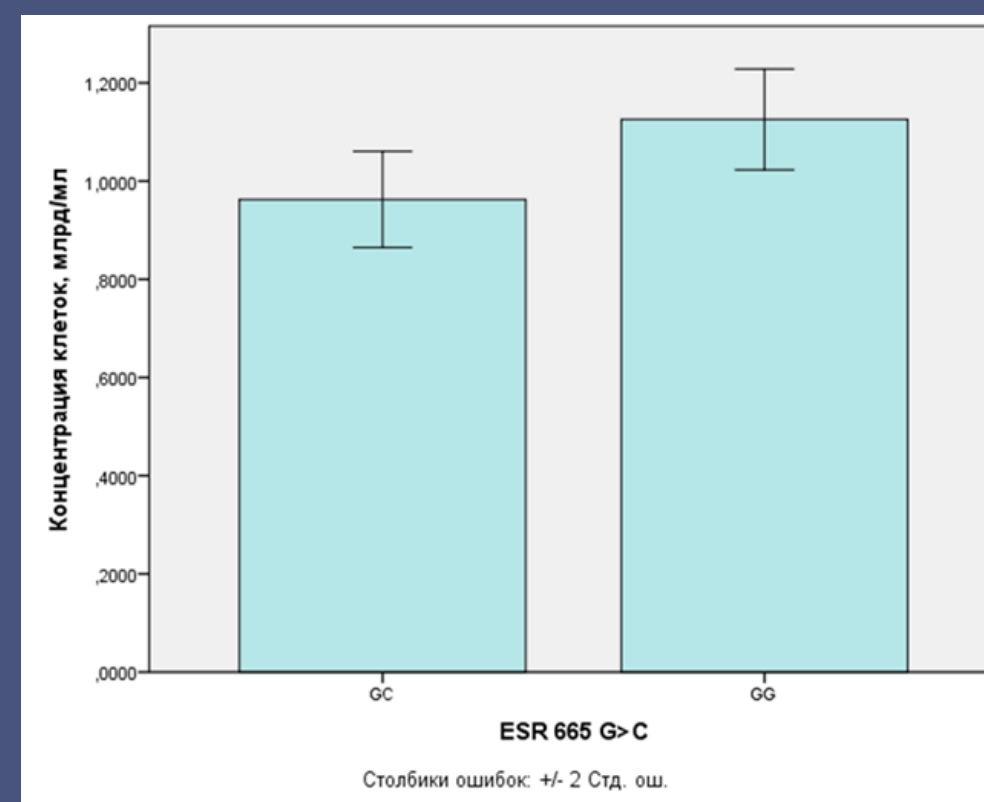




Рис.14 Эффект замещения аллеля G на T в SNP *NME7 474 G>T* на количество повреждений в области хвоста и шейки сперматозоидов быков

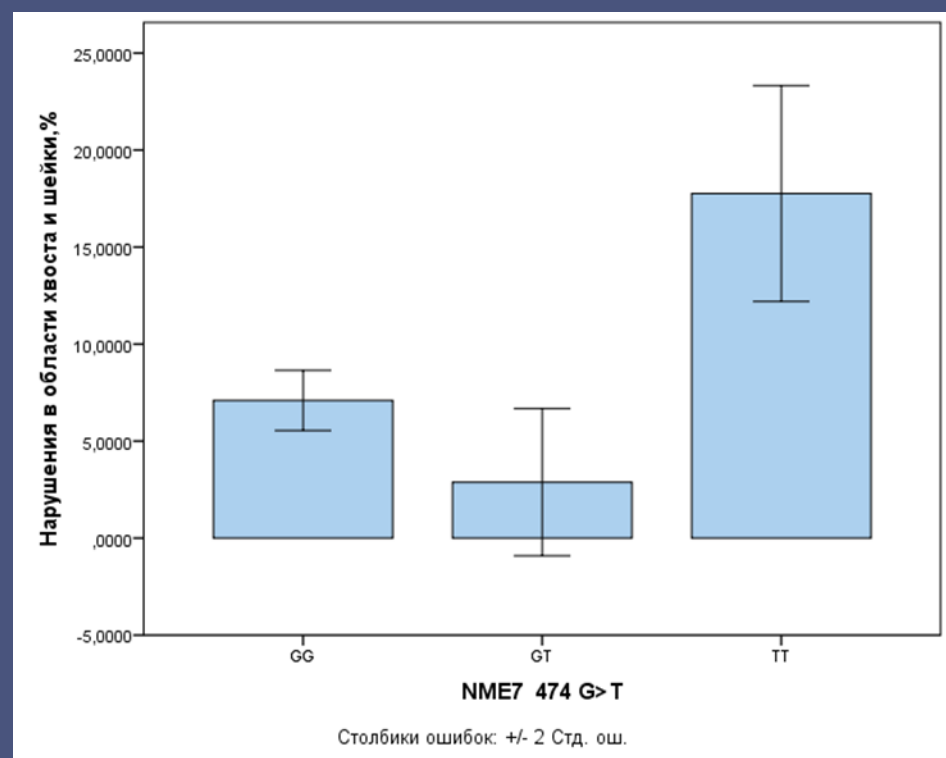
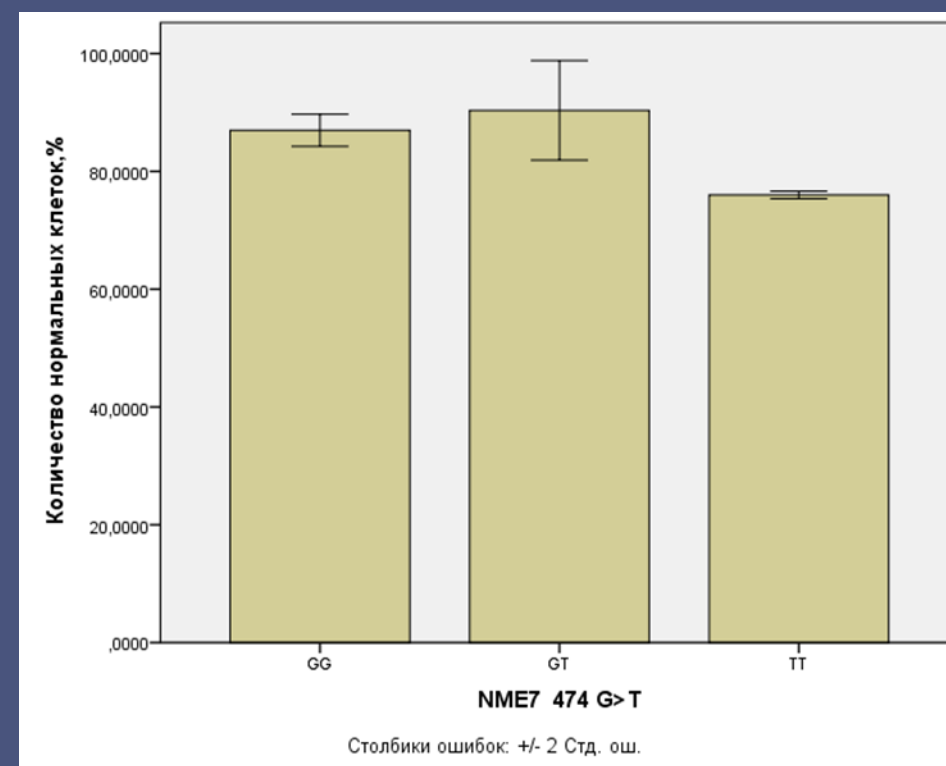


Рис.15 Эффект замещения аллеля G на T в SNP *NME7 474 G>T* на количество нормальных сперматозоидов быков

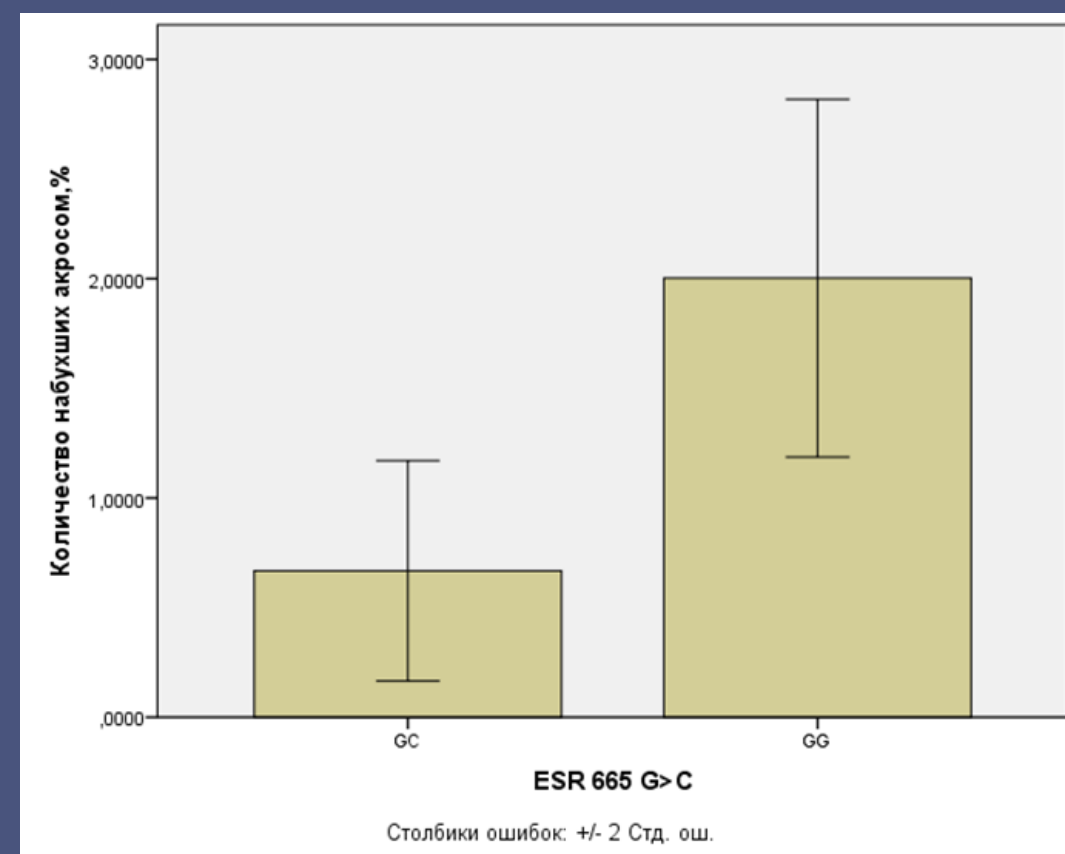


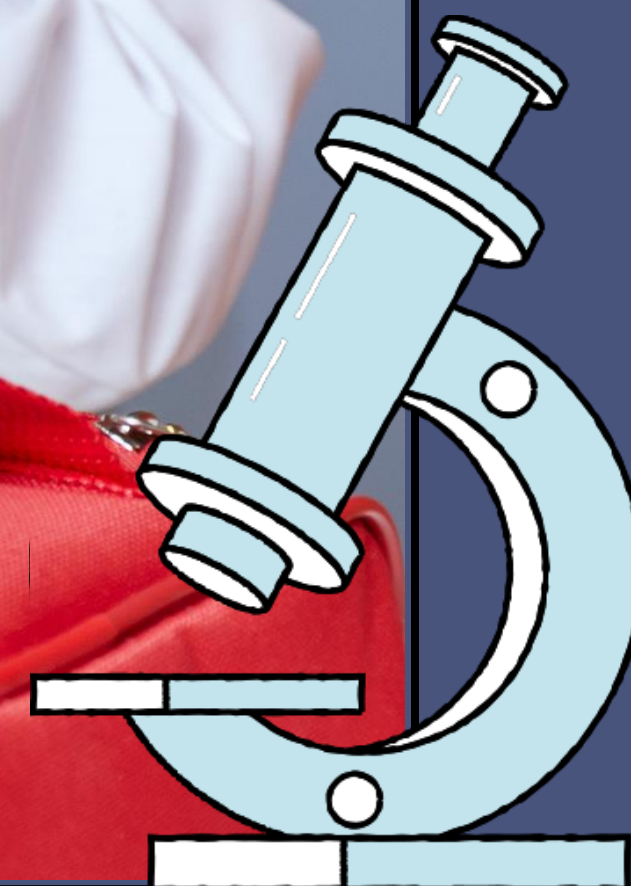


По *NME8* достоверных различий по качеству спермы быков не выявлено. Однако, быки с генотипом AA по SNP 613 G>A имели лучшую реакцию скорости дыхания на 2,4 ДНФ ($2,02 \pm 0,82$) по сравнению с быками с генотипом GA ($1,72 \pm 0,43$) и GG ($1,61 \pm 0,16$). По SNP *ESR 665* G>C обнаружена достоверная связь генотипа с набухшими акросомами ($p < 0,05$) (рис.16).



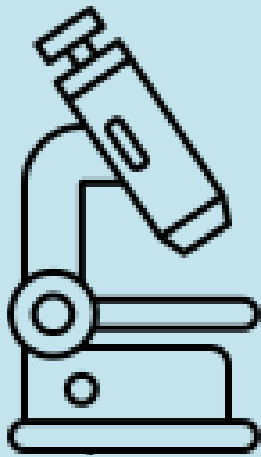
Рис.16 Эффект замещения аллеля G на C в SNP *ESR 665* G>C на количество набухших акросом в сперме быков





По *ESR* 696 $G > C$ достоверной связи с качеством спермы быков не выявлено.

Выводы и предложения



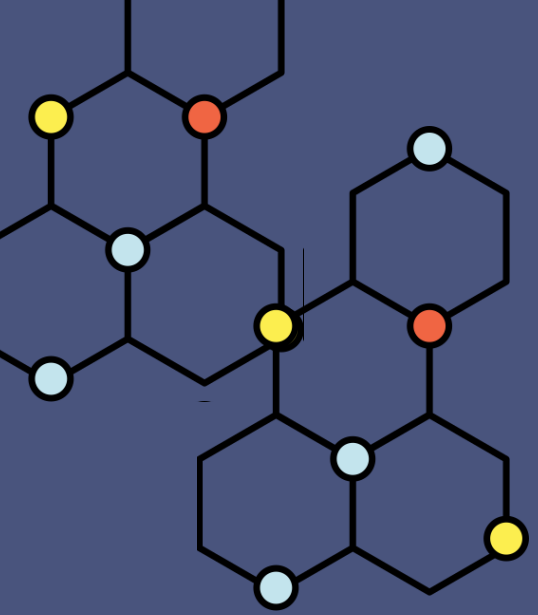
Выявлена связь
генотипа и качества
эякулята



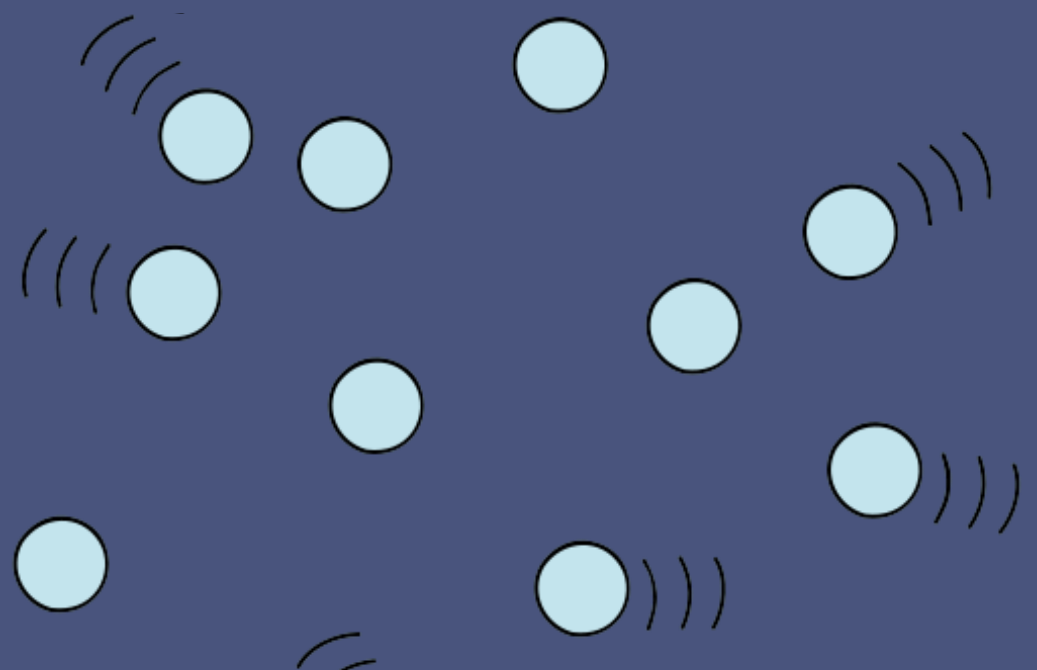
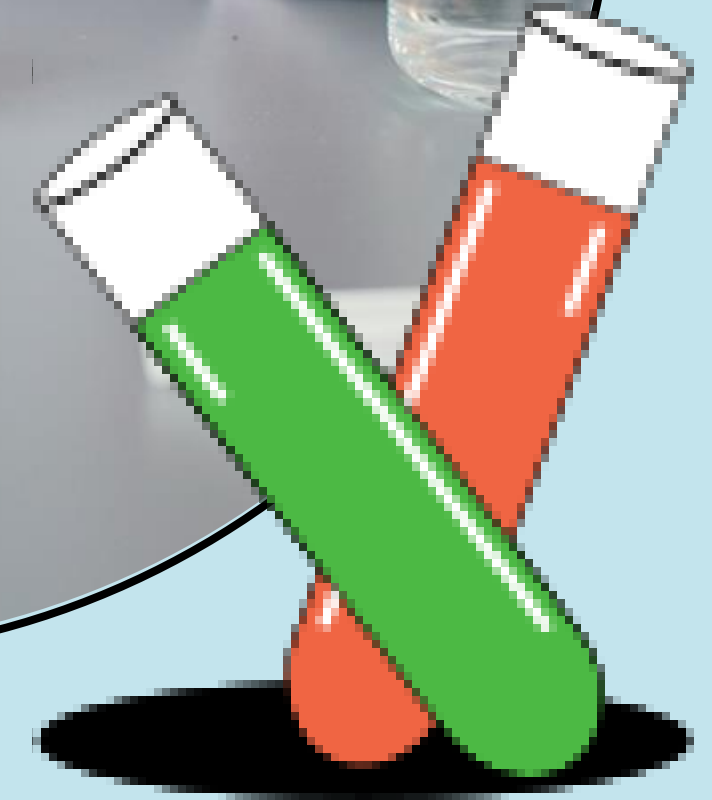
Установлено, что не все
гены-кандидаты
связаны с качеством
эякулята

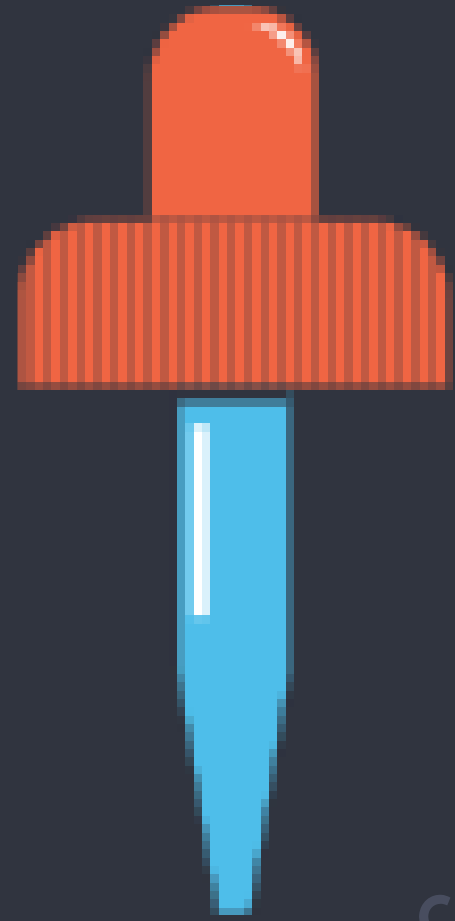


Необходимо
дальнейшие
исследования по
данному направлению



Спасибо за
внимание.





$NaCl$

$C_6H_{12}O_6$

ГЗ 121052600354-7

