

Молекулярно-биологическое направление

Оценка длины теломер кур

Оценку длины теломерных участков проводили с помощью количественного ПЦР. Нами был разработан метод оценки длины теломер у кур, при этом за основу был взят метод определения относительных размеров теломерных участков хромосом у зябликов (Heidinger et al., 2014). Принцип метода относительной количественной оценки теломер заключается в сравнении количества ампликонов однокопийного региона генома и ампликонов теломерных участков.

Проведено исследование длины теломерных участков хромосом в клетках крови у контрольной и трех опытных групп кур в различные временные периоды эксперимента: 75, 225 и 445 дней. В каждой группе исследовали ДНК 50 особей. Анализ относительной длины теломер проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени в 3-х повторностях. Основные параметры методики (праймеры, условия проведения реакции и т.д.) были разработаны нами в ходе предыдущего этапа выполнения проекта. На данном этапе мы внесли некоторые дополнительные процедуры. А именно: для количественного анализа длины теломер мы использовали не один, а два однокопийных участка – гена *gapdh*, использованный ранее, и гена *rplp0*. Дизайн специфичных праймеров (прямой – 5'-TCGGACCTGAGAAGACCTCC, обратный – TTCAATGGTCCCTCGGGA AAA-3') к нуклеотидной последовательности гена *rplp0*, был проведен с помощью программы Primer-BLAST. Более того на этом этапе мы определили эффективность амплификации теломерных участков хромосом. Эффективность рассчитывали по калибровочной кривой, построенной на основе количественного анализа ПЦР продуктов (пороговых циклов) с различными концентрациями ДНК матрицы. В качестве ДНК матрицы был выбран синтетический олигонуклеотид, комплементарный по нуклеотидному составу теломерному участку хромосом (TTAGGG)₁₄. Эффективность амплификации теломерных областей составила 135 %. Превышение этого показателя более 100 % в нашем случае можно объяснить образованием дополнительного ПЦР продукта – димера праймеров. Следует отметить, что стандартные праймеры для оценки размеров теломер у позвоночных животных (прямой – 5'-CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3', обратный – 5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3') (Cawthon, 2002, O'Callaghan, Fenechet, 2011) высоко комплементарны, что и является причиной образования неспецифичного продукта ПЦР в виде их димеров. Тем не менее исходя из эффективности ПЦР (135 % для теломер и 100 % для однокопийных контрольных

регионов генов *gapdh* и *rplp0*) мы внесли корректировку в формулу количественных расчетов. А именно: $2^{(\Delta Ct)}$, где $\Delta Ct = 1.3 * Ct_{\text{теломер}} - (Ct^{\text{gapdh+rplp0}})/2$.

Результаты количественного соотношения ампликонов теломерных областей к ампликонам однокопийных участков (гены *gapdh*, *rplp0*) представлены на рисунке 1. Этот показатель у 75 суточных птиц составил 6.6 ± 0.7 в контрольной группе, 6.7 ± 0.7 в I группе, 6.4 ± 0.9 во II группе и 6.5 ± 0.8 в III группе; у 225 суточных птиц - 5.5 ± 0.5 в контрольной группе, 5.5 ± 0.6 – I группе, 5.6 ± 0.7 - II группе и 5.4 ± 0.6 - III группе; у 445 суточных птиц - 4.2 ± 0.9 в контрольной группе, 4 ± 1 – I группе, 4.2 ± 1.1 - II группе и 4.1 ± 1 - III группе.

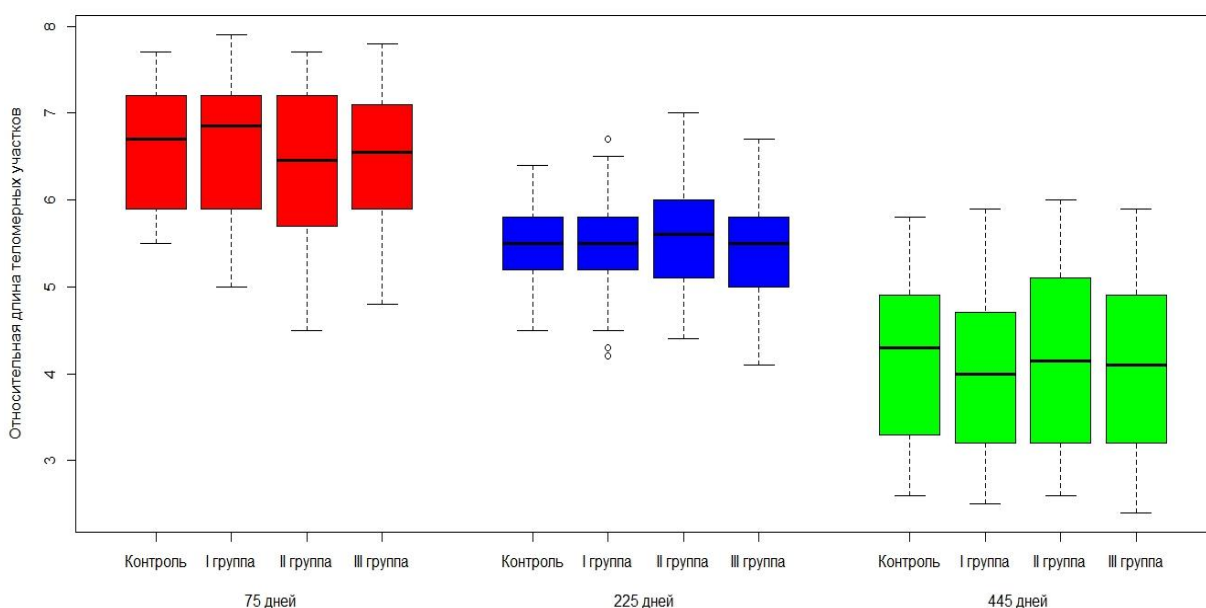


Рисунок 1. Относительная длина теломерных участков хромосом у контрольной и трех опытных групп кур различных возрастов: 75, 225 и 445 дней.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ R Studio v. 1.0.136. В большинстве исследуемых групп полученные значения не соответствовали нормальному распределению. И для статистической оценки различий использовали U-критерий Манна — Уитни.

С увеличением возраста птиц, как в контрольной, так и в трех опытных группах, длина теломерных участков достоверно ($P < 0.01$) уменьшалась. На 13-18 % было выявлено снижение длины теломер у 225 суточных птиц, по сравнению с 75 суточными и на 25-28 % снижение – у 445 суточных, по сравнению с 225 суточными птицами. Полученные нами данные о возрастных изменениях длины теломерных участков у кур коррелируют с результатами других исследований (Kim et al., 2011; Sohn, Subramani, 2014). Статистически значимых различий в относительной длине теломер между контрольной и экспериментальными группами не установлено.

Литература

Kim Y.J., Subramani V.K., Sohn S.H. Age Prediction in the Chickens Using Telomere Quantity by Quantitative Fluorescence In situ Hybridization Technique // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2011. – V. 24. - p. 603-609.

Sohn, S.H., Subramani V.K. Dynamics of Telomere Length in the Chicken // World's Poultry Science Journal. 2014. – V. 70. p. 721-735.

Wollowski I., Rechkemmer G., Pool-Zobel B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2001. – V.73. p. 451-455

Park E., Jeon G.I., Park J.S., Paik H.D. A Probiotic Strain of *Bacillus polyfermenticus* Reduces DMH Induced Precancerous Lesions in F344 Male Rat // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2007. – Vol. 30. – p. 569-574.

Hamilton M.L., Van Remmen H., Drake J.A., et al. Does oxidative damage to DNA increase with age? // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. Vol. 98. – p. 10469-10474.

Wang C., Jurk D., Maddick M., et al. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. // Aging Cell. - 2009 – Vol. 8. – p. 311-323.

Bohr V. A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells // Free Radical Biology and Medicine. – 2002. – V. 32. – p. 804-812.

St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S.J., Brand M.D. Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 27. – p. 44784-44790.

Sasaki T., Unno K., Tahara S. et al. Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds // Aging cell. – 2008. Vol. 7. – p. 459-469.