

гетерозиготный генотип TC/CT:305 п.н., 230 п.н. и 74 п.н., все остальные особи имели гомозиготный генотип TT/CC:305 п.н. Нами по локусу гена CATHL2 у исследуемой популяции доказано отсутствие SNP полиморфизма, проведенный дополнительный анализ последовательности гена CATHL2 подтверждает наше предположение.

Библиографический список

1. Pokorska J., Dusza M., Kułaj D., Żukowski K. and Makulska J. Single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and its association with clinical mastitis incidence in Polish Holstein-Friesian cows. Genetics and Molecular Research 15 (2): gmr.15027247 Published April 27, 2016
2. Hiller S., Kowalewska-Łuczak I., and Czerniawska-Piątkowska E. Associations between CATHL2 Gene Polymorphism and Milk Production Traits and Somatic Cells Count in Dairy Cattle. ISSN 1022-7954, Russian Journal of Genetics, 2020, Vol. 56, No. 3, pp. 383–386.
3. Haiyan Zhang, Yan Wei, Fengying Zhang, Yanyan Liu, Yan Li, Ge Li, Bing Han, Haifeng Wang, Weitao Zhao & Changfa Wang. Polymorphisms of MASP2 gene and its relationship with mastitis and milk production in Chinese Holstein cattle. BIOTECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGICAL EQUIPMENT

УДК: 636.018: 636.4: 575.162

ПРЕИМУЩЕСТВО ПРИМЕНЕНИЯ T-ARMS-PCR РЕАКЦИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ СКРЫТЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

***Бименова Жанат Жолшыбайкызы**, ассоциированный профессор кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства», НАО «КазНАИУ»*

***Махмутов Абзал Касенович**, ассоциированный профессор кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства», НАО «КазНАИУ»*

***Аубекерова Лаура Сатаевна**, научный сотрудник Департамента науки», НАО «КазНАИУ»*

***Шманов Габдолла Сагинтаевич**, заместитель директора по животноводству ТОО «Асыл Логистикс», Северо-Казахстанская область*

***Усенбеков Есенгали Серикович**, заведующий кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства», НАО «КазНАИУ»*

***Аннотация.** Авторами статьи установлена эффективность применения программы Primer 1 для подбора последовательностей прямого и обратного праймеров (внешних и внутренних) для T-ARMS-PCR реакции. Генотипирование образцов ДНК проведено двумя способами: ПЦР-ПДРФ анализа и с помощью T-ARMS-PCR реакции. Экспериментальным путем определена оптимальная температура отжига праймеров, которая составляет 59°C -60 °C для T-ARMS-PCR реакции (ген APAF1). По предварительным результатам*

генетического мониторинга у исследуемых животных носителей гаплотипов фертильности HH1 и HH4 не выявлены.

Ключевые слова: гаплотипы фертильности у коров HH1, HH4, ПЦР-ПДРФ анализ, программа Primer 1, гены *APAF1*, *GART*, *T-ARMS-PCR* реакция, генетический скрининг.

В настоящее время у крупного рогатого скота молочного направления продуктивности наблюдается тенденция увеличения количества скрытых генетических дефектов, которые сопровождаются нарушением эмбрионального развития и процессов метаболизма. В настоящее время у голштинской породы встречаются более 500 наследственных заболеваний, которые наносят большой экономический ущерб молочному скотоводству. Часто причиной возникновения наследственных аномалии являются точечная мутация, делеция или инсерция в составе соответствующего гена.

Так, в медицине для выявления носителей мутации метаболического синдрома (Metabolic Syndrome) авторами были использованы два метода: Real-Time PCR диагностика и Tetra-Primer ARMS PCR способ. Следует отметить, что способ Tetra-Primer ARMS PCR реакции имеют следующие преимущества, низкая себестоимость диагностических исследований, быстрота и низкая вероятность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. По мнению ученых, Tetra-Primer ARMS PCR способ не уступает Real-Time PCR методу по всем параметрам. Для детекции Metabolic Syndrome у детей используются две пары праймеров; внешние прямые F -5'-CCCTCAAGGCCTCACAACCCAGCAGTCACC-3' (Forward outer primer) и внешние обратные R-5'AGCTGGGAAATAAGGGCCTGGGCTGGACG 3' (Reverse outer primer), внутренние прямые F -5'-GGTCCACACCCAGTTGGCTGCAACCGGA-3' (Forward inner primer) и внутренние обратные праймеры F -5' -TGGGTCTGCCAGGGTTCAGGCACCCGCC-3' (Reverse inner primer). В зависимости от генотипа особей использование внешних праймеров позволяет амплифицировать ПЦР продукт размером 504 п.н., который не имеет диагностического значения. Использование аллельспецифических внутренних прямых и обратных праймеров позволяет амплифицировать участок гена длиной 358 п.н. и 203 п.н., которые имеют диагностическое значение [1].

В 2014 году для идентификации аллелей гена *FesB* у овец был использован Tetra-ARMS PCR способ, который имел высокую диагностическую значимость, данный SNP полиморфизм ассоциирован с репродуктивной функцией у овец. Известно, что для получения достоверных результатов необходимо оптимизировать условия проведения ПЦР. Так, авторами работы определено оптимальное количество матричной ДНК (50 ng), концентрация $MgCl_2$ и dNTP, дозировка фермента Taq DNA polymerase. Исследователями была определена результативность амплификации при различных температурах отжига праймеров: 64 °C, 62 °C, 60 °C, 58 °C, 56 °C, а остальные параметры были стабильными концентрация $MgCl_2$ 1,5 mM, концентрация dNTP в реакционной смеси 0,25 mM [2].

В настоящее время есть опыт применения зарубежными учеными способа Tetra-ARMS PCR реакции для детекции носителей генетического дефекта BLAD у племенных быков производителей. Авторами работы для выявления гетерозиготных носителей гена CD18 была использована две пары праймеров, внешние OF - 5'-GAATAGGCGTCCTGCATCCTATCCACCA, OR -5'-CTTGGGGTTTCAGGGGAAGATGGAGTAG, внутренние IF -5'-GGCCAAGGGCTACCCCATAGA и IR -5'-GTAGGAGAGGTCCATCAGGTAGTACATGC. Состав T-ARMS PCR реакционной смеси был: образец ДНК 80–100 ng, 200 μM каждого dNTP и 1 U TaqDNA polymerase, концентрация MgCl₂ 1,5 mM. Затем в реакционную смесь добавляет в количестве 1,25 μl DMSO, чтобы конечная концентрация в реакционной смеси была 5%. Условия проведения амплификации: первоначальная денатурация при 94 °C 5 мин, количество циклов 35 – денатурация 94 °C 30 сек, отжиг праймеров 55 °C 45 сек и элонгация при 72°C 35 сек, завершающий синтез при 72°C 10 мин. Генотипирование 200 быков производителей произведено двумя способами: ПЦР-ПДРФ анализ и Tetra-ARMS PCR и получены аналогичные результаты, что свидетельствует об эффективности использования Tetra-ARMS PCR способа [3].

В другой работе ученые с целью снижения себестоимости и длительности ПЦР диагностики CVM (Complex vertebral malformation) предлагают использовать микрокарты (использование цельной крови, без экстракции ДНК) и способ T-ARMS PCR реакции, которая исключает применение рестриктазы для детекции точечной мутации. Диагностическая точность разработанного авторами способа была проверена с помощью PCR-PIRA метода и установлена одинаковая эффективность амплификации при использовании в качестве антикоагулянта гепарина и ЭДТА [4].

По результатам исследований Российских ученых из тестированных 593 быков-производителей и 270 коров было выявлено всего 39 гетерозиготных носителей гаплотипа HH1, в том числе 23 быков и 16 коров, что соответствует частотам встречаемости соответственно 3,9 и 5,9%. ДНК тестирование референтных образцов показали, что генотипу QQ по ARAF1 соответствует наличие двух фрагментов длиной 123 и 33 п.н., а генотипу QX – трех фрагментов длиной 156, 123 и 33 п.н. Следует отметить, что фрагмент длиной 33 п.н. на электрофореграмме идентифицируется вместе с остатками праймеров и димеров праймеров и не может быть определяющим при идентификации генотипа животных [5].

Таким образом, технология выявления гетерозиготных носителей скрытых генетических дефектов основаны на следующих принципах: амплификация нужного фрагмента гена и детекция аллелей дикого или мутантного типов с помощью соответствующей рестриктазы.

Целью исследования было проведение генетического скрининга коров голштинской породы племенных хозяйств Алматинской и Кызылординской областей по гаплотипам фертильности HH1, HH4 с помощью ПЦР-ПДРФ анализа и разработка способов T-ARMS-PCR реакции для идентификации носителей гаплотипов HH1.

Материалы и методы исследования. Периферическую кровь для исследования брали из яремной или хвостовой вены в вакуумную пробирку с ЭДТА. Экстракция ДНК проводилась фенольным методом. Для диагностики носителей гаплотипа фертильности НН1 были использованы праймеры: F -5'-TGATCTTGGCTCTGGTTATGTTT-3' и R – 5' – ACCTACTTACACCCACTCCAGGT-3', длина амплифицированного фрагмента гена ARAF1 составила 243 п.н. Для идентификации аллелей гена ARAF1 была использована рестриктаза BstC8I, в результате рестрикции ПЦР продукта образуются фрагменты: 176 п.н., 12 п.н. и 55 п.н., из них на электрофореграмме хорошо визуализируются фрагменты 176 п.н. и 55 п.н.

Для идентификации носителей гаплотипа НН4 нами была подобрана последовательности праймеров: прямого F 5' – TTТААТGAAGGTGTCCTCTATGC - 3' и обратного R 5' - TTTCАAGGCTGААААТCCTAAG - 3'. В результате использования данной пары праймеров мы получили амплификат гена GART длиной 151 п.н. Поиск рестриктазы для детекции аллелей (А-дикий тип, С- мутантный тип) гена GART проводился с помощью программы (<http://insilico.ehu.eus>), нами была использована эндонуклеаза Tru9I с сайтом узнавания T/ТАА. После гидролиза амплификата рестриктазой Tru9I образуются фрагменты: 2 п.н., 63 п.н., 59 п.н., и 27 п.н. в зависимости от генотипа животных, информативными являются фрагменты 63 п.н. и 59 п.н.

Для детекции мутантных аллелей гена ARAF1 была использована программа Primer 1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>), которая позволяет определить последовательности (внешние и внутренние) прямого и обратного праймеров. Применение внешних праймеров позволяет амплифицировать нужный фрагмент гена. Детекция дикого или мутантного типа аллелей генов основана в амплификации фрагмента гена с помощью внутренних праймеров, последний нуклеотид которых соответствует SNP полиморфизму.

Результаты. Для генетического мониторинга коров голштинской породы зарубежной селекции были взяты всего 800 образцов ДНК из четырех племенных хозяйств Алматинской и Кызылординской областей. ДНК тестирование образцов ДНК проводилось с помощью ПЦР-ПДРФ анализа, для детекции носителей мутантных аллелей генов ARAF1 и GART были использованы рестриктазы, BstC8I и Tru9I, соответственно. В настоящее время по локусу гаплотипа НН1 протестировано 324 коров, по локусу НН4 - 430 коров. Нами для детекции носителей мутации гаплотипа фертильности НН1, кроме классических методов ПЦР и ПЦР-ПДРФ анализа был использован способ T-ARMS-PCR реакции. Основным принципом T-ARMS-PCR реакции является подбор двух пар праймеров, одной пары (внешние праймеры) и второй пары праймеров (внутренние праймеры). Таким образом, пара внешних праймеров позволяет амплифицировать нужный фрагмент гена, а амплификация с помощью внутренних прямых и обратных праймеров позволяет идентифицировать нужную нам точечную мутацию. С помощью программы Primer 1 были подобраны две пары праймеров для диагностики носителей гаплотипов НН1: Forward inner primer (C allele): F -5'-

GAAGTGGAACTTCAGAGGTTTATCTGC - 3' и (T allele): R -5'-CTTGGCCTGCAGCTTAGCGTA - 3', Forward outer primer F -5'-AAAAATGTCTGATCTTGGCTCTGGTT - 3', Reverse outer primer R -5'-TAGGCAAGCACCTATTTCAATGGAC - 3', программа Primer 1 выдает информацию: Melting temperature 64°C, температура отжига 59 °C. Product size for C allele: 286 bp, Product size for T allele: 204 bp, Product size of two outer primers: 441 bp, содержание GC.

Выводы. Анализ зарубежной литературы свидетельствует, что сейчас разрабатываются учеными различные способы идентификации аллелей вредных мутации у крупного рогатого скота. Наиболее точным и быстрым методом детекции скрытых мутации является - Real-Time PCR диагностика, которая успешно используется в ветеринарии, существенным недостатком указанного способа является дороговизна компонентов реакции. В связи с этим, нами предлагается внедрение T-ARMS-PCR реакции для детекции скрытых генетических дефектов у крупного , которая исключает применение рестриктазы для идентификации дикого и мутантного типов аллелей. В наших экспериментах установлена эффективность использования программы Primer 1 для дизайна праймеров. Экспериментальным путем определена оптимальная температура отжига праймеров, 59°C -60 °C для T-ARMS-PCR реакции (ген АРАF1). По предварительным результатам генетического мониторинга у исследуемой популяции носителей гаплотипов фертильности НН1 и НН4 не выявлены.

Данная работа была выполнена в рамках реализации проекта МОН РК «Разработка молекулярно-генетических способов детекции скрытых мутации у крупного рогатого скота и управление процессом элиминации наследственных аномалии». ИРН AP09057988.

Библиографический список

1. Hoda Miranzadeh-Mahabadi, Hajar Miranzadeh-Mahabadi, Parvaneh Nikpour, Modjtaba Emadi-Baygi, Roya Kelishadi. Comparison of TaqMan Real-Time and Tetra-Primer ARMS PCR Techniques for Genotyping of Rs 8066560 Variant in Children and Adolescents with Metabolic Syndrome. *Adv Clin Exp Med* 2015, 24, 6, 951–955
2. Feng Guan, Guoqing Shi, Pengcheng Wan, Rong Dai, Hong Tang, Haixia Wang, Yuanyuan Luo. Development of cost-effective tetra-ARMS PCR for detection of FecB genotype in sheep. *Animal Science Papers and Reports* vol. 32 (2014) no. 3, 229-237
3. Rafeeqe R. Alyethodi, Umesh Singh, Sushil Kumar, Rajib Deb, Rani Alex, Sheetal Sharma, Gyanendra S. Sengar and B. Prakash. Development of a fast and economical genotyping protocol for bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in cattle. *SpringerPlus* (2016) 5:1442
4. R. R. Alyethodi, U. Singh, S. Kumar, R. Alex, G. S. Sengar, T. V. Raja, R. Deb and B. Prakash. Designing, optimization, and validation of whole blood direct T-ARMS PCR for precise and rapid genotyping of complex vertebral malformation in cattle. *BMC Biotechnology* (2021) 21:36.

5. Романенкова О.В., Гладырь Е.А., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Скрининг Российской популяции крупного рогатого скота на наличие мутации в ARAF1, ассоциированной с гаплотипом фертильности HH1. Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30. № 2

УДК 636.082.2:636.034

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА CXCR1 С ПОКАЗАТЕЛЯМИ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КОРОВ АЙРШИРСКОЙ ПОРОДЫ

*Зими́на Анна Александровна, кандидат сельскохозяйственных наук
лаборатории генетики и геномики КРС, ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста*

*Романенкова Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук
лаборатории генетики и геномики КРС, ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста*

*Сермягин Александр Александрович, кандидат сельскохозяйственных наук,
руководитель отдела популяционной генетики и генетических основ
разведения животных, ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста*

Аннотация. В публикации рассматривается полиморфизм гена *CXCR1* T>A (*rs 41255709*) и его влияние на молочную продуктивность айрширских коров. В ходе выполненной работы удалось обнаружить разные варианты генотипов по характеру кривых флуоресценции ПЦР в реальном времени - AA, AG и GG. Генотип AA встречался с частотой 88,0%, генотип AG - 11,3% и GG – 0,7%. В изучаемой выборке коров айрширской породы отмечалась высокая частота аллеля A (0,937). Частота аллеля G составила 0,063.

Было установлено достоверное влияние гена на содержание жира в молоке за 305 дн. последней законченной лактации у коров с генотипом AG.

Ключевые слова: ген *CXCR1*, полиморфизм, генотипы, молочная продуктивность, айрширская порода

Молочная продуктивность является одним из важных показателей эффективности животноводства и определяется величиной удоя, содержанием белка и жира в молоке. Для различных пород крупного рогатого скота данные показатели специфичны и различаются между собой; при этом внутри породы молочная продуктивность также сильно колеблется. Эффективность молочного животноводства зависит от многих факторов - климатических условий, условий содержания и выпаса животного, качества кормления и т.п. Кроме этого, на молочную продуктивность влияют индивидуальные и наследственные особенности коров [1].

В гене *CXCR1* обнаружено 3 полиморфизма, которые ассоциированы с удоем, количеством жира и белка [2] и один полиморфизм, отвечающий за количество соматических клеток в молоке (мастит) [3], [4].