

¹Усенбеков Е.С.,
²Яковлев А.Ф.,
¹Акимжан Н.А.

¹Казахский национальный аграрный университет, Казахстан, г. Алматы
²Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Россия, г. Санкт-Петербург-Пушкин

Результаты мониторинга быков-производителей на носительство генетических дефектов

¹Usenbekov Y.S.,
²Yakovlev A.F.,
¹Akimzhan N.A.

¹Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan,
²All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, St. Petersburg-Pushkin, Russia

Results of monitoring bulls carrier genetic defects

¹Усенбеков Е.С.,
²Яковлев А.Ф.,
¹Акимжан Н.А.

¹Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
²Бүкілресейлік генетика және малды өсіру ҒЗИ, Ресей, Санкт-Петербург-Пушкин

Генетикалық кемтарлықтар тасымалдаушысына бұқаларды тексеру нәтижелері

В статье приводятся сведения о частоте встречаемости аутосомальных рецессивных летальных мутаций – дефицита адгезии лейкоцитов (BLAD), комплексного уродства позвоночника (CVM), дефицита фермента уридин-моно-фосфат-синтетазы (DUMPS) и цитруленемии (BC) у племенных быков-производителей АО «Асыл-Түлік» (N=67) и ТОО «Асыл» (N=43) отечественной и зарубежной селекции. Детекция летальной мутации генов CD 18, SLC35A3, UMP и ASS у быков-производителей (N=110) проводилась методом PCR-RFLP анализа и Real-Time PCR SNPs диагностики. Установлено, что племенные быки местных пород: Алатауской, Аулиекольской и Казахской белоголовой свободны от носительства вредных мутаций – BLAD, CVM, DUMPS и BC. Два факта гетерозиготного носительства CVM были выявлены у быков голштинской и герефордской пород и один случай гетерозиготного носительства BLAD у животного голштинской породы зарубежной селекции. Разработанный метод диагностики позволяет в течение двух часов точно определить здоровых гомозиготных животных и гетерозиготных носителей мутации. Авторами работы впервые использована методика Real-Time PCR SNPs диагностики для выявления генетического дефекта DUMPS.

Ключевые слова: PCR, RFLP, Real-Time PCR SNPs диагностика, аутосомальная рецессивная точечная мутация, BLAD, CVM, DUMPS, BC, быки-производители.

The article provides information about the frequency of occurrence of autosomal recessive lethal mutation – Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD), Complex vertebral malformation (CVM), Uridine Monophosphate Synthase Deficiencies (DUMPS) and Bovine Citrullinaemia (BC) in breeding bulls JSC «Asyl-Tulik» (N = 67) and LLP «Asyl» (N = 43) of domestic and foreign selection. It is known that harmful allele mutation frequency is high in cattle Holstein, some local cattle breeds prevalence of these mutations is low or non-existent. Detection of lethal mutations of genes CD 18, SLC35A3, UMP and ASS in bulls (N = 110) was performed by PCR-RFLP analysis and Real-Time PCR SNPs diagnostics. It was found that breeding bulls of local breeds, Alatau, Auliekol and Kazakh white-free carriers of harmful mutations – BLAD, CVM, DUMPS and BC. Two facts are revealed heterozygous carriers of CVM bulls of Holstein and Hereford breeds and one case of heterozygous carriers of BLAD animal Holstein foreign selection. The developed diagnostic method allows for two hours to pinpoint healthy animals homozygous and heterozygous carriers of the mutation. The authors of the first technique used Real-Time PCR SNPs diagnostics to identify the genetic defect DUMPS.

Key words: PCR, RFLP, Real-Time PCR SNPs diagnostics, autosomal recessive point mutation, BLAD, CVM, DUMPS, BC, sires.

Мақалада «Асыл-Түлік» АҚ және «Асыл» ЖШС қарасты отандық және шет ел сұрыптауына жататын асыл тұқымды бұқаларда аутосомальдық рецессивті мутациялардың – лейкоциттер адгезиясының жетіспеушілігі (BLAD), омыртқаның кешенді кемтарлығы (CVM), уридин-моно-фосфат-синтетаза ферментінің жетіспеушілігі (DUMPS) және ірі қара малының цитруленемиясы (BC) тұқым қуалаушы ауруларының таралуы туралы мәліметтер берілген. CD 18, SLC35A3, UMP және ASS гендерінің летальдық мутацияларына барлау жасау бұқаларда (N=110) ПТР мен РФҰП талдауларының және Real-Time PCR SNPs тәсілдерінің көмегімен жүзеге асырылды. Зерттеу нәтижелеріне сәйкес, жергілікті тұқымдас Алатау, Әулікөл, Қазақтың ақ бас бұқаларында зиянды BLAD, CVM, DUMPS және BC тұқымқуалаушылық кемтарлықтары кездеспеді. Нәтижелерге сәйкес екі рет CVM кемтарлығының гетерозиготалы тасымалдаушысы голштейн және герефорд тұқымдас бұқаларда және бір голштейн тұқымдас бұқада BLAD гетерозиготалы тасымалдаушы ретінде шет сұрыптауынан анықталды. Ойлап табылған балау әдісі екі сағат ішінде дені сау гомозиготалы және тасымалдаушы гетерозиготалы жануарларды анықтауға мүмкіндік береді. Авторлар DUMPS генетикалық кемтарлығын балауға Real-Time PCR SNPs әдісін алғаш рет қолданған.

Түйін сөздер: ПТР, РФҰП, Real-Time PCR SNPs балау, аутосомальдық рецессивтік нүктелік мутация, BLAD, CVM, DUMPS, BC, бұқалар.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА БЫКОВ-ПРОИЗВОДИ- ТЕЛЕЙ НА НОСИТЕЛЬСТВО ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ

Введение

Высокая скорость распространения летальных мутаций определяется рецессивным характером их наследования. Продукты таких генов, как правило, участвуют в регуляции тканеспецифичных функций и неблагоприятные эффекты мутантного аллельного варианта компенсируются в гетерозиготе нормальной функцией аллеля дикого типа. В настоящее время у крупного рогатого скота известны 46 наследственных заболеваний, при которых разработаны молекулярно-генетические методы диагностики. По информации ассоциации голштинской породы Канады стоимость PCR диагностики образцов ДНК на генетические дефекты составляет: BLAD 35 \$, Brachyspina – 65 \$, CVM – 40 \$, PL – Polled – 80 \$, DUMPS – 35 \$, MF – Mulefoot – 160 \$ США. Своевременная диагностика данных мутаций и выбраковка животных и племенного материала, а также требования генетического паспорта при покупке скота, эмбрионов, семени и т.п. позволяют элиминировать болезни и направленно сформировать группы для воспроизводства животных [1,2].

Хорошо изучена генетическая природа наследственных заболеваний BLAD, CVM, DUMPS, BC и для их детекции успешно применяется метод полимеразной цепной реакции и полиморфизм длин рестрикционных фрагментов [3,4,5]. Своевременное выявление носителей генетических мутации позволяет выбраковать носителей вредных мутации. В Республике Казахстан разводятся в основном местные породы крупного рогатого скота, такие как Алатауская, Аулиеатинская молочно-мясного направления и Казахская белоголовая мясного направления. С 1995 года все племенные хозяйства используют для искусственного осеменения коров Алатауской породы сперму быков-производителей швицкой породы Американской компании «Taurus-Service». Поэтому, большое практическое значение имеет ДНК тестирование особей Алатауской породы на носительство генетических аномалии.

В литературе имеются противоречивые сведения о распространенности аутосомальных рецессивных летальных мутации у крупного рогатого скота. Генеалогический анализ

показывает, что носители аутосомальной рецессивной мутации гена CD 18 являются потомками выдающегося быка производителя голландского происхождения Osborndale Ivanhoe US 1189870, родившийся в 1952 году в Америке. Элитный бык-производитель голштинской породы Carlin-M Ivanhoe Bell (US 1667366) является носителем двух распространенных наследственных дефектов: BLAD и CVM, который унаследовал эти генетические аномалии от отца Penstate Ivanhoe Star US 1441440. Частота мутации BL у коров голштинской породы Аргентины составляет 3,5%, у голштино-фризского скота Дании 13,4%, у животных голштинской породы Японии 8,1% [6]. Аутосомальное наследственное заболевание Bovine Citrullinaemia (BC) была впервые описана в Австралии в 1986 году и распространенность данного дефектного гена была 8% среди быков центра искусственного осеменения [7]. Все гетерозиготные носители были потомками быка Linmack Kriss King (LMKK) [8]. Наследственная болезнь DUMPS сопровождается ранней эмбриональной смертностью и все носители летальной аутосомальной мутации являются потомками элитного быка Skokie Sensation Ned [9]. Мониторинг племенного поголовья Польши показывает, что носителей генетической аномалии DUMPS не выявлены [10].

Известно, что интенсивный обмен генетическими материалами между странами требует проведения систематического мониторинга качества биоматериалов, таких, как замороженная сперма, замороженный эмбрион и живой скот. Во всех странах с развитым животноводством большое внимание уделяется своевременной диагностике генетических дефектов у племенных животных с целью недопущения распространения гетерозиготных носителей.

Целью настоящей работы было проведение мониторинга племенных быков-производителей молочных и мясных пород на носительство генетических дефектов BLAD, CVM, DUMPS, BC методом PCR-RFLP анализа и разработка Real-Time PCR SNPs диагностики точечных мутации генов CD18, SLC35A3, UMP и ASS.

Материалы и методы

В настоящей работе протестировали быков-производителей АО «Асыл-Тулик» (N=67) и ТОО «Асыл» (N=43) отечественной и зарубежной селекции. Исследования проводились в 2012-2014 гг. в учебно-научно-диагностической лаборатории

Казахстанско-Японского инновационного центра Казахского национального аграрного университета. В качестве материала для исследования использовали замороженную сперму быков, выделяли ДНК из спермы методами Bahnak и с помощью набора «ДНК сорб В» («ИнтерЛабСервис», Россия), с некоторой модификацией.

Выделение ДНК проводили из замороженной спермы быков-производителей по методу Bahnak. Центрифугировали 200 мкл спермы в течение 5 минут при 4000 g, осевшие клетки промывали 0,15 М раствором NaCl, 2 мМ ЭДТА («BioChemica AppliChem», Германия) и центрифугировали в течение 5 минут при 4000 g. Эту процедуру повторяли дважды. Затем, после последнего центрифугирования верхний слой отсасывали с помощью пипетки, а к осадку добавляли лизирующий буфер Bahnak в количестве 1000 мкл, имеющий следующий состав: 6М гуанидинтиоцианат («Amresco», Канада), 25 мМ цитрат натрия pH 7,0, 0,5% Sarcosyl, 0,1 М 2-меркаптоэтанол («Amresco», Канада) и инкубировали при 37 °C в течение 30 минут. Перед депротеинизацией лизированный раствор ДНК разбавляли 0,15 М раствором NaCl в соотношении 1:4. Депротеинизацию осуществляли по обычной методике, путем добавления равного объема смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (24:24:1). После центрифугирования осторожно отсасывали верхний слой пипеткой и осаждали в двух объемах 96% этилового спирта. Высушивали ДНК в течение 2-5 минут под вытяжным шкафом и растворяли в буфере TE [11].

При выделении ДНК из замороженной спермы быков-производителей с помощью набора «ДНК сорб В» («ИнтерЛабСервис», Россия), с целью оптимизации и выделения более качественной ДНК из спермы быков-производителей нами был использован способ предварительной обработки спермы следующим образом: вносили в пробирку 200 мкл спермы, затем добавляли 1000 мкл лизирующего буфера, имеющий состав 100 мМ Трис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, pH 8,0 и перемешивали в течение 30 секунд, далее центрифугировали g 10000 об/мин в течение 5 минут. После центрифугирования, суспендировали осадок в 500 мкл буфера: 100 мМ Трис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, pH 8,0 и добавляли 8 мкл 2-меркаптоэтанола («Sigma-Aldrich», США). Затем перемешивали на вортексе в течение 1 минуты и оставляли на 30 минут при комнатной температуре. Подготовленную таким способом смесь в количестве 100 мкл использовали для выделения ДНК с помощью набора «ДНК сорб-В» согласно протокола.

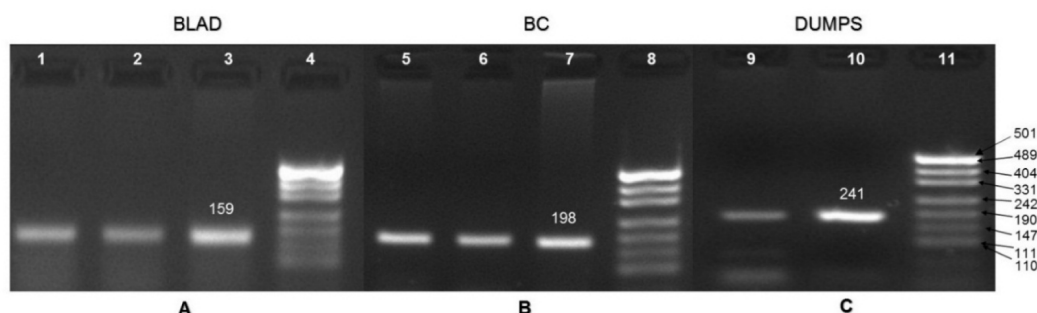
Таблица 1 – Последовательности праймеров для ПЦР диагностики генетических дефектов BLAD, CVM, DUMPS, BC у быков-производителей

Дефекты	Последовательности праймеров	ПЦР продукт	Рестрик-таза
BLAD	F- 5'- AGG CAG TTG CGT TCA ATG TGA -3' R- 5'- CCG ACT CGG TGA TGC CAT TGA -3' [12]	159 п.н.	Tag I
CVM	F- 5'- CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAG -3' F- 5'- CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAT-3' R- 5'- CGATGAAAAAGGAACCAAAAAGGG -3' [13]	287 п.н.	
DUMPS	F- 5'- TGAGTTCAATGTGACATGAGAAAAAT-3' R- 5'- ATTACCAATCAATAGGCTTACCTCC -3' [14]	241 п.н.	Ava I
BC	F- 5'- GGCCAGGGACCGTGTTCATTGAGGACATC -3' R- 5'- TTCCTGGGACCCCGTGAGACACATACTTG -3' [15]	198 п.н.	Ava II

В первую очередь, перед выделением ДНК прогревали лизирующий раствор и раствор для отмывки №1 из набора «ДНК-сорб-В» в течение 1 часа при температуре 65 °С. Затем, внесли в пробирку 100 мкл подготовленную с β-меркаптоэтанолом смесь и тщательно перемешивали на вортексе и прогревали 5 минут при температуре 65 °С. Центрифугировали 5 секунд при g 5000 об/мин на микроцентрифуге. В каждую пробирку, затем вносили 25 мкл универсального ресуспендированного сорбента из набора. Перемешивали на вортексе, ставили на штатив на 2 минуты, затем повторяли эту процедуру еще раз и ставили на штатив на 5 минут. Осаждали сорбент центрифугированием при g 5000 об/мин в течение 30 секунд. Удаляли надосадочную жидкость, затем вносили по 300 мкл раствора для отмывки №1. Надосадочная

жидкость содержит очищенную ДНК, которую в последующем использовали для полимеразной цепной реакции. Качество и количество выделенной таким способом ДНК проверяли на 0,8 % агарозном геле. ДНК тестирование племенных быков-производителей проводилось методом PCR-RFLP анализа с использованием соответствующих рестриктаз [12,13,14,15]. В случае успешной амплификации на электрофореграмме были выявлены бэнды размером 159 п.н. (BLAD), 198 п.н. (BC) и 241 п.н. (DUMPS) (Рисунок 1).

Визуализацию результатов амплификации и продукта рестрикции осуществляли с помощью гель-документирующей системы. У здоровых гомозиготных животных по локусу BLAD имеется сайт рестрикции для эндонуклеазы Taq I и продукт PCR после рестрикции режется на два фрагмента, длиной 49 п.н. и 110 п.н.

**Рисунок 1** – Продукт полимеразной цепной реакции, А – лунки 1, 2, 3 BLAD – 159 п.н., 4,8,11 – ДНК маркер, рUC19 DNA/MspI, В – лунки 5, 6, 7 BC 198 п.н., С – лунки 9, 10 DUMPS 241 п.н.

Использование последовательностей праймеров (таблица 1) позволяет амплифицировать фрагмент гена UMP длиной 241 п.н., который после рестрикции эндонуклеазой Ava I дает фрагменты

158 п.н. и 83 п.н. у здоровых гомозиготных животных, 241 п.н., 158 п.н. и 83 п.н. у гетерозиготных носителей, у гомозиготных носителей мутации один фрагмент, размером 241 п.н. (Рисунок 2).

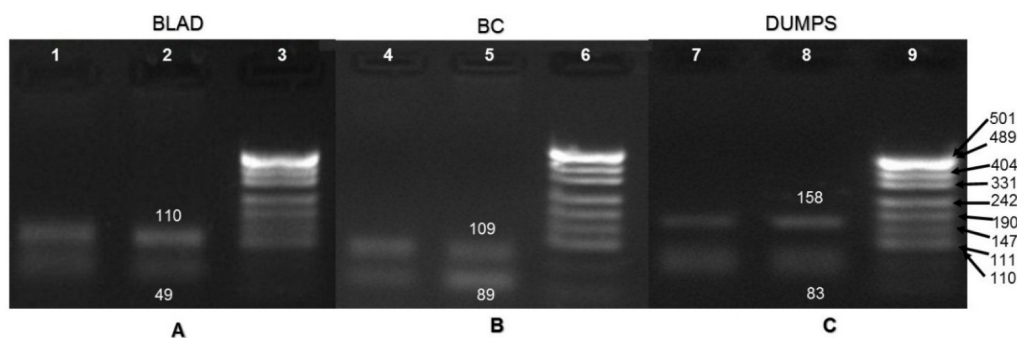


Рисунок 2 – Электрофореграмма амплификатов после рестрикции, А – лунки 1, 2 фрагменты 49 п.н., 110 п.н. (BLAD), 3,6,9 – ДНК маркер рUC19 DNA/MspI, В – лунки 4, 5 фрагменты 89 п.н., 109 п.н. (BC), С – лунки 7, 8 – фрагменты 83 п.н., 158 п.н. (DUMPS)

Следует отметить, что фрагменты 241 п.н., 158 п.н., 83 п.н. хорошо видны на электрофореграмме и способ позволяет определить генотип исследуемых животных с 100 % точностью. В ходе подбора последовательностей прямого и обратного праймеров, мы исключили замену одного нуклеотида, предложенного автором Schwenger В. в последовательности обратного праймера в позиции 19 по принципу комплементарности к последовательности гена UMP [5].

Для детекции точечной мутации CVM у быков-производителей использовали аллельспецифическую полимеразную цепную реакцию с праймерами G и T (Рисунок 3). Необходимо

отметить, что использование метода PCR-RFLP анализа для детекции носителей генетического дефекта CVM является сложным и трудоемким способом, так как нет соответствующей рестриктазы для выявления точечной мутации. Обычно для детекции носителей CVM используются различные варианты метода полимеразной цепной реакции: амплификация участка гена с помощью аллельспецифических праймеров (AS-PCR), создание сайта рестрикции при амплификации для выявления точечной мутации (CRS-PCR -created restriction site) и введение в последовательности праймера замену одного нуклеотида с целью создания сайта рестрикции для эндонуклеазы (PCR-PIRA).

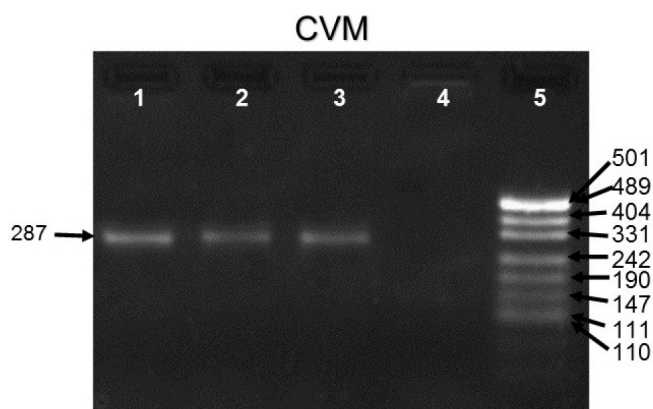


Рисунок 3 – Продукт амплификации участка гена SLC35A3 с аллельспецифическими праймерами, лунки 1, 2, 3 – 287 п.н. с аллельспецифическими праймерами G, 4 – с аллельспецифическими праймерами T, 5 ДНК маркер – рUC19 DNA/MspI

Регистрация флуоресцентного сигнала проводится в процессе амплификации на специальном приборе – амплификаторе для Real-Time Step One Plus. По нарастанию интенсив-

ности флуоресцентного сигнала с помощью программного обеспечения, прилагаемого к амплификатору, вычисляется концентрация исходной матрицы ДНК. Real-Time PCR SNPs

диагностика скрытого генетического дефекта CVM проводилась на приборе Американского производства Real-Time Step One Plus Applied Biosystems марки 7500 («Thermo Fisher Scientific», США).

Данный эксперимент проводился в следующей последовательности: выбор типа эксперимента, выбор типа реагента и типа анализа. Наборы праймеров и зонды были разработаны

на основании опубликованных результатов секвенирования, гена SLC35A3. В каждом наборе зондов, один зонд, который идеально совпадал с мутирующим геном, был обозначен как 5' при помощи 6-карбоксихлоресцеина (FAM), (Рисунок 5); другой зонд, совпадающий с вариантом дикого типа, был обозначен (5'-VIC), (Рисунок 4) кроме того, оба зонда включали в себя нефлуоресцентные гасители и частицы белка.

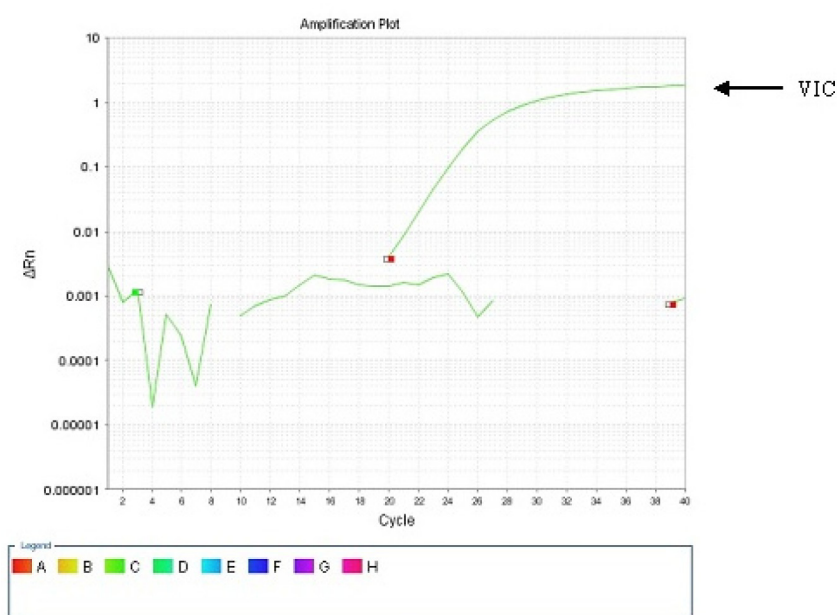


Рисунок 4 – Результаты Real-Time PCR SNPs диагностики, гомозиготное здоровое животное по локусу CVM (амплификация с VIC зондом, дикий тип)

В нашей работе для Real-Time PCR SNPs диагностики точечной мутации CVM были использованы праймеры: прямые F-5'-AGCTGGCACAATTTGTAGGT-3' и обратные R-5'-CTCAAAGTAAACCCAGCAAAGC-3' и внутренние меченые прямые F – VIC – 5'-TCATGGCAGTTCTCA-3' и внутренние меченые обратные R – FAM – 5'-TCATGGCATTTCTCA-3' [16].

Методика Real-Time PCR SNPs диагностики точечной мутации CVM включает в первую очередь нормализацию концентрации ДНК в образцах путем разбавления TE буфером до конечной концентрации 20-40 нг/мкл. Условия проведения PCR в режиме реального времени I шаг – 95°C – 10 минут, II шаг – 95°C – 15 сек и 60°C – 60 сек, количество циклов 40.

Аллельное распознавание может осуществляться путем анализа графиков амплификации

в режиме реального времени. Теоретически, зонды VIC типа будут комплементарны только дикому типу и формируют стандартный график амплификации, в то время как FAM зонды комплементарны только мутантным аллелям и формируют собой график амплификации. Таким образом, генотип может быть точно определен посредством сравнения графиков усиления. На графическом изображении результатов амплификации с использованием меченых олигонуклеотидов с VIC типом (аллель G) на дисплее амплификатора Real-Time Step One Plus Applied Biosystems появляется одна кривая, визуально кривая появляется начиная с 22 цикла полимеразной цепной реакции и до конца амплификации идет усиление накопления амплифицируемого фрагмента исследуемого гена (Рисунок 4). Так, при Real-time PCR SNPs диагностике гетерозиготных носителей

мутации CVM в результате амплификации участка гена с мутантным аллелем (аллель T), олигонуклеотиды меченые с FAM зондом

обеспечивает амплификацию мутантного аллеля и на дисплее ампликатора появляется вторая кривая с FAM зондом (Рисунок 5).

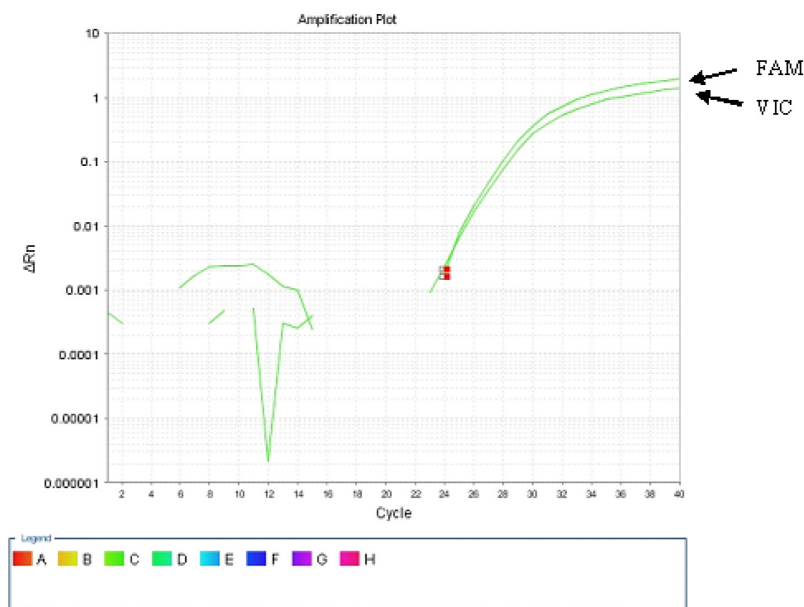


Рисунок 5 – Графическое изображение результатов Real-Time PCR SNPs диагностики точечной мутации гена SLC35A3, гетерозиготный носитель CVM (амплификация с FAM зондом, мутантный тип и с VIC зондом, дикий тип)

В наших экспериментах по Real-Time PCR SNPs диагностике точечной мутации BLAD были использованы праймеры: прямые F – 5' – CAGTTGCGTTCAATGTGACCTT -3' и обратные R -5'- GAGTAGGAGAGGTCCAT-CAGGTA-3' и внутренние меченые прямые F – VIC – 5'- CCCCATCGACCTGTAC – 3' и внутренние меченые обратные R – FAM – 5'- CCCCATCGGCCTGTAC-3'. Перед Real-Time PCR амплификацией ДНК, в первую очередь нормализовали концентрацию образцов ДНК путем разбавления TE буфером до конечной концентрации 20-40 нг/мкл.

В то время, как графики амплификации в режиме реального времени исследовались на наличие BLAD, слабый неспецифический сигнал наблюдался в аллели дикого типа (дикий тип. Китайскими учеными в 2012 году в результате проведенных экспериментов также бы выявлен данный эффект, амплификация участка гена с зондом VIC типа. Вероятно, это происходит в связи с тем, что аллельспецифический зонд имеет одно ошибочное связывание пары оснований с другим аллелем; а также, если нуклеотидная

последовательность рядом с участком SNP, сильно насыщенным AT/GC или содержащим определенные сочетания последовательности, а зонд, как правило, менее отличителен по сравнению с несоответствующей аллелей. Тем не менее, образец графиков амплификации в режиме реального времени можно легко разграничить на дикий и мутирующий тип, потому что интенсивность неспецифического сигнала намного ниже по сравнению с отметкой цели (Рисунок 6).

На графическом изображении (Рисунок 7) начиная с 20-22 цикла по 32 наблюдается тенденция увеличения сигнала в результате накопления продуктов амплификации, у гетеризиготных быков-производителей обе кривые почти параллельные. У гомозиготных здоровых особей на дисплее появляются две кривые, но продукты амплификации с VIC и FAM накапливаются с разной интенсивностью. Так, более интенсивно накапливается продукт с VIC зондом (с диким типом аллели гена CD 18), если животное является гетерозиготным носителем получаем изображение с параллельными кривыми.

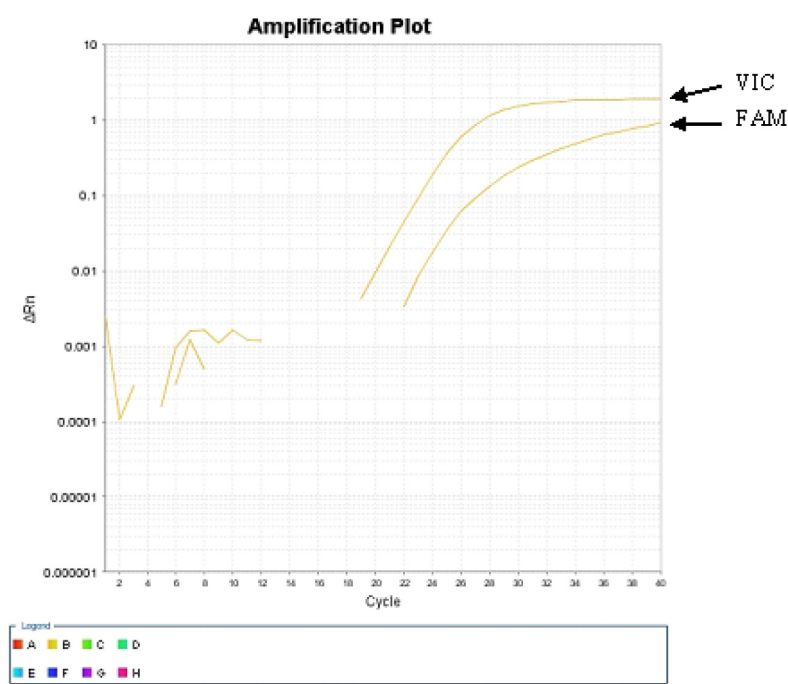


Рисунок 6 – Результаты Real-time PCR диагностики, гомозиготное здоровое животное по локусу BLAD

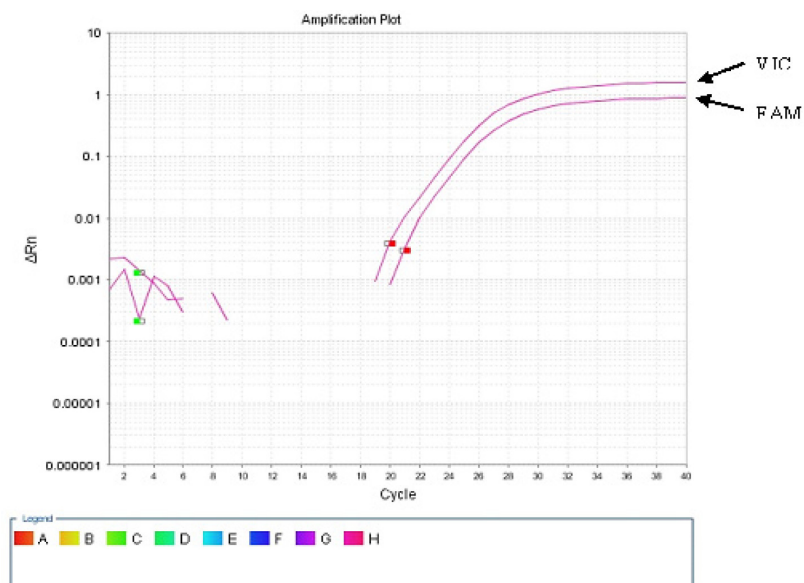


Рисунок 7 – Графическое изображение результатов Real-time PCR SNPs диагностики точечной мутации гена CD 18, гетерозиготный носитель BLAD, (амплификация с FAM зондом, мутантный тип, и с VIC зондом, дикий тип)

Real-Time PCR SNPs диагностику точечной мутации DUMPS мы проводили с использованием праймеров для Реал-Тайм ПЦР, имеющие следующую последовательность:

F – 5' – G G C T G A A G A A C A T T C T - GAATTTGTGA-3' и R-5'-TGGAGTCAAGT-

GAAGAAATTCTGGTT-3' и меченые F–VIC-5'-ATGCTTACTCGGGAGCCA-3' и R–FAM-5'-ATGCTTACTCAGGAGCCA-3'. Праймеры для генотипирования и меченые зонды VIC, FAM праймеры были синтезированы компанией Applied Biosystems, США.

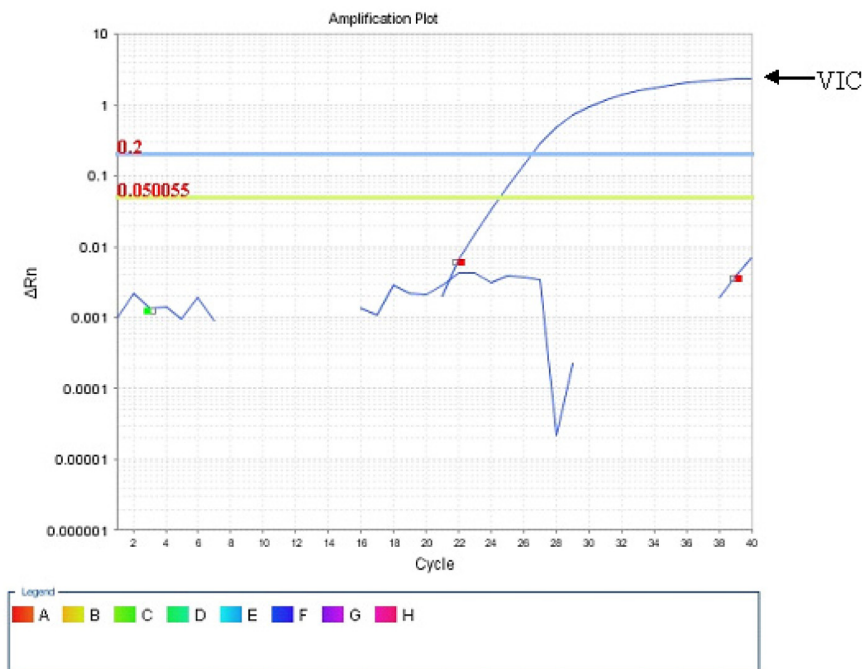


Рисунок 8 – Результаты Real-time PCR диагностики, гомозиготное здоровое животное по локусу DUMPS (амплификация с VIC зондом, дикий тип)

Real-Time PCR диагностику на носительство генетического дефекта DUMPS проводили с помощью амплификатора Real Time StepOnePlus, объемом реакционной смеси 25 мкл (Рисунок 8). Условия проведения ПЦР I шаг – 95°C – 10 минут, II шаг – 92°C – 15 сек и 60°C – 60 сек, количество циклов 40. В пробирку Эппендорфа набираем компоненты реакционной смеси (на 17 реакции), имеющий состав: TaqMan Genotyping Master Mix 220 мкл, праймеры 11 мкл и бидистиллированная вода 170 мкл. Затем смесь перемешиваем на вортексе и переносим реакционную смесь в количестве 23 мкл в стрипы и добавляем по 2 мкл ДНК с концентрацией 20-40 нг/мкл.

Результаты и их обсуждение

В Республике Казахстан ежегодно отмечается тенденция роста объема импорта замороженной спермы племенных быков-производителей молочных и мясных пород зарубежной селекции, в связи с этим увеличивается вероятность распространения аутосомальных летальных рецессивных мутации у животных. По сведениям зарубежных авторов, локальные местные породы крупного рогатого скота свободны от носительства вредных мутации BLAD, DUMPS, CVM, BC и FXID [17], BC и DUMPS [18], BLAD, DUMPS [19]. Известно, что в последнее время

отмечается снижение распространенности летальной точечной мутации BLAD, CVM, DUMPS и BC у племенных животных в результате своевременной PCR диагностики животных на наличие генетических дефектов. Так, в США частота генетического дефекта BLAD в 1992 году среди быков-производителей составила 14,1% и среди коров 5,8% [1].

Для выявления точечной мутации CVM, при скринировании известных SNP, в каждом случае нужны только те олигонуклеотиды, которые соответствуют известным аллельным вариантам. Такие аллель-специфические наборы олигонуклеотидов были использованы для кодирующей части гена SLC35A3 у крупного рогатого скота в позиции 559 G/T. Использование программы Real Time PCR Primer and Probe Database позволяет нам определить последовательности ДНК указанного гена. Следующий этап – синтез праймеров с аллель-специфическим олигонуклеотидом G/T. Однако, применение аллель-специфической полимеразной цепной реакции является трудоемким и длительным процессом, необходимо ставить две реакции с каждым исследуемым образцом (Рисунок 3).

Таким образом, на заключительном этапе работы был разработан метод Real Time PCR SNPs диагностики для детекции носителей ге-

нетического дефекта CVM. Разработанный метод диагностики позволяет в течение двух часов точно определить здоровых гомозиготных животных (Рисунок 4) и гетерозиготных носителей мутации (Рисунок 5). У гетерозиготных носителей мутации идет амплификация с двумя зондами (VIC и FAM), соответственно образуются две кривые. Реал-Тайм ПЦР способ детекции точечной мутации является экспресс методом и сокращаются такие этапы анализа, как – проведение электрофореза, рестрикции продукта амплификации и повторного электрофореза.

Нами, экспериментальным путем установлено, что в случае Real Time PCR SNPs диагностики носителей мутации генетического дефекта BLAD по неизвестной причине идет амплификация фрагментов ДНК с двумя зондами (VIC и FAM, Рисунок 6). Однако, интенсивность накопления продуктов амплификации и графическое изображение кривой позволяет дифференцировать гомозиготных здоровых животных от гетерозиготных носителей мутации BLAD (Рисунок 7).

Результаты Real Time PCR SNPs диагностики генетического дефекта DUMPS оказались ожидаемыми, т.е. у гомозиготных здоровых животных прошла амплификация с меченым олигонуклеотидным VIC зондом (Рисунок 8), полимеразная цепная реакция с FAM зондом не прошла (мутантный аллель), что свидетельствует об специфичности данной реакции. Следует отметить, что разработанная нами методика постановки Real Time PCR SNPs диагностики при наследственных аномалиях CVM, BLAD, DUMPS позволяет в течение двух часов идентифицировать гетерозиготных носителей, значительно сокращается время для исследования образцов.

В заключении следует отметить, что быки производители локальных пород: Алатауской, Аулиекольской, Казахской белоголовой оказались свободными от носительства наследственных заболеваний (CVM, BLAD, DUMPS, BC). Отсутствие носителей генетических дефектов у племенных быков-производителей местных пород можно объяснить тем, что исследуемые животные были Алатауской, Аулиекольской, Казахской белоголовой, которые в своей родословной не имеют предков, носителей аутосомальных рецессивных мутации. Однако, с целью недопущения распространения вредных генетических дефектов рекомендуется проводить мониторинг племенного поголовья методом полимеразной цепной реакции в сочетании с ПДРФ анализом.

По результатам генетического мониторинга были выявлены гетерозиготные носители мутации гена SLC35A3 у животных зарубежной селекции (бык-производитель голштинской черно-пестрой породы, индивидуальный № 1Н008415 CM-R-Run-Morty-Jacson-Et и и бык-производитель породы герефорд, индивидуальный № 2791092 Schu-Lar-3T зарубежной селекции). Для проведения генетического мониторинга племенных животных, спермы, замороженных эмбрионов и других биологических материалов рекомендуется использовать метод Real Time PCR SNPs диагностики.

Работа была выполнена за счет грантового финансирования МОН РК «Мониторинг племенных животных Республики Казахстан на носительство генетических дефектов с помощью молекулярно-генетических методов», сроки реализации 2012-2014 гг, № государственной регистрации 0112PK02603.

Литература

- 1 Shuster D.E., Kehrl M.E., Ackerman M.R., Gilbert R.O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle //Proceeding of the National Academy of Sciences. – 1992. – Vol. 89, No.19. – P. 9225-9229
- 2 Agerholm J.S., Bendixen C., Andersen O., Arnbjerg J. Complex vertebral malformation in Holstein calves//J Vet Diagn Invest. -2001. – Vol. 13, No.4. – P. 283-289
- 3 Robinson J.L., Drabik M.R., Dombrowski D.B., Clark J.H. Consequences of UMP synthase deficiency in cattle // Proc. Nati. Acad. Sci. USA. – 1986. Vol. 80, No.2. – P. 321-323
- 4 Harper P.A., Healy P.J., Dennis J.A., O'Brien J.J., Rayward D.H. Citrullinaemia as a cause of death in neonatal Friesian calves //Aust Vet J. – 1986. – Vol. 63, No.11.-P. 378-379
- 5 Schwenger B., Tammen I., Aurich C. Detection of homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro //J Reprod Fertil. – 1994. – Vol. 100. – P. 511-514
- 6 Poli M.A., Dewey R., Semorile L., Lozano M.E., Albariño C.G., Romanowski V., Grau O. PCR screening for carriers of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and uridine monophosphate synthase (DUMPS) in Argentine Holstein cattle //Zentralblatt Veterinaermed A.- 1996. – Vol. 43. No.3. – P. 163-168
- 7 Dennis J.A., Healy P.J., Beaduet A.L., O'Brien W.F. Molecular definition of Bovine Argininosuccinate synthetase deficiency //Proceeding of Natl Acad Sci USA.- 1989.- Vol. 86, No.20. – P. 7947-7951

- 8 Healy P.J., Dennis J.A., Camilleri L.M., Robinson J.L., Stell A.L., Shanks R.D. Bovine citrullinaemia traced to the sire of Linmack Kriss King // *Aus Vet J.* – 1991. – Vol. 68, No.4. – P. 155
- 9 Robinson J.L., Popp R.G., Shanks R.D., Oosterhof A., Veerkamp J.H. Testing for deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein Friesian cattle of North America and Europe // *Livest Prod Sci.* – 1993. – Vol. 36. – P. 287-298
- 10 Kaminski S., Grzybowski G., Prusak B., Rure A. No incidence of DUMPS carriers in Polish dairy cattle // *J Appl Genet.* – 2005. Vol. 46, No.4. – P. 395-397
1. Bahnak B.R., Wu Q.Y., Coulombel L., Drouet L., Kerbiriou-Nabias D., Meyer D. A single and efficient method for isolating high molecular weight DNA from mammalian sperm // *NAR.*-1988. – Vol. 16, No. 3.- P. 1208.
2. Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction // *Science.*-1991. – Vol. 252. – P. 1643-1651
3. Huang M.M., Arnheim N., Goodman M.F., Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR // *NAR.* – 1992. – Vol. 20, No.17. – P. 4567–4573
4. Усенбеков Е.С., Альпейсов Ш.А., Жансеркенова О.О., Касымбекова Ш.Н. Применение полимеразной цепной реакции для выявления точечной мутации у быков-производителей // *Журнал «Известия, Результаты».* – 2013. № 3. – С. 79-86
5. Grupe S., Diet G., Schwerin M. Population survey of citrullinemia on German Holsteins // *Livestock Prod Sci.* – 1996. – Vol. 45, No. 1. – P. 35-38
6. Zhang Y., Xuehua F., Dongxiao S., Yachun W., Ying Y., Yan X., Shengli Z., Yuan Z.Z. A novel method for rapid and reliable detection of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle // *J Anim Sci Biotechnol.* – 2012. – Vol. 3, No.1. – P. 24-30
7. Meydan H., Uğurlu M., Yildiz M.A. Monitoring of BLAD, DUMPS, CVM, BC and FXID in Turkish Native Cattle Breeds // *Journal of Agricultural Sciences.* – 2012. – Vol. 18. – P. 239-245
8. Patel R.K., Singh K.M., Soni K.J., Chauhan J.B., Sambasiva Rao K.R.S. Lack of carriers of Citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle // *J Appl Genet.* – 2006. – Vol. 47, No.3. – P. 239-242
9. Rahimi G., Nejati-Javaremi A., Olek K. Genotyping BLAD, DUMPS and – CSN loci in Holstein young bulls of the National Animal Breeding Center of Iran // *Pakistan J Biol Sci.* -2006. – Vol. 9, No.7. – P. 1389-1392

References

1. Shuster DE, Kehrl ME, Ackerman MR, Gilbert RO (1992) Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proceeding of the National Academy of Sciences* Vol. 89 (19): P. 9225-9229
2. Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O, Arnbjerg J (2001) Complex vertebral malformation in Holstein calves. *J Vet Diagn Invest* Vol. 13 (4): P. 283-289
3. Robinson JL, Drabik MR, Dombrowski DB, Clark JH (1986) Consequences of UMP synthase deficiency in cattle. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 80 (2), 321-323
4. Harper PA, Healy PJ, Dennis JA, O'Brien JJ, Rayward DH (1986) Citrullinaemia as a cause of death in neonatal Friesian calves. *Aust Vet J*, Vol. 63 (11): P. 378-379
5. Schwenger B, Tammen I, Aurich C (1994) Detection of homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil.* Vol. 100: P. 511-514
6. Poli MA, Dewey R, Semorile L, Lozano ME, Albariño CG, Romanowski V, Grau O (1996) PCR screening for carriers of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and uridine monophosphate synthase (DUMPS) in Argentine Holstein cattle. *Zentralblatt Veterinaermed A* Vol. 43 (3): P. 163-168
7. Dennis JA, Healy PJ, Beaduet AL, O'Brien WF (1989) Molecular definition of Bovine Argininosuccinate synthetase deficiency. *Proceeding of Natl Acad Sci USA*, Vol. 86 (20): P. 7947-7951
8. Healy PJ, Dennis JA, Camilleri LM, Robinson JL, Stell AL, Shanks RD (1991) Bovine citrullinaemia traced to the sire of Linmack Kriss King. *Aus Vet J*, Vol. 68 (4): P. 155
9. Robinson JL, Popp RG, Shanks RD, Oosterhof A, Veerkamp JH (1993) Testing for deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein Friesian cattle of North America and Europe. *Livest Prod Sci* Vol. 36: P. 287-298
10. Kaminski S, Grzybowski G, Prusak B, Rure A (2005) No incidence of DUMPS carriers in Polish dairy cattle. *J Appl Genet* Vol. 46 (4): P. 395-397
11. B.R.Bahnak, Q.Y.Wu, L.Coulombel, L.Drouet, D.Kerbiriou-Nabias and D.Meyer (1988) A single and efficient method for isolating high molecular weight DNA from mammalian sperm.// *NAR* Vol. 16 (3): P. 1208.
12. Erlich, HA, Gelfand D, Sninsky JJ (1991) Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, Vol. 252: P. 1643-1651
13. Huang MM, Arnheim N, Goodman MF (1992) Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *NAR* Vol. 20 (17): P. 4567–4573
14. Usenbekov ES, Alpejsov ShA, Zhanserkenova OO, Kasymbekova ShN (2013) The use of polymerase chain reaction for the detection of point mutations in bulls. *Journal Izdenister, results [Primenenie polimeraznoj cepnoj reakcii dlja vyjavlenija tochechnoj mutacii u bykov-proizvoditelej. Zhurnal Izdenister, Rezultaty]* 3: 79-86. (In Russian)
15. Grupe S, Diet G, Schwerin M (1996) Population survey of citrullinemia on German Holsteins. *Livestock Prod Sci*, Vol. 45 (1): P. 35-38
16. Zhang Yi , Xuehua Fan, Dongxiao Sun, Yachun Wang, Ying Yu, Yan Xie, Shengli Zhang and Yuan Zhang Zhang (2012). A novel method for rapid and reliable detection of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *J Anim Sci Biotechnol* Vol. 3 (1): P. 24-30

17. Meydan H, Uğurlu M, Yıldız MA (2012) Monitoring of BLAD, DUMPS, CVM, BC and FXID in Turkish Native Cattle Breeds. *Journal of Agricultural Sciences*. Vol. 18: P. 239-245
18. Patel RK, Singh KM, Soni KJ, Chauhan JB, Sambasiva Rao KRS (2006) Lack of carriers of Citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle. *J Appl Genet* Vol. 47 (3): P. 239-242
19. Rahimi G, Nejati-Javaremi A, Olek K (2006) Genotyping BLAD, DUMPS and – CSN loci in Holstein young bulls of the National Animal Breeding Center of Iran. *Pakistan J Biol Sci*, Vol. 9 (7): P. 1389-1392