

УДК 636.034:575.174:575.113

Е.С. Усенбеков<sup>1</sup>, К.Ж. Жуманов<sup>1</sup>, В.П. Терлецкий<sup>2</sup><sup>1</sup>Казахский национальный аграрный университет, г. Алматы, Казахстан<sup>2</sup>ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАН, г. Санкт-Петербург-Пушкин, Россия,

\*e-mail: usen03@mail.ru

### Генетическая природа наследственных болезней крупного рогатого скота и молекулярно-генетические методы их диагностики

В данной статье рассматривается роль точечной мутации в этиологии наследственных болезней крупного рогатого скота, авторами для детекции генетических дефектов BLAD, BC, CVM, DUMPS у племенных быков-производителей был использован метод полимеразной цепной реакции и ПДРФ анализа. Установлено, что племенные быки отечественной селекции являются свободными от вредных генетических мутаций.

**Ключевые слова:** ПЦР, рестрикция амплификата, электрофорез летальная ауtosомальная рецессивная мутация, BLAD, Citrullinemia, CVM, DUMPS.

Y.S. Ussenbekov, K.J.Zhumanov, V.Terletskiy

#### Genetic nature of hereditary diseases cattle and molecular genetic methods of diagnosis

This article discusses the role of a point mutation in the etiology of hereditary diseases of cattle, the authors for the detection of genetic defects BLAD, BC, CVM, DUMPS in tribal sires was used polymerase chain reaction and RFLP analysis. Found that domestic breeding bulls are free from harmful genetic mutations.

**Keywords:** PCR, restriction amplificate, electrophoresis lethal autosomal recessive mutation, BLAD, Citrullinemia, CVM, DUMPS.

Е.С. Усенбеков, Қ.Ж. Жуманов, В.П. Терлецкий

#### Ірі қара малындағы тұқымқуалаушылық ауруларының генетикалық себептері және оларды балаудың молекулярлық-генетикалық әдістері

Аталған мақалада ірі қара малында тұқымқуалаушылық аурулардың пайда болуында нүктелік мутацияның маңызды қарастырылған, авторлар асыл тұқымды бұқаларда генетикалық кемтарлықтарды, BLAD, BC, CVM, DUMPS анықтауға полимераздық тізбек реакциясын және рестрикциялық фрагменттер ұзындықтарының полиморфизмін пайдаланған. Отандық асыл тұқымды бұқаларда зиянды генетикалық мутациялардың жоқ екендігі анықталған.

**Түйін сөздер:** ПТР, амплификатты рестрикциялау, электрофорез летальді ауtosомальдық рецессивтік мутация, BLAD, Citrullinemia, CVM, DUMPS.

В настоящее время в нашей стране животноводство является ведущей отраслью сельскохозяйственного производства, поставщиком ценных продуктов питания для человека и сырья для промышленности. Вместе с тем все чаще проявляются признаки генетической эрозии - накопления груза вредных рецессивных мутаций. При этом снижаются воспроизводительная способность и плодовитость, жизнеспособность новорожденных и молодняка, резистентность, продолжительность хозяйственного использования животных, что отрицательно влияет на рентабельность производства. У крупного рогатого скота выявлено 43 генетических дефектов, при которых в настоящее время разработаны молекулярно-генетические методы диагностики [1,2].

BLAD- (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency) дефицит адгезии лейкоцитов, наследственная ауtosомальная рецессивная болезнь, обусловленная точечной мутацией в кодирующей части гена CD18, контролирующего синтез гликопротеида - интегрин, играющего большую роль в регуляторной функции лейкоцитов. Экспрессия  $B_2$ -интегрин требует межклеточной ассоциации субъединиц CD11 и C18, однако точечная мутация в 383 положении гена CD18 запрещает подобную ассоциацию из-за замены аспарагиновой кислоты на глицин. Был выделен из геномной библиотеки крупного рогатого скота ген кодирующий CD18-гликопротеид и определена последовательность этого гена. Установлены две точечные мутации

в кодирующей части гена CD18 у крупного рогатого скота в положениях 383 А-Г, и 775 С-Т. Вторая мутация оказалась молчащей, а первая и является причиной этой аутосомальной рецессивной болезни [3].

CVM - (Complex vertebral malformation), комплексное уродство позвоночника у крупного рогатого скота, как летальная аутосомальная рецессивная наследственная болезнь впервые была описана в 2001 году американским ученым Agerholm J.S. Ген SLC35A3, кодирующий синтез UDP-N-acetylglucosaminetransporter расположен на 3 хромосоме, размер гена 58582 пар нуклеотидов. В результате данной мутации произошла замена аминокислоты в составе пептида в позиции 180 валина на фенилаланин [4].

BC (Bovine Citrullinaemia) - это врожденное нарушение обмена веществ из-за дефицита фермента цикла мочевины, аргининсукцинат синтетазы (L-citrulline:L-aspartate ligase). Эта болезнь была впервые описана у людей, но относительно недавно установлена у молочного скота Австралии. Анализ последовательности гена ASS показал, что нуклеотидная замена С на Т является причиной точечной мутации у крупного рогатого скота. Известно, что у животных носителей мутации Citrullinemia исчезает сайт рестрикции для эндонуклеазы Ava II и этот полиморфизм используется для ПЦР диагностики.

Дефицит аргининсукцинатсинтетазы обусловлен наличием гена ASS, локализованного на 11-й хромосоме, в пептидном продукте которого происходит замещение аминокислоты Arg 86, вследствие чего утрачивается его активность [5].

DUMPS (Deficiency of uridine monophosphate synthase), является смертельным наследственным аутосомно-рецессивным расстройством крупного рогатого скота, которое сопровождается эмбриональной смертностью в период имплантации в начальной стадии стельности у коров. Ген UMP локализован на I (q31-36) хромосоме, имеет длину 65 062 пар оснований, аутосомальная рецессивная болезнь возникла в результате точечной замены нуклеотида G-Т кодона 405 экзона 5 гена UMP. У здоровых животных (животные с диким типом аллели) амплифицируемый фрагмент имеет сайт рестрикции для рестриктазы

AvaI (CYCGRG), где Y – Т или С, а R – А или G нуклеотиды и амплификат режется на три фрагмента, у гетерозиготных животных четыре фрагмента и гомозиготных животных два фрагмента, так как исчезает сайт рестрикции для рестриктазы AvaI [3].

Наследственные болезни крупного рогатого скота: BLAD, CVM, BC и DUMPS являются следствием точечной мутации в кодирующей части соответствующих генов CD 18, SLC35A3, ASS и UMP. Использование молекулярно-генетических методов детекции точечной мутации позволяет в течение 4-5 часов выявить гетерозиготных и гомозиготных носителей мутации. В связи вышеизложенным перед нами была поставлена задача поставить технологию ПЦР диагностики генетических дефектов у племенных быков-производителей.

#### Материалы и методы

Исследования проводились на 67 племенных быках-производителей АО «Асыл-Тулик» и на 43 быках ТОО «Асыл» в учебно-научно-диагностической лаборатории Казахстанско-Японского инновационного центра Казахского национального аграрного университета. В качестве материала для исследования были использованы замороженные спермы быков-производителей. 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 1 мл лизирующего буфера, имеющий состав 100 мМ Трис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, pH 8,0 и перемешивали в течение 30 секунд, далее центрифугировали при обороте 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. 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 инструкции.

Полимеразную цепную реакцию проводили на термоциклере «Терцик». Для выявления полиморфизма гена CD 18 мы использовали следующие праймеры: F 5'-AGGCAGTTGCGTTCAATGTGA - 3' и R 5'-

CCGACTCGGTGATGCCATTGA- 3', гена SLC35A3 аллель специфические праймеры CVM – G, F 5'- CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAG- 3' и CVM – T, F 5'- CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAT- 3' и R 5'- CGATGAAAAAGGAACCAAAAGGG – 3'.

Для ПЦР анализа по локусам DUMPS, Citrullinemia кроме существующих праймеров, мы разработали дизайн собственных праймеров. Так, для амплификации участка гена ASS (Citrullinemia) прямой праймер Usen-1, 5'- AAGGAGTTTGTGGAGGAGTTCAT - 3' и обратный праймер Usen-2, 5'- GAGACACATACTTGGCTCCTTCTC - 3'. Использование данного набора праймеров позволяет амплифицировать фрагмент гена ASS длиной 151 п.н. и после рестрикции получаем фрагменты размерами: 58, 93 и 151 п.н.

Зарубежные ученые для детекции точечной мутации DUMPS использовали праймеры: F 5'- GCAAATGGCTGAAGAACAATTCTG -3' и R 5' – GCTTCTAACTGAACTCCTGGAGT--3' , при этом длина амплификата была 108 п.н., после рестрикции были бэнды 52, 56 и 108 п.н. Нами были разработаны праймеры, F 5'- TGAGTTCAATGTGACATGAGAAAAT -3' и R 5' – ATTACCAATCAATAGGCTTACCTCC-3', позволяющие амплифицировать фрагмент гена UMP размером 236 п.н. и после обработки эндонуклеазой 82, 154 и 236 п.н. Специфические праймеры были синтезированы лабораторией Applied Biosystems.

Условия проведения полимеразной цепной реакции: первый шаг - 94 °С – 5 минут, второй шаг – денатурация при 94 °С – 45 сек, отжиг праймеров – 62 °С 45 сек и элонгация при температуре 72 °С 45 сек. Объем реакционной смеси был 50 мкл, имеющий следующий состав: 5 мкл 10 X буфера для ПЦР, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мкл 25 мкМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл 0,2 мМ концентрации каждого dNTP, 0,5 мкл фермента Taq Polymerase с активностью 5u/μl, 5 мкл ДНК и 26,5 мкл дистиллированной воды.

В настоящее время молекулярно-генетические основы генетических дефектов крупного рогатого скота достаточно хорошо изучены, на основании этих исследований разработаны методы диагностики наследственных заболеваний. По изучаемым нами локусам, известны места локализации генов, кодирующих синтез соответствующего пептида, параметры генов, где и в какой позиции произошла точечная мутация и т.д. (таблица 1).

Обычно для выявления здоровых животных и гетерозиготных носителей продукт амплификации подвергается рестрикции. Горизонтальный электрофорез проводили в 3 % агарозном геле: напряжение 180 В, сила тока 150 мА, мощность 50 Вт и продолжительность 45-60 минут. Для визуализации результатов электрофореза использовали гель документирующую систему.

**Таблица 1** – Генетические дефекты у крупного рогатого скота и их характеристика

Основные параметры	Название генетического дефекта			
	BLAD	CVM	DUMPS	BC
Название гена	CD 18	SLC35A3	UMP	ASS
Локализация гена	Хромосома 1	Хромосома 3	Хромосома 1 (q31-36)	Хромосома 11
Размер гена	37901 п.н.	58582 п.н.	65 -062 п.н.	67 600 п.н.
Замена нуклеотида дикой тип/мутация	в позиции 383 А - G	в позиции 559 G - T	кодон 405 экзон 5 C- T	кодон 86 экзон 5 C -T
Сайт рестрикции эндонуклеазы	Taq I – (T/CGA)	Pst I – (CTGCA/G)	Ava I – (C/YCGRG)	Ava II - (GG/WCC)
Здоровые гомозиготные	A/A	G/ G	C/C	C/C
Гетерозиготные носители	A/G	G/T	C/T	C/T
Гомозиготные носители	G/G	T/T	T/T	T/T

### Результаты и их обсуждение

Нами всего протестированы 110 животных, в том числе 67 голов АО «Асыл-Тулик» и 43 головы ТОО «Асыл». По результатам ПЦР диагностики выявлены один бык-производитель гетерозиготный носитель BLAD синдрома, кличка - Winston индивидуальный номер 03.53079619 породы герефорд и два быка оказались гетерозиготными носителями SVM, так бык CM-R-Run-Morty-Jacson-Et, индивидуальный номер 1HO08415, голштинской черно-пестрой породы второе животное Schu-Lar-3T индивидуальный номер 42791092 породы

герефорд. Низкую частоту мутации генетических дефектов по локусу BLAD и SVM и отсутствие носителей точечной мутации генов ASS и UMP у племенных бык-производителей можно объяснить тем, что основная часть исследуемых животных, были местной Алатауской, Аулиекольской, Казахской белоголовой, Аулиеатинской пород, которые в своей родословной не имеют предков, носителей мутации. На основании исследования рекомендуем для исключения распространения вредных мутации проводить регулярно мониторинг племенных животных методом ПЦР-ПДРФ анализа.

### Литература

- 1 Patel R K. Autosomal resseive genetic disorders of cattle breeds Wourdwide – a Review // Journal of Livestock Biodiverity. - 2010. – Vol. 2. - n 1. – P. 35-41.
- 2 Яковлев А., Терлецкий В., Митрофанова О., Дементьева Н. Определение носителей генетических дефектов среди быков-производителей // Молочное и мясное скотоводство. – 2004. – Т.6. – С.31-32.
- 3 Rahimi G., Nejati A., Olek K. Genotyping BLAD DUMPS and k-CSN Loci Holstein Yong Bulls of the National Animal Breeding Center of Iran // Pakistan Jornal Biological Scienes. - 2006. – V.9(7). – P.1389-1392.
- 4 Agerholm J S, Bendixen C, Andersen O & Arnbjerg J. Complex vertebral malformation in Holstein calves // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. - 2001. – V. 13. – P. 283-289.
- 5 Dennis J A, Healy P J, Beaudet A L & O'brien W E Molecular definition of bovine agrininosuccinatesynthetase deficiency // Proceeding of the National Academy of Sciences. - 1989. – V. 86. – P. 7947-7951.