DOI: 10.48612/8gm5-7nrn-v68g
УДК 636.22/.28.082.2

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИИ В ЛОКУСЕ FMO3

Ковалюк Наталья Викторовна, д-р биол., наук
Ширяева Елена Витальевна, канд. биол. наук
Якушева Людмила Ивановна, канд. биол. наук
Шахназарова Юлия Юрьевна
ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»
г. Краснодар, Российская Федерация

Триметиламинурия – моногенное заболевание, вызываемое наличием нонсенс-мутации (g.39523051C>T) в гене бычьего FMO3. Заболевание приводит к появлению «рыбного» запаха и послевкусия молока. В зарубежных субпопуляциях айрширских животных частота встречаемости носителей мутантных аллелей достигает 15%. Насколько аномалия распространена в отечественной субпопуляции айрширского скота не ясно, так как данных об этом нет.

Ключевые слова: айрширский скот; FMO3; рыбный запах молока

DEVELOPMENT OF A TEST SYSTEM FOR IDENTIFYING MUTATIONS AT THE FMO3 LOCUS

Kovalyuk Natalia Viktorovna, Dr. Biol. Sci.
Shiryaeva Elena Vitalievna, PhD Biol. Sci.
Yakusheva Lyudmila Ivanovna, PhD Biol. Sci.
Shakhnazarova Yulia Yuryevna
Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine,
Krasnodar, Russian Federation

Trimethylaminuria is a monogenic disease caused by the presence of a nonsense mutation (g.39523051C>T) in the bovine FMO3 gene. The disease leads to the appearance of a "fishy" smell and the aftertaste of milk. In foreign subpopulations of Ayrshire animals, the frequency of carriers of mutant alleles reaches 15%. How widespread the anomaly is in the domestic subpopulation of Ayrshire cattle is not clear, as there is no data on it.

Key words: Ayrshire cattle; FMO3; fishy milk smell

Рыбный запах молока или триметиламинурия – моногенное заболевание, которое связано с нарушением органолептических качеств молока, в частности, появлением рыбного послевкусия при употреблении молока от коров, больных этим заболеванием. Коровье молоко, куриные и перепелиные яйца иногда имеют рыбный привкус, было установлено, что этот фенотип обусловлен повышенным уровнем ТМА [1-5].

Рыбный привкус в коровьем молоке вызван наличием нонсенс-мутации (g.39523051C>T) в гене бычьего FMO3. Оказалось, что эта мутация встречается довольно часто (q = 0,155) у животных айрширской породы крупного рогатого скота [1]. Аналогичная мутация была обнаружена у шведского красного КРС, который образовался в результате скрещивания шведского красно-белого скота с животными айрширской породы. В популяции шведского красного скота частота встречаемости мутантного аллеля гена FMO3 достигает 14 %. Родоначальника этой мутации обнаружить не удалось, но известно, что это представитель айрширской породы. В доступной литературе отсутствуют сведения о каком-то другом негативном влиянии мутации на организм носителей дефекта, кроме ухудшения органолептических свойств вырабатываемого ими молока [1].

Учитывая, что выявленные носители мутации, являются интенсивно используемыми быками - производителями и могут передавать эту аномалию значительному числу дочерей, считаем, что генотипирование по локусу FMO3 должно стать обязательным для

быков-производителей и групп быкопроизводящих коров племенных айрширских хозяйств.

Нами была разработана тест-система для выявления FMO3 полиморфизма.

Методика исследований. Объектом для изучения служили быки-производители айрширской породы (n=45). Исследования проведены на базе лабораторий биотехнологии ФГБНУ КНЦЗВ и молекулярно-генетической экспертизы ООО НПО «Юг-Плем». Для выделения ДНК из крови применяли наборы реагентов *Diatom™ DNA Prep 100,* постановки ПЦР-реакции — наборы реагентов *Gene Pak PCR Core* (ООО Лаборатория «Изоген», г. Москва). В силу экономических причин, описанный в литературе способ диагностики мутации (пиросеквенирование, [1]), нас не устраивал. Поэтому был разработан не требующий дорогостоящего оборудования тест на основе метода ПЦР/ПДРФ. Праймеры и эндонуклеаза рестрикции были подобраны с использованием данных сайта https://omia.org/home/ и программы Primer Premier; условия амплификации – эмпирическим путём.

Нами были сконструированы следующие праймеры:

FMO3.1 5´GGCATATCTACTACAGTCACCACG3´
FMO3.2 5´AGCCGTAGTTCTCGTGCTTG 3´

Оптимальная температура отжига праймеров составила 60 °С.

В результате фрагменты, которые амплифицировались с участка гена FMO3 «дикого» типа, расщеплялись эндонуклеазой – TaqI (№ E133, НПО «СибЭнзим) на 2 фрагмента: 136 и 99 пн. Фрагменты, амплифицированные с мутантного аллеля, сайта рестрикции не имели (их размер составлял – 235 пн). Результаты рестрикции оценивали в 2.0 % агарозном геле (рисунок 1).

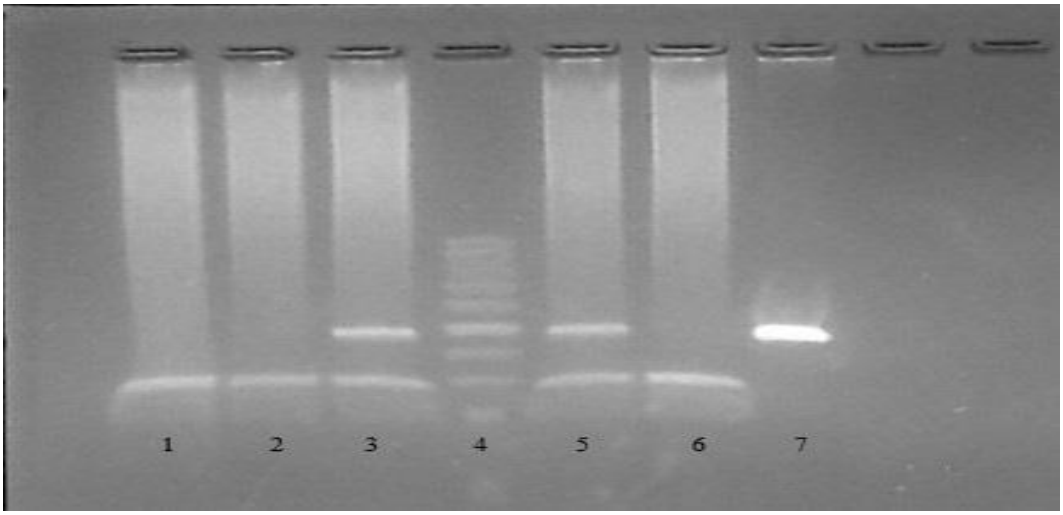

Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов гидролиза амплификатов участка гена FMO3 эндонуклеазой рестрикции TaqI:
1, 2, 6 – генотип CC
3, 5 – генотип CT
7 – амплификат участка гена FMO3 (не рестрицирован TaqI)
4 – маркер молекулярного веса

Апробация разработанной тест-системы была проведена с использованием пробы от быка с известным генотипом. Фактические частоты встречаемости отдельных генотипов определяли путем соотношения числа, носителей генотипа, к общему числу особей в анализируемой группе.

Результаты исследований и их обсуждение. Установлено, что среди айрширских быков-производителей, принадлежащих различным племенным предприятиям, частота встречаемости носителей FMO мутации (генотип CT) составила 0,090. Частота встречаемости носителей в обследованной современной субпопуляции оказалась ниже, чем описано в литературе.

Выводы. Таким образом, на основе метода ПЦР/ПДРФ с использованием эндо-

нуклеазы рестрикции TaqI, нами была разработана простая в использовании тест-система, позволяющая генотипировать крупный рогатый скот по локусу FMO3. Носителями мутантного аллеля оказались 9 % животных.

Список литературы

1. Lunden A.A Nonsense mutation in the FMO3 gene underlies fishy off-flavor in cow's milk. /A. Lunden, S. Marklund, V. Gustafsson, L. Andersson // Genome Research 12:1885-1888, 2002. Pubmed reference: 12466292. DOI: 10.1101/gr.240202.

2. Lundén A. High trimethylamine concentration in milk from cows on standard diets is expressed as fishy off-flavour. /A. Lunden, V. Gustafsson, M. Imhof, R. Gauch, J. Bosset, // O. *J Dairy Res* 69:383-90, 2002. Pubmed reference: 12369409.

3. MoF. Quail FMO3 gene cloning, tissue expression profiling, polymorphism detection and association analysis with fishy taint in eggs./ F. Mo, J. Zheng, P. Wang, L. Lian, G. Yi, G. Xu, N. Yang // PLoS One. 2013 Nov 25;8(11): e81416. doi: 10.1371/journal.pone.0081416. eCollection 2013. PMID: 24282592

4. Krueger S.K. /Williams DE. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism // Pharmacol Ther. 2005 Jun;106(3):357-87. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.01.001. PMID: 15922018

5. Honkatukia M. Fishy taint in chicken eggs is associated with a substitution within a conserved motif of the FMO3 gene / M. Honkatukia, K. Reese, R. Preisinger, M. Tuiskula-Haavisto, S. Weigend, J. Roito, A. Mäki-Tanila, J. Vilkki //Genomics. 2005 Aug;86(2):225-32.

DOI: 10.48612/fa8n-69de-krgp
УДК 619:618.177-089.888.11:636.22/.28.082

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА МОЭТ В ПРОГРАММАХ СЕЛЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Скачкова Ольга Александровна
Бригида Артем Владимирович, канд. вет. наук
Институт инновационных биотехнологий в животноводстве (ИИБЖ) – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста); г. Москва, Российская Федерация

Технология трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота позволяет быстро получать множество эмбрионов и применять их биологические образцы для геномных исследований, активно развивающихся в скотоводстве. Однако эффективность извлечения эмбрионов из матки суперовулированных коров-доноров не превышает 80 %. В связи с тем, что имеющиеся в арсенале средств для извлечения эмбрионов методы самотека, шприцевания или электронасосный требуют оценки их сравнительной эффективности, нами проведено исследование результативности данных методов. Коровы-доноры в количестве 43 головы были распределены на три группы. Метод самотека был применен в группе I (n = 16), метод шприцевания – в группе II (n = 13), электронасосный метод – в группе III (n = 14). Показано, что электронасосный метод, примененный в группе III, был эффективнее, чем метод самотека, на 19,1 %, и метода шприцевания – на 15,6 %.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; эмбрион; суперовуляция; воспроизводство

INCREASING THE EFFICIENCY OF THE MOET METHOD IN CATTLE SELECTION PROGRAMS

Skachkova Olga Aleksandrovna
Brigida Artem Vladimirovich, PhD Vet. Sci.
Institution of innovative biotechnology in animal husbandry (IIBZH) - a branch of the Federal State