

DOI: 10.48612/sbornik-2023-2-1

УДК 636.234.1.082.2

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГАПЛОТИПА ФЕРТИЛЬНОСТИ НН4 И ЕГО РАСПРОСТРАНЕНИЕ СРЕДИ БЫКОВ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ

Ковалюк Наталья Викторовна, д-р биол. наук

Волченко Анастасия Евгеньевна, канд. 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

Несмотря на все достоинства искусственного осеменения, эта технология способствует тому, что быки, носители генетических аномалий в скрытом состоянии, могут передавать их тысячам или даже десяткам тысяч дочерей и сыновей, что способствует накоплению различного рода мутаций в популяциях крупного рогатого скота. Нами разработана тест-система для выявления носительства гаплотипа НН4, а также установлена частота встречаемости носителей этой мутации среди быков-производителей голштинской породы, используемых в системе искусственного осеменения.

Ключевые слова: локус GART (гаплотип НН4); полиморфизм; тест-система; голштинский скот; генетические аномалии

A TEST SYSTEM FOR THE IDENTIFICATION OF THE FERTILITY HAPLOTYPE НН4 AND ITS DISTRIBUTION AMONG THE HOLSTEIN BREEDING BULLS

Kovalyuk Natalia Viktorovna, Dr. Biol. Sci.

Volchenko Anastasia Evgenievna, PhD Biol. Sci.

Shiryayeva Elena Vitalievna, PhD Biol. Sci.

Yakusheva Lyudmila Ivanovna, PhD Biol. Sci.

Shakhnazarova Yulia Yurievna

Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine,

Krasnodar, Russian Federation

Despite all the advantages of artificial insemination, this technology contributes to the fact that bulls, carriers of genetic anomalies in a latent state, can transmit them to thousands or even tens of thousands of daughters and sons, which contributes to the accumulation of various kinds of mutations in cattle populations. We have developed a test system for detecting haplotype carriers НН4, and also the frequency of occurrence of carriers of this mutation among the Holstein breeding bulls used in the artificial insemination system has been established.

Key words: GART locus (haplotype НН4); polymorphism; test system; Holstein cattle; genetic anomalies

Голштинский гаплотип НН4 идентифицирован в 2014 году. Рecessивный летальный аллель гена GART приводит к эмбриональной смертности на ранних

стадиях развития. В базе OMIA он зарегистрирован под номером 001826. Ген GART локализован на 1-й хромосоме в области 1,9—3,3 Mb [2]. Установлено, что гаплотипу HH4 соответствует миссенс-мутация А→Ц в положении 1.277.227 в гене GART (глицинамид-рибонуклеотид трансформилаза), который катализирует биосинтез пурина и необходим для нормального эмбрионального развития [1].

С 2013 года все поголовье быков США и Франции анализируется по этому гену. Частота встречаемости — 0,37 % в США, 7,2 % — во Франции. Широкое распространение гаплотипа HH4 произошло через французского быка JOCKO BESNE, от которого было получено более 1,7 млн доз семени. Число ферм во Франции, где используются дочери JOCKO BESNE, — свыше 23000 [2].

Методика исследований. Исследования проведены на базе лабораторий биотехнологии ФГБНУ КНЦЗВ и молекулярно-генетической экспертизы ООО НПО «Юг-Плем».

Объект исследования - быки-производители голштинской породы 3 племенных предприятий: ООО «ЦентрПлем», АО «Невское» по племенной работе и ОАО «Племпредприятие «Череповецкое». Общая численность выборки составила 259 голов.

Молекулярно-биологические исследования проводились с использованием ДНК, выделенной из образцов спермы, методами полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПЦР и анализа полиморфизма длин фрагментов рестрикции (ПДРФ). Для выделения ДНК из образцов семени использовали наборы реагентов Diatom™ DNA Prep 100 ООО «Лаборатория Изоген» г. Москва.

Для проведения ПЦР/ПДРФ использовались микроцентрифуга Мини Спин (Eppendorf), амплификатор нуклеиновых кислот T100 (Bio-Rad Laboratories), камеры для горизонтального (SE-1, SE-2) электрофореза (ООО «Хеликон»), источник пи-

тания Power Pac Basic (Bio Rad), трансиллюминатор TFX (Vilber Lourmat).

Режимы амплификации были подобраны с использованием функции «Gradient» амплификатора T100.

Результаты исследований и их обсуждение. С использованием данных базы OMIA и возможностей Gene Bank часть нами была разработана тест-система для выявления гаплотипа HH4.

Мы имели информацию о потенциальном носителе данного гаплотипа (бык NL524509038, <https://www.cdn.ca>). Образец семени этого быка был взят на анализ в качестве контрольного образца.

Для генотипирования по локусу GART использовали праймеры следующей последовательности (подбор праймеров осуществлен нами в программе Primer Premier):

HH4.1	5'
TGAAGGTGTCTCTATGCTGGTAT 3'	
HH4.2	5'
CCTGGAAAACACACAATCAGTATG 3'	

Применялись следующие условия амплификации: 94 °C – 3,5 мин; 94 °C – 30 с, 58 °C – 34 с, 72 °C – 30 с (30 циклов); 72 °C – 3 мин.

ПЦР-продукт (размером 256 п. н.), синтезируемый с мутантного аллеля, должен отличаться от ПЦР-продукта, считываемого с нормального аллеля точечной заменой одного нуклеотида А → С.

Для выявления мутантного варианта аллеля была подобрана рестриктаза Tru9I, которая осуществляет разрыв цепи ДНК в нуклеотидной последовательности: TT↓AA. Полученные амплификаты подвергались воздействию эндонуклеазы Tru9I 3ч при 65 °C.

Подобная рестрикция, в случае обработки амплификата нормального аллеля, приводит к образованию 3 фрагментов: 60, 59 и 137 пар нуклеотидов;

В случае аллеля с мутацией – 2 фрагментов: 119 и 137 пар нуклеотидов. Визуализация продуктов рестрикции проводилась в 2,5% агарозном геле (рисунок).

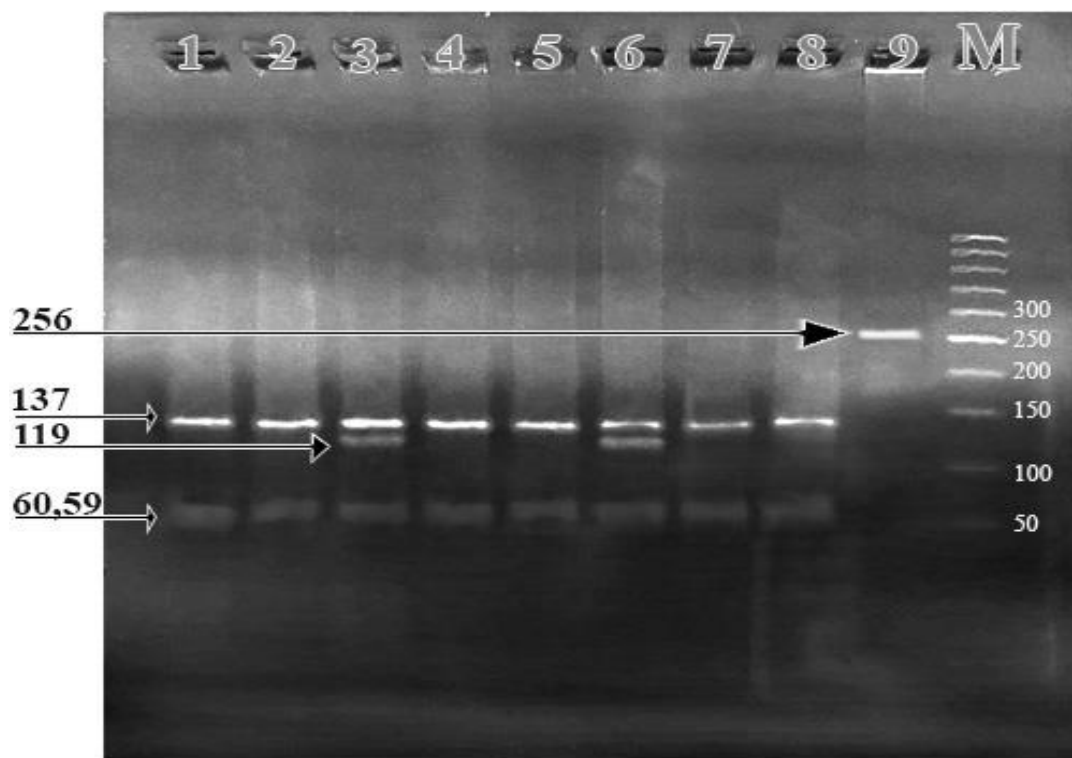


Рисунок - Электрофореграмма продуктов рестрикции амплификатов участка гена GART эндонуклеазой Tru9I
 1, 2, 4, 5, 7 – продукты рестрикции амплификатов участка гена GART эндонуклеазой Tru9I от здоровых животных;
 3 – контрольный образец (NL524509038);
 6 – носитель гаплотипа НН4;
 9 – амплификат участка гена GART 256 пн (не рестрицированный);
 5 – маркер молекулярных весов с шагом 50 пн.

В выборке 259 голов голштинского скота было выявлено 2 положительных образца от животных - носителей гаплотипа НН4. Частота встречаемости гаплотипа НН4 составила 1 %.

Выводы. Таким образом, проблема распространения носительства гаплотипа НН4 для молочного скотоводства Краснодарского края в настоящее время не является острой. Однако, как и в случае других гаплотипов, с целью не допустить в дальнейшем распространения мутации в гене GART, необходим мониторинг частоты встречаемости наиболее распространенных генетических аномалий, прежде всего у быков-производителей.

Список литературы

1. Ng A., Uribe R.A., Yieh L., Nuckels R., Gross J.M. // Zebrafish mutations in gart and paics identify crucial roles for de novo purine synthesis in vertebrate pigmentation and ocular development. *Development*, 2009, 136(15): 2601-2611 (doi: 10.1242/dev.038315)
2. Ferreira F, Esteves S, Almeida LS, Gaspar A, da Costa CD, Janeiro P, Bandeira A, Martins E, Teles EL, Garcia P, Azevedo L, Vilarinho L. Trimethylaminuria (fish odor syndrome): genotype characterization among Portuguese patients. *Gene*. 2013 Sep 15; 527(1): 366-70. doi: 10.1016/j.gene.2013.05.025. Epub 2013 Jun 17. PMID: 23791655