

О.П. КУРАК<sup>1</sup>, Л.А. БАРАНОВА<sup>2</sup>, В.П. ЕМЕЛЬЯНОВА<sup>2</sup>,  
Ж.А. ГРИБАНОВА<sup>1</sup>

## ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ МУТАЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

<sup>1</sup>РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук  
Беларуси по животноводству»

<sup>2</sup>ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии»

**Введение.** Изучение проблемы скрытого генетического груза у крупного рогатого скота рассматривается в качестве перспективного приема оздоровления генофонда племенного поголовья и повышения сохранности молодняка. Интенсивное использование в молочном скотоводстве мирового породного генофонда лучших быков-производителей голштинской породы и биотехнологий репродукции позволило не только значительно повысить генетический потенциал племенных животных, но и способствовало распространению патогенных и наследственных заболеваний и прочих генетических нарушений. При этом наблюдается снижение воспроизводительной способности и плодовитости, жизнеспособности молодняка, продолжительности хозяйственного использования животных. Все острее становится проблема повышения резистентности животных. В этих условиях возросло значение проблемы контроля скрытых наследственных аномалий, особенно среди быков-производителей на племпредприятиях.

Анализ научной литературы показывает, что распространение отдельных мутаций с летальным исходом в ряде стран оказалось весьма значимым. Прежде всего, это касается BLAD, CVM и DUMPS-синдромов, наблюдающихся в голштинской и черно-пестрой породах.

Синдром DUMPS (дефицит уридинмонофосфатсинтетазы) обусловлен точковой мутацией в кодирующей части гена UMPS, локализованного на первой хромосоме (аутосомно-рецессивная мутация, 1-я группа сцепления, локус 2391) и проявляется дефицитом фермента уридинмонофосфатсинтетазы, который связан с воспроизводительной функцией животных и влияет на выживаемость потомства [1]. Проявляется у гомозиготных животных, вызывая гибель эмбрионов, как правило, после первых 40 дней развития [2], однако в ряде случаев у носителей данной мутации отмечается задержка роста [3], и в отдельных случаях – более длительные межотельные периоды.

Мутация зарегистрирована у черно-пестрых голштинов в США и

Европе, а также у животных красно-пестрой голштинской породы в Швейцарии [4].

VLAD-синдром (дефицит лейкоцитарной адгезии или синдром врожденного иммунодефицита) – генетически детерминированное заболевание с характером наследования по рецессивному типу, приводящее к разрушению иммунной системы животных [5, 6]. В гомозиготном рецессивном состоянии является летальным. Обусловлено точковой мутацией в кодирующей части аутосомного гена CD18, расположенного на первой хромосоме КРС и контролирующего синтез гликопротеина  $\beta$ -интегрин – поверхностного белка мембраны нейтрофилов, играющего ключевую роль в миграции лейкоцитов к очагу воспаления. Повреждение структуры этого белка приводит к множественным дефектам функции лейкоцитов, миграция которых к месту проникновения патогенов оказывается заблокированной, что исключает эти клетки из процесса уничтожения инфекции [7].

Комплексный порок позвоночника (CVM) является наследственным летальным заболеванием телят, которое ассоциировано с геном SLC35A3 (бычьего растворимого переносчика семейства 35) [8, 9]. Ген, обуславливающий комплексный порок позвоночника и расположенный на третьей хромосоме, кодирует белок, регулирующий транспорт нуклеотид-связанных сахаров. Способ наследования CVM – аутосомально рецессивный. Характерными признаками телят-носителей CVM являются общая недоразвитость, укороченная шея, слившиеся и деформированные позвонки, сколиоз, пороки ребер. Одним из симптомов является также деформация суставов передних и задних конечностей. К действию этого рецессивного гена относятся, кроме того, пороки сердца [10].

В этой связи проведение в республике генетического мониторинга наследственных мутаций крупного рогатого скота является актуальной проблемой, решение которой позволит вести целенаправленный контроль за их распространением, повысить резистентность племенного поголовья республики и сохранность ремонтного молодняка, исключить завоз быков-носителей генетического груза и обеспечить ввод в племенные стада здоровых животных.

Такая работа может оказаться актуальной и для исследований по картированию в геноме КРС локусов количественных признаков, так как, например, выявлено, что локусы генов CD18 (синдрома врожденного иммунодефицита) и UMPS сцеплены и расположены на первой хромосоме, на которой располагаются и гены, ассоциированные с признаками молочной продуктивности.

**Материал и методика исследований.** Исследования были выполнены в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП

«Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Объектом исследований являлись быки-производители шести госплемпредприятий республики, ремонтные бычки РУСХП «Оршанское племпредприятие», высокопродуктивные коровы ГУСП «Племзавод «Муховец» и племзавод «Дружба» Брестской, РУСП «Племенной завод «Красная Звезда» и РДУП по племенному делу «ЖодиноАгроПлемЭлита» Минской, ЧУП «Новый двор» Гродненской областей. Предмет исследований – биопробы ткани и спермы крупного рогатого скота.

Геномную ДНК выделяли перхлоратным методом. Все основные растворы для выделения ДНК, амплификации и рестрикции готовили по Маниатису и др. [11].

Концентрация, нативность, подвижность ДНК, концентрация и специфичность амплификата, а также результаты расщепления продуктов ПЦР оценивались электрофоретическим методом с последующей визуализацией на трансиллюминаторе в УФ-свете с длиной волны 260 нм. Для анализа распределения рестрикционных фрагментов ДНК использовали компьютерную видеосистему INFINITY (Франция).

В качестве маркера использовали ДНК плазмиды pBR322, расщепленной рестриктазой AluI, либо рестриктазой Bsuri.

Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы ОДО «Прайм-тех» (г. Минск).

В процессе работы были разработаны оптимизированные условия проведения ПЦР-ПДРФ для диагностики мутаций.

**Результаты эксперимента и их обсуждение.** В результате исследований были разработаны условия для эффективного проведения ПЦР-ПДРФ для диагностики мутация DUMPS.

Выявлено, что данная мутация приводит к утрате сайта рестрикции эндонуклеазой AvaI, что позволяет дифференцировать мутантные и нормальные аллели данного гена и типировать гетерозиготы.

Для идентификации данной мутации была подобрана следующая пара праймеров, каждый из которых комплементарен одному из 3'-концов антипараллельных цепей целевого участка ДНК:

AVA1: 5'- gCA AAT ggC TgA AgA ACA TCC Tg - 3'

AVA2: 5'- gCT TCT AAC TgA ACT CCT CgA gT- 3'

Проведена оценка различных вариантов компонентов реакционной смеси для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для определения условий, необходимых для нормального протекания ПЦР-ПДРФ, был осуществлен подбор оптимальных концентрационных и температурно-кинетических параметров реакции.

Для успешного проведения ПЦР для идентификации мутации

DUMPS был подобран оптимальный температурно-временной режим амплификации: начальная денатурация – 95 °С 10 мин; 45 циклов (денатурация – 95 °С 30 с; отжиг – 58 °С 30 с; синтез – 72 °С 1 мин); элонгация – 72 °С 30 мин, 4 °С.

Рассчитанная ориентировочная температура плавления составила 68 °С для каждого из праймеров. Это дало возможность более точно оптимизировать температуру их отжига ( $t_{отж}$ ) и позволило получить амплификат достаточной концентрации и высокой специфичности: один фрагмент длиной 108 п.н., идентифицируемый электрофоретическим методом в 2%-ном агарозном геле (рисунок 1).

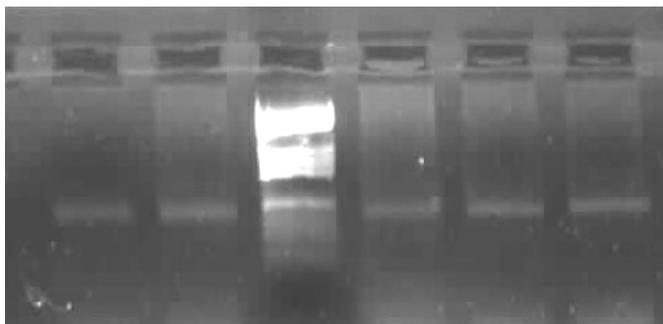


Рисунок 1 – Амплифицированные фрагменты ДНК, полученные с использованием праймеров AVA1 и AVAII. Дорожки 1,2,4,5,6 – амплификат, дорожка 3 – маркер

Таким образом, установлено, что синтезированные праймеры при подборе оптимальных концентрационных, температурных и кинетических параметров амплификации обладают достаточной степенью специфичности для использования их при ПЦР-анализе, направленном на идентификацию мутации в гене UMPS. Эффективность метода при этом составила 95 %.

В случае успешной амплификации оставшуюся смесь подвергали инкубации с использованием эндонуклеазы *AvaI* при температуре 37 °С в течение 4-12 часов.

Точковая мутация цитозина → тимин, приводящая к утрате сайта рестрикции данной эндонуклеазой, изменяет и картину распределения фрагментов на геле после рестрикции. Это позволяет проводить дифференцирование нормальных ( $DUMPS^{TD}$ ) и мутантных ( $DUMPS^{DP}$ ) аллелей и типировать гетерозиготы.

Выявлено, что для успешной идентификации результата рестрикции фрагмента гена UMPS необходим агарозный гель достаточно высокой концентрации – 4 % (рисунок 2). При этом генотип  $DUMPS^{TD/TD}$

(животных, свободных от мутации) представлен тремя фрагментами размером 51 п.о., 36 п.о. и 21 п.о.; гетерозиготный генотип DUMPS<sup>TD/DP</sup> (у животных-носителей мутации) дает следующую картину: четыре фрагмента размером 87 п.о., 51 п.о., 36 п.о. и 21 п.о.; рецессивный генотип DUMPS<sup>DP/DP</sup> идентифицируется как два фрагмента – 87 и 21 п.о.

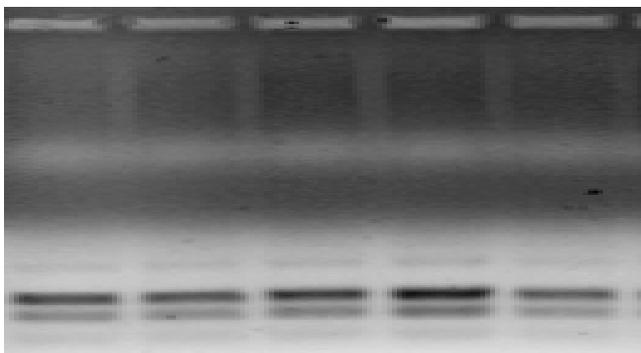


Рисунок 2 – Рестрикция амплификатов (дорожки 1-5), полученных после обработки эндонуклеазой *AvaI*

Таким образом, идентификация мутации DUMPS, проводимая на основе анализа ПЦР-ПДРФ с помощью подобранных специфических праймеров и рестриктазы, является наиболее надежным методом, позволяющим безошибочно определять мутантный аллель в гомо- или гетерозиготной форме.

Полученные результаты будут использованы в дальнейшем для разработки метода диагностики наследственной мутации DUMPS и проведения анализа ее распространения в отечественной популяции крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы.

С использованием рассчитанных и синтезированных праймеров проведена отработка метода по определению полиморфизма гена SLC35A3, мутация в котором приводит к синдрому сложной деформации позвоночника.

Начальным этапом было получение с помощью сконструированных прямых праймеров F(wild), F(cvm) и R (SLC) ПЦР фрагментов гена SLC35A3, содержащих искусственные рестрикционные сайты.

Для рестриктазы *PstI* на дикий тип включался рестрикционный сайт: 5`...CTGCA↓G...3` и 3`...G↑ACGTC...5`. Для рестриктазы *EcoT22I* (Mph1103I (NsiI)) на мутацию в гене SLC35A3 – сайт: 5`...ATGCA↓T...3` и 3`...T↑ACGTA...5`. Разработанные праймеры для определения мутации в гене SLC35A3 были использованы для

проведения ПЦР и получения амплифицированных фрагментов.

Вторым этапом стала разработка оптимальных параметров ПЦР-диагностики мутации SVM, основанной на использовании метода определения единичного полиморфизма PCR-PIRA (PCR-primer introduced restriction analysis) с использованием специфических праймеров.

Были подобраны условия амплификации: концентрация праймеров,  $MgCl_2$  (1,5-5 мМ) и геномной ДНК, температура отжига (при градиентах 55-63 °С).

Проведены исследования по влиянию различных буферов (Tornado F, Tornado B, Tornado S, Buffer HiFi, Buffer Master Mix) и полимераз (Taq-полимераза, полимеразы Tornado, Taq-полимераза HiFi) на эффективность амплификации.

Наиболее эффективными явились буфер Tornado F и Tornado полимеразы. Оптимальная  $t_{отж}$  составила 56 °С, концентрация  $MgCl_2$  – 3 мМ.

Амплификацию проводили в 15 мкл реакционной смеси (рисунок 3).



Рисунок 3 – Амплификат (дорожки 3-5, дорожка 1 – маркер)

Полученный ПЦР-продукт (около 233 п.о.) подвергался рестрикции с использованием рестриктаз Pst I на дикий тип и EcoT22 I на мутацию SVM. Смесь инкубировали в течение 2 час при 37 °С.

Анализ рестрикционных фрагментов проводили при помощи электрофореза в 3%-ном агарозном геле, приготовленном на TAE-буфере.

Присутствие мутации в гене определялось по наличию двух рестрикционных фрагментов 233 п.о. и 212 п.о. – у гетерозиготных носителей мутации, одного фрагмента (212 п.о.) при использовании рестриктазы Pst I для образца дикого типа и рестриктазы EcoT22 I для гомозиготного мутантного генотипа.

В ходе исследований было проведено опытное тестирование крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой и симментальской пород, а также красной белорусской породной группы (таблица 1).

Таблица 1 – Частота встречаемости генотипов локуса гена SLC35A3

Порода или породная группа	Количество голов	Частота встречаемости генотипов, %		
		GG	GT	TT
Черно-пестрая	30	80	20	-
Красная белорусская	20	100	-	-
Симментальская	30	100	-	-

Установлено, что все проанализированные образцы ДНК симментальской породы (в количестве 30 голов) и красной белорусской породной группы крупного рогатого скота (в количестве 20 голов) обладали генотипом дикого типа (GG) по гену SLC35A3.

Генотипирование образцов белорусской черно-пестрой породы (30 голов) позволило выявить животных, несущих мутантный гетерозиготный аллель GT, то есть носителей заболевания CVM. Из 30 протестированных голов 6 особей (или 20 %) являлись носителями заболевания, остальные животные обладали генотипом дикого типа (GG). Полученные результаты согласуются с данными зарубежных исследований. В ходе исследований не было идентифицировано ни одного генотипа, гомозиготного по мутации CVM.

Разработан и внедрен в производство метод диагностики наследственного синдрома иммунодефицита крупного рогатого скота (BLAD-синдром). Проведено ДНК-тестирование племенных животных белорусской черно-пестрой породы в количестве 3618 голов. Носительство мутации установлено в среднем у 1,6 % быков-производителей, 1,3 % ремонтных бычков и 2,0 % высокопродуктивных коров.

В ходе работы были оптимизированы режимы проведения ПЦР-ПДРФ (рисунок 4).

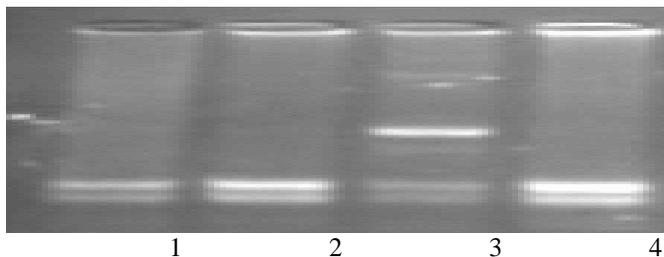


Рисунок 4 – Рестрикция амплификатов (№ 1-4), полученных после обработки эндонуклеазой TaqI

Выявлено наличие BLAD-синдрома в линиях быков как голландского, так и голштинского корней (рисунок 5). Не установлено досто-

верного влияния мутации на показатели воспроизводительной способности, качества спермопродукции и относительной племенной ценности быков-производителей.

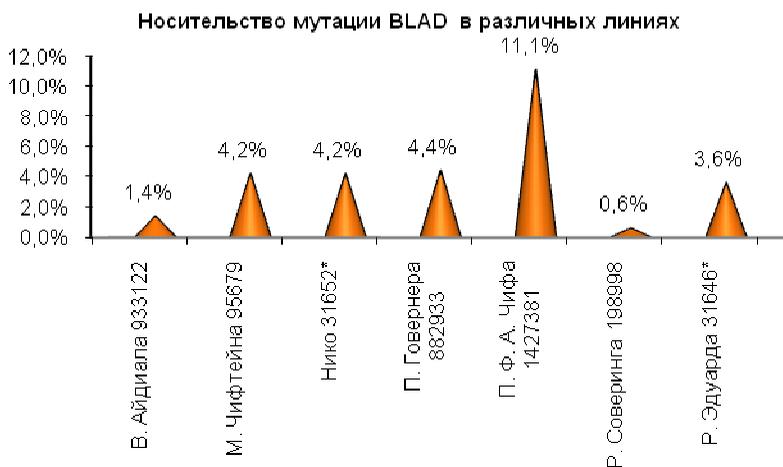


Рисунок 5 – Носительство мутации BLAD в различных линиях быков-производителей

Проведены исследования влияния носительства мутации BLAD на молочную продуктивность племенных коров. Установлено, что наличие в генотипе коров BLAD-синдрома не приводит к достоверному повышению показателей молочной продуктивности и, следовательно, выбраковка животных-носителей синдрома иммунодефицита не будет оказывать отрицательного влияния на показатели продуктивности в среднем по стаду. В то же время, использование таких коров в качестве быкопроизводящих может привести к дальнейшему распространению мутации среди племенного поголовья республики.

Изучение динамики показателей роста, развития и естественной резистентности ремонтных бычков в различные возрастные периоды (6, 12 и 18 месяцев) в зависимости от наличия в их генотипе мутации по гену BLAD. Определены морфологические, биохимические и гуморальные факторы защиты организма ремонтных бычков. Не подтверждено наличие достоверной связи между носительством мутации и показателями роста и развития, а также показателями содержания белков сыворотки крови, бактерицидной, лизоцимной и бета-лизинной ак-

тивности.

Выявлены пути дальнейшего распространения мутации в республике – не только через быков-носителей синдрома, но и через быков-производящих коров, имеющих мутантный аллель в своем генотипе. Продолжающееся распространение заболевания связано с тем, что гетерозиготные животные фенотипически не отличаются от здоровых, поэтому селекция по фенотипу не приводит к желаемым результатам: выбраковке носителей мутации. К тому же отсутствие до последнего времени генетического контроля за данной мутацией создало предпосылки для ее наследования среди животных племенных стад. Использование таких коров в качестве быкопроизводящих приведет к дальнейшему распространению мутации.

Проведена производственная проверка метода ДНК-диагностики иммунодефицита, подтвердившая эффективность его применения на практике.

Таким образом, результаты исследований показали необходимость контроля за наличием и распространением наследственных мутаций в популяции белорусской черно-пестрой породы крупного рогатого скота. Селекция на устранение рецессивных мутаций на уровне фенотипа является неэффективной в связи с низкой частотой гомозигот по отношению к гетерозиготам. Наиболее надежным способом их выявления к настоящему времени является метод ПЦР-ПДРФ, позволяющий отличить мутантный аллель от нормального и идентифицировать больных, здоровых животных и гетерозиготных носителей мутации. В таком случае отпадает необходимость сложной и дорогой генетической экспертизы по потомству. Метод выявления мутаций на геномном уровне позволяет при рецессивном наследовании генетических аномалий проводить весьма эффективную селекцию, ведущую к элиминации нежелательных аллелей и оздоровлению генофонда.

Введение принципа тестирования молодых бычков предотвратит последствия проявления мутаций в возрасте 6-7 лет, необходимых для оценки и квалификации производителей.

**Заключение.** Разработаны условия эффективного проведения генодиагностики мутации DUMPS крупного рогатого скота.

1. Разработаны оптимальные параметры проведения ПЦР-диагностики наследственного заболевания SVM. Проведено выборочное генотипирование крупного рогатого скота различных пород по гену SLC35A3. Выявлено наличие мутации SVM в популяции белорусской черно-пестрой породы (до 20 %).

2. Разработан и внедрен в производство метод диагностики наследственного синдрома иммунодефицита (BLAD-синдрома) крупного рогатого скота.

3. Разработанные методы диагностики наследственных мутаций крупного рогатого скота являются быстрым, надежным и эффективным средством для установления полного контроля над мутациями и соответствуют уровню разработок стран СНГ и отличаются высокой эффективностью применения в племенном и товарном скотоводстве республики для повышения резистентности животных.

#### Литература

1. Жигачев, А. И. Проблема контроля скрытых генетических дефектов у крупного рогатого скота / А. И. Жигачев // Достижения в генетике, селекции и воспроизводстве сельскохозяйственных животных : материалы Междунар. науч. конф. – СПб, 2009. – С. 123-128
2. Čítek, J. Recessive disorders - a serious health hazard? / J. Čítek, B. Bláhová // *Journal of Applied Biomedicine*. – 2004. – Vol. 2. – P. 187, 194
3. Dadania przesiewowe ne obecność genu wczesnej abumieralności rorodkon DUMPS u bydła w Polsce / C. Grzybowski [et al.] // *Med. Weter.* – 1998. – Vol. 54, № 3. – P. 189-193
4. Schwenger, B. DUMPS cattle carry a point mutation in the wridine monophosphate synthase gene / B. Schwenger, S. Schober, D. Simon // *Genomics* – 1993. – Vol. 16. – P. 1626-1631
5. Скрининг гена дефицита лейкоцитарной адгезии у черно-пестрого голштинизированного скота / Н. С. Марзанов [и др.] // *Сельскохозяйственная биология*. – 2003. - № 6. – С. 23-29
6. Czarnik, U. Hodowlane I genetyczno-populacyjne aspekty występowania BLAD (Bovine Leu kocyte Adhesion Deficiency) u bydła rasy czarno-białej / U. Czarnik ; Uniwersytet Warmińsko-Mazurskiego. – Olsztyn, 2000. – 46 p.
7. Molecular definition of the bovine granulocytopeny syndrome: identification of deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein / V. E. Kehrlí [et al.] // *Am. J. Vet. Res.* – 1990. – Vol. 51, № 11. – P. 1826-1936
8. Complex vertebral malformation in Holstein calves / J. S. Agerholm [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2001. – Vol. 13. – P. 283-289
9. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP- N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation / B. Thomsen [et al.] // *Genome Res.* – 2006. – Vol. 16. – P. 97-105
10. Malher, X. Effects of sire and dam genotype for complex vertebral malformation (CVM) on risk of return-to-service in Holstein dairy cows and heifers / X. Malher, F. Beaudeau, J. M. Philipot // *Theriogenology*. – 2006. – Vol. 65. – P. 1215-25.

(поступила 7.02.2012 г.)