

СКРИНИНГ НА НОСИТЕЛЬСТВО МУТАЦИЙ, ДЕТЕРМИНИРУЮЩИХ РАЗВИТИЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЛЕМЕННОГО КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ

Бейшова И. С. – к.с/х.н., доцент кафедры биологии и химии Костанайского государственного университета им. А.Байтұрсынова

Чужебаева Г. Д. – к.в.н., и.о. доцента кафедры ветеринарной санитарии Костанайского государственного университета им. А. Байтұрсынова

Усенбеков Е. С. – к.б.н., заведующий кафедры клинической ветеринарной медицины Казахского национального аграрного университета.

Ковальчук А. М. – магистр ветеринарных наук, преподаватель кафедры ветеринарной санитарии Костанайского государственного университета им. А. Байтұрсынова

Ульянов В. А. - магистр ветеринарных наук, преподаватель кафедры ветеринарной санитарии Костанайского государственного университета им. А. Байтұрсынова

Широкий обмен генетическим материалом между странами сопровождается распространением различных инфекционных заболеваний, а также заболеваний, вызываемых редкими мутациями, возникающими у выдающихся представителей коммерческих пород. В отдельных случаях наблюдается высокая скорость распространения таких мутаций. Огромный экономический ущерб обуславливается необходимостью строгого генетического контроля импортируемого генетического материала, а также изучение возможных механизмов распространения мутаций [1,2, 3].

К таким наследственным заболеваниям у крупного рогатого скота относятся BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) и CVM (Complex Vertebral Malformation).

В статье предоставлен материал по диагностике генетических мутаций BLAD и CVM методом ПЦР в формате Real-time племенного скота отечественной селекции аулиекольской и казахской белоголовой породы. Данная методика позволяет выявить выше указанные мутации на ранних сроках и в результате выбраковки животных с генетическими заболеваниями (BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) и CVM (Complex Vertebral Malformation) снижается эмбриональная смертность у маточного поголовья, сокращается количество скрытых абортосов у коров, повышается индекс осеменения.

Ключевые слова: BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency), CVM (Complex Vertebral Malformation), генетический груз, точечная мутация.

ОТАНДЫҚ СЕЛЕКЦИЯНЫҢ АСЫЛ ТҰҚЫМДЫ ІРІ ҚАРА МАЛДАРЫНЫҢ ТҰҚЫМ ҚУАЛАЙТЫН АУРУЛАРЫН ТУҒЫЗАТЫН ТАСЫМАЛДАУШЫ МУТАЦИЯЛАР СКРИНИНГІ

Бейшова И. С. – а.ш.ғ.к., А. Байтұрсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті биология және химия кафедрасының доценті.

Чужебаева Г. Д. – в.ғ.к., А. Байтұрсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университетінің м.а., ветеринариялық санитария кафедрасының доценті

Үсенбеков Е.С. – б.ғ.к., Қазақ ұлттық аграрлық университеті клиникалық Ветеринарлық медицина кафедрасының меңгерушісі

Ковальчук А. М. – ветеринария ғылымының магистрі, А. Байтұрсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті ветеринариялық санитария кафедрасының оқытушысы

Ульянов В. А. - ветеринария ғылымының магистрі, А. Байтұрсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті ветеринариялық санитария кафедрасының оқытушысы

Елдер арасында генетикалық материалдармен кеңінен алмасу әртүрлі инфекциялық аурулардың, сонымен қатар коммерциялық мақсаттағы мал тұқымдарының ерекше өкілдері арасында туындауы мүмкін сирек кездесетін мутацияларды тудыратын аурулардың өршігуімен ілесуі мүмкін. Жекелеген жағдайларда осындай мутациялардың жоғары жылдамдықпен таралатындығы байқалады. Орасан зор экономикалық залал импортталатын генетикалық материалды қатаң генетикалық бақылаудың қажеттілігімен, сондай-ақ мутациялардың таралуының ықтимал механизмдерін зерттеудің қажеттілігімен шартталады [1,2, 3].

Ірі қара малдардың осындай тұқым қуалайтын ауруларына BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) и CVM (Complex Vertebral Malformation) жатады.

Мақалада Әулікөл және ақ бас қазақ мал тұқымдарының отандық селекцияланған асыл тұқымды малдарды Real-time пішімінде ПТР тәсілімен BLAD және CVM генетикалық мутацияларын диагностикалау бойынша материал ұсынылды. Бұл әдістеме жоғарыда аталған мутацияларды

ерте кезеңде анықтауға мүмкіндік береді және генетикалық ауруларға (BLAD және CVM) шалдыққан малдардың жарамсызын шығару нәтижесінде төлдейтін малдардың эмбрионалдық өлім-жітімі төмендейді, сиырлардың жасырын түсіктерінің саны азаяды, ұрықтандыру индексі ұлғаяды.

Түйінді сөздер: BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency), CVM (Complex Vertebral Malformation), генетикалық жүк, нүктелік мутация.

CARRIER SCREENING MUTATIONS THAT DETERMINE THE DEVELOPMENT OF HEREDITARY DISEASES BREEDING CATTLE DOMESTIC BREEDING

Beysheva I. S. – candidate of agricultural sciences, associate professor of biology and chemistry department of Kostanai state university named after A. Baitursynov

Chuzhebaeva G. D. - candidate of veterinarian sciences, associate professor of veterinarian sanitation department of Kostanai state university named after A. Baitursynov

Usenbekov E. S. – candidate of biological sciences, head of department of clinical veterinary medicine Kazakh National Agrarian University.

Kovalchuk A. M. - master of veterinary sciences, lecturer, and department of veterinary sanitation of Kostanai state university named after A. Baitursynov.

Ulyanov V. A. - master of veterinary sciences, lecturer, and department of veterinary sanitation of Kostanai state university named after A. Baitursynov.

The wide exchange of genetic material between two countries is accompanied by the spread of various infectious diseases, and diseases caused by rare mutations arising from outstanding representatives of commercial breeds. In some cases, there is a high rate of proliferation of such mutations. The enormous economic damage is caused by the necessity of a strict genetic control of imported genetic material, as well as explore possible mechanisms of mutations expansion [1, 2, 3].

Such hereditary diseases in cattle are BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) and CVM (Complex Vertebral Malformation).

The article presents data on the diagnosis of genetic mutations BLAD and CVM by PCR in Real-time format in pedigree cattle of domestic breeding of auliekol and Kazakh white breed. This technique allows identifying the above mutations at the early stages, and as a result culling animals with genetic diseases (BLAD and CVM), decreasing embryonic mortality in breeding stock, reducing the number of hidden abortions in cows, increasing insemination index.

Keywords: BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency), CVM (Complex Vertebral Malformation), genetic load, point mutation.

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, у животных все чаще проявляются признаки генетической эрозии - накопление 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. По сведениям OMIА–каталога (online mendelian inheritance in animals) у крупного рогатого скота выявлено 462 генетически обусловленных морфологических и функциональных нарушений [4, 5, 6].

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 и выведения их новых типов [7].

В последнее время сложилась следующая ситуация: при использовании быков-производителей для «улучшения» популяций скота в их генофонд одновременно с интродукцией полезных были введены рецессивные мутации, обуславливающие дефицит адгезии лейкоцитов (BLAD-синдром), комплексное уродство позвоночника (CVM-синдром), DUMPS и BC [8, 9].

Дефицит уридинмонофосфатсинтетазы (DUMPS) зарегистрирован у черно-пестрых голштинов в США и Европе, а также у животных красно-пестрой голштинской породы в Швейцарии. Многие из перечисленных мутаций, представляющих собой характерный генетический груз, вероятно, возникли недавно [10].

В 1983 году обнаружена мутация DUMPS (Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase) или дефицит фермента уридинмонофосфатсинтетазы. Дефицит фермента выявляется в эритроцитах животных. Дефект DUMPS проявляется в рецессивной форме. При осеменении гетерозиготным быком гетерозиготных по DUMPS коров 25% эмбрионов гибнут на ранних стадиях развития. Поэтому в первую очередь осуществляют контроль быков-производителей по данному метаболическому дефекту [11].

В Республике Казахстан проблема скрининга племенной продукции, в частности замороженной спермы быков-производителей отечественной и зарубежной селекции, племенных быков остается актуальным вопросом. Генетические дефекты в виде DUMPS, CVM сопровождаются абортными у коров, мертворожденностью телят, различными уродствами, низкой воспроизводительной функцией у коров [12, 13].

Своевременное выявление носителей данной мутации позволит избежать скрещивания двух гетерозиготных особей или, наоборот, использовать при разведении под контролем в случае их высокой репродуктивности. Чтобы не допустить дальнейшего неконтролируемого распространения мутаций, необходимо, наряду с тестированием быков-производителей, проводить тестирование популяций быков-производителей, коров и ремонтного молодняка. Выявление в популяциях скрытых генетических дефектов (мутаций), снижающих племенные качества животных, позволит решить проблему повышения резистентности племенного поголовья и сохранения молодняка. Поэтому актуальным является выявление и исключение животных-носителей генетически обусловленного BLAD-синдрома и оздоровление селекционно-племенного поголовья республики [14].

В связи с выше изложенным, изучение распространенности генетических дефектов в популяциях племенного поголовья республики имеет практическое и теоретическое значение. Анализ отечественной литературы показывает, что работа по выявлению генетических мутаций у животных не проводится. В настоящее время завоз племенных животных и замороженной спермы в племенные хозяйства страны проводится практически неконтролируемо [7].

В большинстве развитых стран Европы и Америки созданы специальные программы по снижению частоты встречаемости аллеля BLAD-синдрома в популяциях скота черно-пестрой породы. Выдающихся быков и ремонтный молодняк проверяют на носительство мутантного гена, а результаты регулярно публикуют в каталогах по племенным быкам.

В мае 2010 года ученые впервые сообщили о распространенности у скота новой аутосомальной рецессивной мутации *Brachyspina*, и сейчас во многих странах проводится мониторинг племенных животных методами молекулярной генетики на носительство этого дефекта [13].

По сравнению с классической ПЦР, наиболее точной является методика так называемой *real-time* ПЦР, т.е. ПЦР в реальном времени. Её отличительным свойством является подсчёт количества амплифицированных ДНК по мере их накопления после каждого амплификационного цикла, а не в конце постановки. При этом используются две методики регистрации результатов: при помощи флуоресцентных «красок», которые напрямую взаимодействуют с двуцепочечной ДНК и обеспечивают её свечение, и модифицированных ДНК-олигонуклеотидных проб. Последние содержат специфические последовательности ДНК, комплементарные уникальным генам исследуемого патогена, а также флуорофор и «гаситель» (*quencher*), присоединённые к молекуле-носителю, называемой *reporter* («переносчик»). Флуорофор отсоединяется от «гасителя» и обеспечивает феномен свечения только после гибридизации специфических олигонуклеотидных последовательностей с комплементарной исследуемой ДНК.

Анализ специальной литературы показывает, что сейчас учеными разрабатываются кроме метода классической полимеразной цепной реакции в сочетании с ПДРФ и метод *real-time* ПЦР диагностики для детекции точечной мутации. Так, в 2012 году данный метод диагностики использовался китайскими учеными для выявления мутации BLAD и CVM у быков-производителей.

Таким образом, в настоящее время только использование современных молекулярно-генетических методов оценки генотипа племенных животных позволяет повысить продуктивность животных. В связи с этим, перед нами поставлены две задачи: изучить распространенность летальных аллелей генетической мутации у крупного рогатого скота, и разработка REAL-Time PCR SNP диагностики наследственных болезней DUMPS, CVM, BLAD, *citrullinemia*. Разработка и внедрение в производство REAL-Time PCR SNP диагностики в сочетании с аллель-специфической полимеразной цепной реакцией позволяет ускорить диагностику и оздоровить племенные хозяйства от носителей мутации.

Исследования проводились на 300 племенных животных ТОО «Жанабек» Костанайской области (казахская белоголовая порода) и на 300 животных ТОО «Каркын» Костанайской области (аулиекольская порода) в «Биотехнологической научно-образовательной лаборатории» инновационного научно-образовательного центра при КГУ им. А. Байтурсынова. В качестве материала для исследования была использована кровь, взятая в стерильные вакуумные пробирки из выше указанных хозяйств, с содержанием K2EDTA.

Предмет исследования – диагностика точечных мутаций BLAD, CVM.

Материал исследования – образцы ДНК, выделенной из крови казахской белоголовой и аулиекольской пород.

Методика ДНК-типирования животных включает следующие операции:

- отбор и подготовка проб для анализа (осуществляется работниками хозяйства, предоставляющего образцы;
- выделение ДНК из исследуемых образцов.

Геномную ДНК выделяли из крови коров, используя набор DiatomTMPrep200 (Лаборатория Изоген, Москва), согласно инструкции фирмы изготовителя и «Pure Link Genomic DNA Kits», также согласно инструкции прилагаемой к набору.

Для диагностики носительство мутаций BLAD и CVM с помощью Real-Time PCR SNPs использовали набор TaqMan® MGB probes, FAM™ and VIC® dye-labeled, предоставленной компанией Applied Biosystems. В состав данного набора входят следующие компоненты: TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X), 40X Assay Mix. Нами, для проведения Real-Time PCR диагностики заказаны у компании Applied Biosystems следующие компоненты: праймер для секвенирования Sequence Detection Primer 80.0 nmol, фермент Taq DNA Polymerase Recombinant 500 U, набор для генотипирования, TaqMan Genotyping Master Mix, Mini Pack, праймеры для Реал Тайм ПЦР диагностики CVM, (CUSTTQMN SNP ASSAYS NON-HUMAN), праймеры для Реал-Тайм ПЦР диагностики BLAD, (CUST TQMN SNP ASSAYS NON-HUMAN).

Как показывает анализ литературы, Real-Time PCR SNP диагностики часто используется в медицине для выявления точечной диагностики генетических дефектов. Детекция точечной мутации методом Real-Time PCR SNPs (single nucleotide polymorphisms SNPs) у крупного рогатого скота.

Согласно общепринятому определению SNPs (от англ. Single Nucleotide Polymorphism) - это однонуклеотидные позиции в геномной ДНК, для которых в популяции имеются различные варианты последовательностей (аллели) с частотой редкого аллеля не менее 1%. Основным достоинством SNPs является возможность использования автоматических методов их детекции, например, Real - Time PCR SNPs.

Для выявления точечной мутации, BLAD, при скринировании известных SNP, в каждом случае нужны только те олигонуклеотиды, которые соответствуют известным аллельным вариантам. Такие аллель-специфические наборы олигонуклеотиды будут использоваться для кодирующей части гена CD18 у крупного рогатого скота в положениях 383 A/G, для Real -Time PCR SNPs диагностики CVM точечная G/T мутация гена SLC35A3 в позиции 559, при дефиците уридиномонофосфатсинтетазы точечная мутация локализована C/T в кодоне 405 экзона 5 (таблица 1).

Real-Time PCR SNPs диагностика скрытых генетических дефектов, BLAD, CVM проводилась на приборе Американского производства Quant Studio 5 Real-Time PCR System.

Таблица 1 - Генетические дефекты у крупного рогатого скота и их характеристика

Основные параметры	Название генетического дефекта	
	BLAD	CVM
Название гена	CD 18	SLC35A3
Локализация гена	Хромосома 1	Хромосома 3
Размер гена	37 901 п.н.	58582 п.н.
Замена нуклеотида wild type/mutant type	в позиции 383 A - G	в позиции 559 G - T
Здоровые гомозиготные	A/A	G/ G
Гетерозиготные носители	A/G	G/T
Гомозиготные носители	G/G	T/T

В первую очередь, перед выделением ДНК прогревали лизирующий раствор и раствор для отмывки из набора «Pure Link Genomic DNA Kits» в течение 1 часа при температуре 65°C. Затем, внесли в пробирку 100 мкл подготовленную с меркаптоэтанолом смесь и тщательно перемешивали на вортексе и прогревали 5 минут при температуре 65 °С. Центрифугировали 5 секунд при 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 5000 об/мин в течение 30 секунд. Удаляли надосадочную жидкость, затем вносили по 300 мкл раствора для отмывки.

Перемешивали на вортексе, осаждали сорбент центрифугированием, удаляли надосадочную жидкость. Вносили 500 мкл раствора для отмывки, перемешивали на вортексе, центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость. Повторяли процедуру отмывки с использованием раствора для отмывки. Подсушивали сорбент универсальный после удаления надосадочной жидкости в термостате при 65°C в течение 5-10 минут. В пробирки вносили по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешивали на вортексе, инкубировали в термостате при 65°C в течение 5 минут с периодическим встряхиванием. Центрифугировали пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги в течение 1 минуты. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК, которую в последующем использовали для полимеразной цепной реакции. Концентрацию полученной ДНК проверяли на Qubit® 3.0 Fluorometer.

Приготовление праймеров рабочей концентрации. Праймеры для проведения ПЦР были синтезированы Американской компанией Applied Biosystems и были предоставлены в лиофилизированной форме в количестве 80 nmol. В пробирку Эппендорфа, где находится синтезированные праймеры в количестве 80 nmoI добавили 800 мкл ТЕ буфера, после встряхнули несколько секунд для растворения праймера. Затем приготовили аликвоты объемом 50 мкл, одну из них разбавили ТЕ буфером в четыре раза (т.е к 50 мкл добавили 150 мкл ТЕ буфера). Рабочая концентрация праймеров составила 25 мкМ. Аликвоты праймеров, концентрацией 100 мкМ рекомендуется хранить при -20⁰С. Хранение готовых праймеров рабочей концентрации допускается при температуре +4⁰С в течение месяца.

Приобретение dNTP смеси для амплификации. Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты A,G,C и T были приобретены в компании Thermo Scientific в виде 100 mM раствора в количестве 1,0 мл. Первую очередь перемешиваем все четыре dNTP и получается концентрация каждого праймера 25 mM. Затем нужно сделать аликвоты по 50 мкл 25 mM dNTP и хранить их в замороженном виде. Для амплификации нужного фрагмента ДНК по изучаемым локусам использовали амплификатор производства Германии Эппендорф.

В нашей работе для Real-Time PCR SNPs диагностики точечной мутации CVM мы использовали праймеры для Реал-Тайм ПЦР, имеющие следующую последовательность: F-5'-AGCTGGCACAATTTGTAGGT -3' и R -5'-CTCAAAGTAAACCCAGCAAAGC-3' и меченые F – VIC - 5'-TCATGGCAGTTCTCA – 3' и R – FAM - 5'-TCATGGCATTCTCA-3'.

Для Real-Time PCR SNPs диагностики точечной мутации BLAD использовали праймеры для Реал-Тайм ПЦР, имеющие следующую последовательность: F-5'-CAGTTGCGTTCAATGTGACCTT -3' R-5'-GAGTAGGAGAGGTCCATCAGGTA-3' и меченые F – VIC - 5'-CCCCATCGACCTGTAC – 3' и R – FAM - 5'- CCCATCGGCCTGTAC-3'.

Праймеры для генотипирования и меченые зонды VIC, FAM праймеры были синтезированы – компанией Applied Biosystems (США). В первую очередь нормализовали концентрацию образцов ДНК путем разбавления ТЕ буфером до конечной концентрации 20-40 нг/мкл.

Компоненты Real-Time PCR:

1. TaqMan Genotyping Master Mix (40 × набор для генотипирования) – 12,5 мкл
2. Прямые и обратные праймеры - 0,625 мкл
3. ДНК – 1,0 мкл
4. H₂O - бидистиллированная – 10,8 мкл.

Real-Time PCR диагностику BLAD проводили с помощью амплификатора Real Time StepOnePlus, объемом реакционной смеси 50 мкл. Условия проведения ПЦР показаны на рисунке 1. В пробирку Эппендорфа набираем компоненты реакционной смеси, имеющий состав: TaqMan Genotyping Master Mix, праймеры и бидистиллированная вода. Затем смесь перемешиваем на вортексе и переносим реакционную смесь в стрипы и добавляем ДНК с концентрацией 20-40 нг/мкл. Во избежание загрязнения стрипов работаем в латексной перчатке.

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 (Рисунок 2).

В то время, как графики амплификации в режиме реального времени исследовались на наличие BLAD, слабый неспецифический сигнал наблюдался в аллели wild-type (Рисунок 3). Данный эффект также был выявлен в результате проведения и предыдущих исследований. Вероятно, это происходит в связи с тем, что аллельспецифический зонд имеет одно ошибочное связывание пары оснований с другой аллелью; 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 wild-type и mutant-type, потому что интенсивность неспецифического сигнала намного ниже по сравнению с отметкой цели.

На рисунке 2 начиная с 20-22 цикла по 32 наблюдается тенденция увеличения сигнала в результате накопления продуктов амплификации, у гетеризиготных животных обе кривые почти параллельные. Как видно из рисунка 1 у гомозиготных здоровых животных 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 wild-type аллели гена CD 18), если животное является гетерозиготным носителем получаем изображение с параллельными кривыми.



Рисунок 1 - Графическое изображение проведения Real-time PCR SNPs диагностики точечной мутации

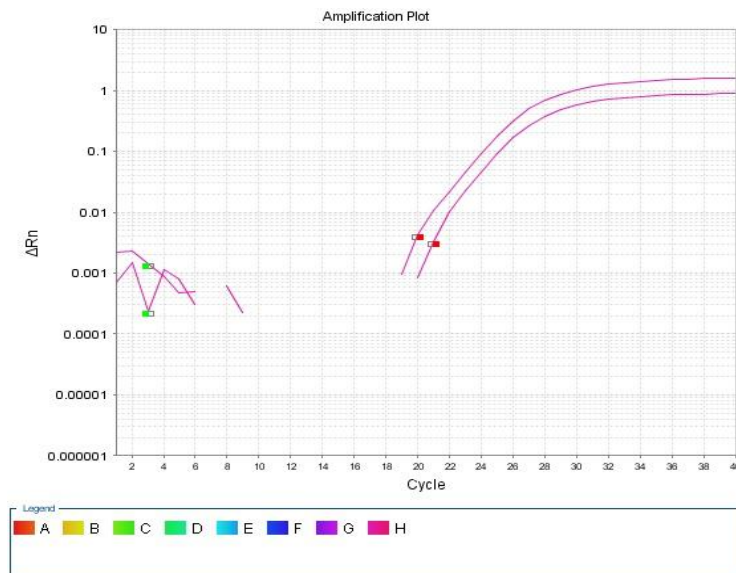


Рисунок 2 - Графическое изображение результатов Real-time PCR SNPs диагностики точечной мутации гена CD 18 (BLAD), (амплификация с FAM зондом, mutant PCR primers, и с VIC зондом, wild-type primers)

Real-Time PCR диагностику CVM проводили с помощью амплификатора QuantStudio 5 Real-TimePCRSytem, объемом реакционной смеси 50 мкл. Условия проведения ПЦР показаны на рисунке 4. В пробирку Эппендорфа набирается компоненты реакционной смеси, имеющий состав: TaqMan Genotyping Master Mix, праймеры и бидистиллированная вода. Затем смесь перемешивается на вортексе и реакционная смесь переносится в стрипы и добавляется ДНК. Во избежание загрязнения стрипов работа производится в латексной перчатке и с помощью держателя герметично закрываем

крышку стрипа.

Необходимо отметить, что использование метода ПЦР-ПДРФ анализа для детекции носителей генетического дефекта SVM является сложным и трудоемким способом, так как нет соответствующей рестриктазы для выявления точечной мутации. Обычно для детекции носителей SVM 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). Поэтому, нами был выбран метод Real-time PCR SNPs диагностики для детекции носителей генетического дефекта SVM. Метод Real-time PCR SNPs диагностики позволяет в течение двух часов точно определить здоровых гомозиготных животных и гетерозиготных носителей мутации (рисунок 4, 5). У гетерозиготных носителей мутации идет амплификация с двумя зондами VIC и FAM и соответственно образуются две кривые.

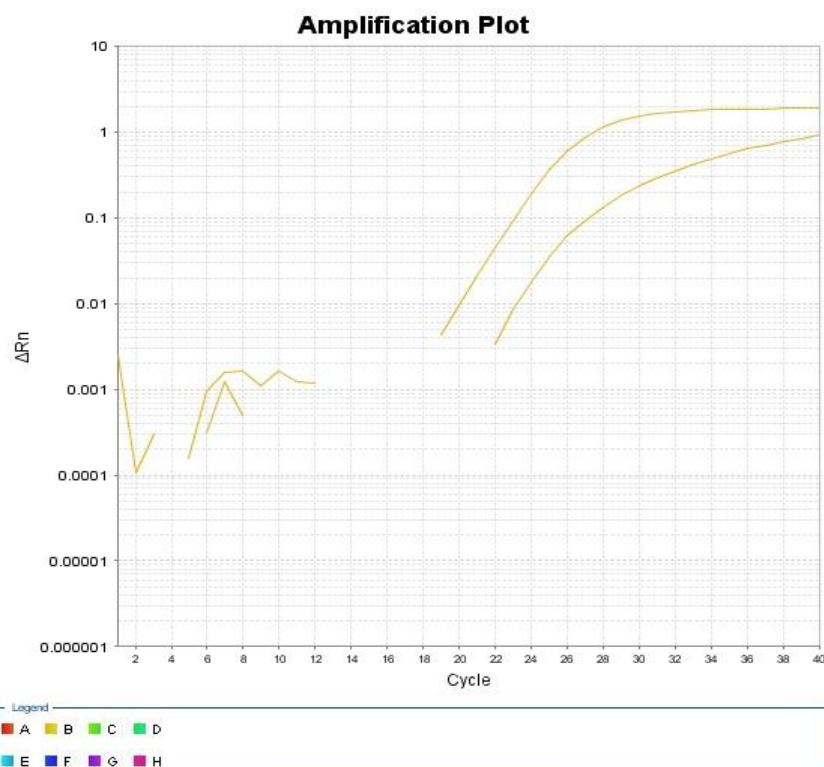


Рисунок 3 - Результаты Real-time PCR диагностики, гомозиготное здоровое животное по локусу BLAD

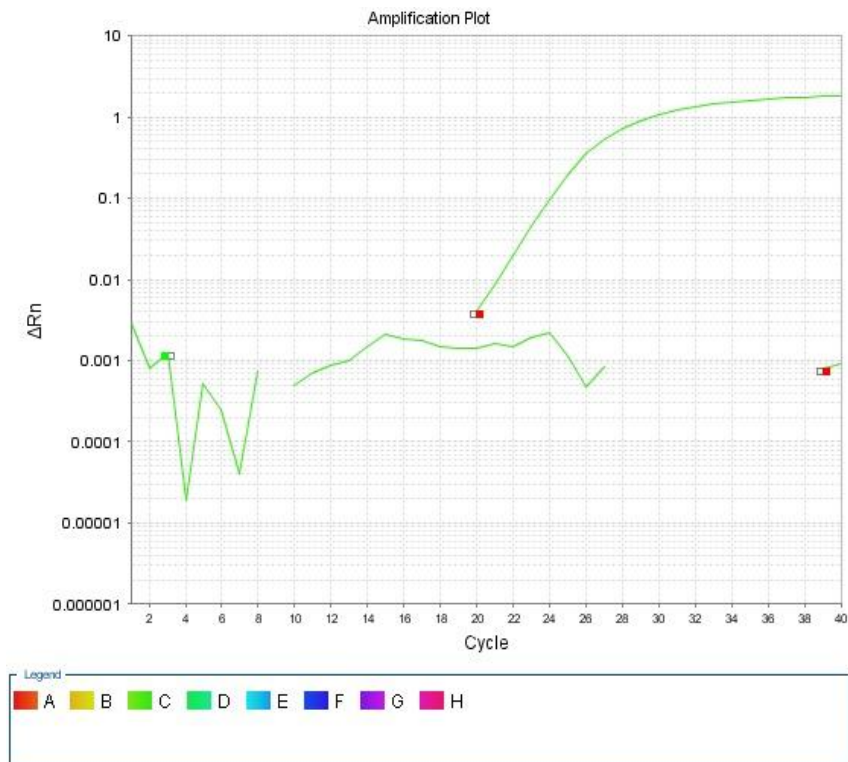


Рисунок 4 - Результаты Real-time PCR диагностики, гомозиготное здоровое животное по локусу CVM (амплификация с VIC зондом, wild-type)

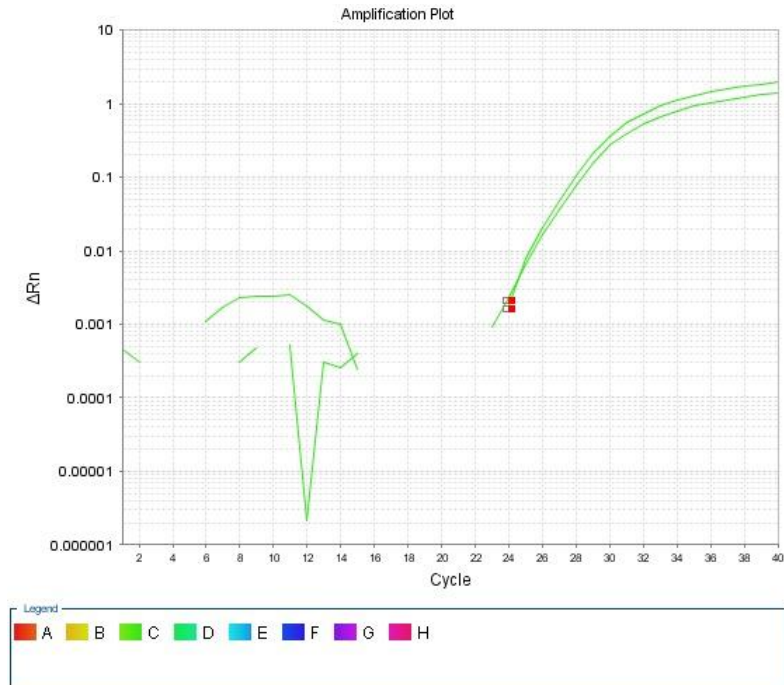


Рисунок 5 - Графическое изображение результатов Real-time PCR SNPs диагностики точечной мутации и гена SLC35A3, гетерозиготный носитель CVM (амплификация с FAM зондом, mutant-type и с VIC зондом, wild-type)

В результате проведения скрининга на носительство мутаций CVM и BLAD отечественных пород (аулиекольская и казахская белоголовая) нами не было выявлено отклонений по выше упомянутым генетическим заболеваниям.

Литература:

1. Валиуллина, Э.Ф. Генотипирование чёрно-пёстрого скота по локусам каппа-казеина, бета-лактоглобулина и BLAD-мутации методами ДНК-технологии: автореф. дисс. канд. биол. наук: 06.02.01 / Валиуллина, Э.Ф. – Казань, 2012. – 22 с.
2. Глазко, В.И. Введение в ДНК-технологии / В.И. Глазко, И.М. Дунин, Г.В. Глазко, Л.А. Калашникова // М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2001. – 436 с.
3. Мариуца, А.Е. Популяційно-генетичні механізми адаптації і розповсюдження напівлетальних рецесивних мутацій на прикладі BLAD у великої рогатої худоби: автореф. дис... канд. с.-г. наук: 03.00.15 / Мариуца Алла Ергашівна. – Київ, 2005. – 22 с.
4. Глазко В.И., Белопухов С.Л. Нанотехнологии и наноматериалы в сельском хозяйстве. /Под ред. акад. РАСХН В.М. Баутина. – М: Изд-во РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. - 2008. –4228 с.
5. Feder M. E., Mitchell-Olds T. Evolutionary and ecological functional genomics//Nat. Rev. Genet. – 2003. – Vol.4. – P. 651–657
6. Hammami H, Rekik B, Bastin C et al. Environmental sensitivity for milk yield in Luxembourg and Tunisian Holsteins by herd management level // J. Dairy Sci. - 2009. - Vol. 92. № 9. - P. 4604–4612;
7. Hammami H, Rekik B, Soyeurt H et al. Accessing genotype by environment interaction using within - and a cross-country test-day random regression sire models // J. Anim. Breed. Genet. - 2009. - Vol. 126. № 5. - P. 366–377.
8. Hammami H, Rekik B, Soyeurt H et al. Genotype x environment interaction for milk yield in Holsteins using Luxembourg and Tunisian populations // J. Dairy Sci.. - 2008. - Vol. 91. № 9. - P. 3661–3671
9. Hayes B. J., Bowman P. J., Chamberlain A. J. et al. A Validated Genome Wide Association Study to Breed Cattle Adapted to an Environment Altered by Climate Change//PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, Issue 8. – P. e6676
10. Lemay D. G., Lynn D. J., Martin W. F. et al. The bovine lactation genome: insights into the evolution of mammalian milk // Genome Biology - 2009. - Vol. 10. Is. 4. - Article R43
11. Luikart G., England P. R., Tallmon D. et al. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing// Nat. Rev.Genet. – 2003. – Vol.4. – P. 981–994
12. Manel S., Schwartz M. K., Luikart G et al. 2003 Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics//Trends Ecol. Evol. – 2003. – Vol. 18. – P. 189–197
13. Medugorac I., Medugorac A., Russ I. et al. Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size//Molecular Ecology. – 2009. - Vol. 18. – P. 3394–3410
14. Жигачев А.И., Эрнст Л.К., Богачев А.С. О накоплении груза мутаций в породах крупного рогатого скота при интенсивных технологиях воспроизводства и улучшения по целевым признакам// Сельскохозяйственная биология, 2008, № 6, С. 25-32.

References:

1. Valiullina, EF Genotyping of black-motley cattle of loci kappa-casein, beta-lactoglobulin and BLAD-mutation by DNA technology: Author. diss. cand. biol. Sciences: 06.02.01 / Valiullina, EF - Kazan, 2012. - 22 p.
2. Glazko , VI Introduction DNA technology / VI Glazko, IM Dunin, GV Glazko, LA Kalashnikov // M .: FGNU "Rosinformagroteh", 2001. - 436 p.
3. Mariutsa, AE Populyatsiyno-genetichni mehanizmi adaptatsii i rozpovsyudzhennya napivletalnih retsesivnih mutatsiy on prikladi BLAD have velikoï roгатоï thinness: Author. dis ... cand. s.-g. Sciences: 03.00.15 / Mariutsa Alla Ergashivna. - Kiev, 2005. - 22 p.
4. Glazko VI, Belopukhov SL Nanotechnology and nanomaterials in agriculture. / Ed. Acad. RAAS VM Bautina. - M: Publishing house RGAU named KA-ICCA Timiryazev. - From 2008. -4228.
5. Feder ME, Mitchell-Olds T. Evolutionary and ecological functional genomics // Nat. Rev. Genet. - 2003. - Vol.4. - P. 651-657
6. Hammami H, Rekik B, Bastin C et al. Environmental sensitivity for milk yield in Luxembourg and Tunisian Holsteins by herd management level // J. Dairy Sci. - 2009. - Vol. 92. № 9. - P. 4604-4612;
7. Hammami H, Rekik B, Soyeurt H et al. Accessing genotype by environment interaction using within - and a cross-country test-day random regression sire models // J. Anim. Breed. Genet. - 2009. - Vol. 126. № 5. - P. 366-377.
8. Hammami H, Rekik B, Soyeurt H et al. Genotype x environment interaction for milk yield in Holsteins using Luxembourg and Tunisian populations // J. Dairy Sci .. - 2008. - Vol. 91. № 9. - P. 3661-3671
9. Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ et al. A Validated Genome Wide Association Study to Breed Cattle Adapted to an Environment Altered by Climate Change // PLoS ONE. - 2009. - Vol. 4, Issue 8. - P. e6676

10. Lemay D. G., Lynn D. J., Martin W. F. et al. The bovine lactation genome: insights into the evolution of mammalian milk // *Genome Biology* - 2009. - Vol. 10. Is. 4. - Article R43
11. Luikart G., England P. R., Tallmon D. et al. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing // *Nat. Rev. Genet.* - 2003. - Vol. 4. - P. 981-994
12. Manel S., Schwartz M. K., Luikart G et al. 2003 Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics // *Trends Ecol. Evol.* - 2003. - Vol. 18. - P. 189-197
13. Medugorac I., Medugorac A., Russ I. et al. Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size // *Molecular Ecology*. - 2009. - Vol. 18. - P. 3394-3410
14. Zhigachev AI, Ernst LK, Bogachev AS On the accumulation of mutations in the cargo breeds of cattle under intensive technologies of reproduction and improvement of target features // *Agricultural Biology*, 2008, № 6, С. 25-32.

Сведения об авторах

Бейшова Индира Салтановна, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент Костанайского Государственного университета им. А. Байтұрсынова. Тел.: 8-707-453-38-27, e-mail: indira_bei@mail.ru

Чужебаева Гульжан Джамбуловна, кандидат ветеринарных наук, доцент Костанайского Государственного университета им. А. Байтұрсынова. Тел.: 8-747-229-67-58, e-mail: gulzhandoc@mail.ru

Усенбеков Есенгали Серикович – кандидат биологических наук, заведующий кафедры клинической ветеринарной медицины Казахского национального аграрного университета. e-mail: usen03@yandex.ru

Ковальчук Александр Михайлович, магистр ветеринарных наук, преподаватель Костанайского Государственного университета им. А. Байтұрсынова. Тел.: 8-775-435-95-15, e-mail: kovaskst@gmail.com

Ульянов Вадим Александрович, магистр ветеринарных наук, преподаватель Костанайского Государственного университета им. А. Байтұрсынова. Тел.: 8-777-412-55-65, e-mail: vadimkst@mail.ru

Бейшова И. С. – а.ш.ғ.к., А. Байтұрсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті биология және химия кафедрасының доценті. Тел.: 8-707-453-38-27, e-mail: indira_bei@mail.ru

Чужебаева Г. Д. – в.ғ.к., А. Байтұрсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университетінің м.а., ветеринариялық санитария кафедрасының доценті. Тел.: 8-747-229-67-58, e-mail: gulzhandoc@mail.ru

Ұсенбеков Е.С. – б.ғ.к., Қазақ ұлттық аграрлық университеті клиникалық Ветеринарлық медицина кафедрасының меңгерушісі, e-mail: usen03@yandex.ru

Ковальчук А. М. – ветеринария ғылымының магистрі, А. Байтұрсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті ветеринариялық санитария кафедрасының оқытушысы. Тел.: 8-775-435-95-15, e-mail: kovaskst@gmail.com

Ульянов В. А. - ветеринария ғылымының магистрі, А. Байтұрсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университетінің ветеринариялық санитария кафедрасының оқытушысы. Тел.: 8-777-412-55-65, e-mail: vadimkst@mail.ru

Beyshova I.S. – candidate in agricultural sciences, dotsent of biology and chemistry of Kostanai state university named after A. Baitursynov. Тел.: 8-707-453-38-27, e-mail: indira_bei@mail.ru

Chuzhebaeva G.D. - candidate of veterinary sciences, acting associate professor of veterinary sanitation of Kostanai state university named after A. Baitursynov. Тел.: 8-747-229-67-58, e-mail: gulzhandoc@mail.ru

Usenbekov E. S. – candidate of biological sciences, head of department of clinical veterinary medicine Kazakh National Agrarian University. e-mail: usen03@yandex.ru

Kovalchuk A.M. - master of veterinary sciences, lecturer, and department of veterinary sanitation of Kostanai state university named after A. Baitursynov. Тел.: 8-775-435-95-15, e-mail: kovaskst@gmail.com

Ulyanov V.A. - master of veterinary sciences, lecturer, and department of veterinary sanitation of Kostanai state university named after A. Baitursynov. Тел.: 8-777-412-55-65, e-mail: vadimkst@mail.ru