

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА ARACHNOMELIA У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

А.А. Тургумбеков¹, Г.С. Шманов², Ж.У. Муслимова¹, Е.С. Усенбеков¹

¹НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»,
Алматы, Республика Казахстан

²ТОО «Asyl Farms», Северо-Казахстанская область, Казахстан
e-mail: aset_turgumbekov83@mail.ru

Аннотация. В статье приводятся результаты генотипирования образцов ДНК ангусской, герефордской пород на генетический дефект, синдром ARACHNOMELIA. ДНК тестирование образцов ДНК по 120 образцов каждой породы проведено методом ПЦР-ПДРФ анализа, эффективность которого составила 100%. У обеих исследуемых пород выявлены гетерозиготные носители двухнуклеотидной делеции del [CA] в кодирующей части гена MOCS1, однако распространенность вредной делеции была низкой и составила 4,1% и 2,5%, у ангусской и герефордской пород, соответственно.

Ключевые слова: синдром ARACHNOMELIA, ген MOCS1, ПЦР-ПДРФ анализ, точечная мутация, гетерозиготные носители, крупный рогатый скот.

EFFECTIVENESS OF MOLECULAR GENETIC METHOD FOR DIAGNOSTICS OF ARACHNOMELIA SYNDROME IN CATTLE

A.A. Turgumbekov¹, G.S. Shmanov², Zh.U. Muslimova¹, Y.S. Ussenbekov¹

¹NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty,
Republic of Kazakhstan

²«Asyl Farms» LLP, North Kazakhstan region, Asyl Farms LLP, North
Kazakhstan region, Kazakhstan
e-mail: aset_turgumbekov83@mail.ru

Abstract. The article presents the results of genotyping DNA samples of Angus and Hereford breeds for the genetic defect, ARACHNOMELIA syndrome. DNA testing of DNA samples of 120 samples of each breed was carried out using the PCR-RFLP analysis method, the efficiency of which was 100%. In both breeds studied, heterozygous carriers of the double nucleotide deletion del [CA] in the coding part of the MOCS1 gene were identified, but the prevalence of the deleterious deletion was low and amounted to 4.1% and 2.5%, in the Angus and Hereford breeds, respectively.

Keywords: ARACHNOMELIA syndrome, MOCS1 gene, PCR-RFLP analysis, point mutation, heterozygous carriers, cattle.

Введение. В настоящее время идентификация животных, которые являются носителями определенного расстройства, по-прежнему основывается на традиционных методах, такие как анализ родословной или визуальная оценка. Интенсивная селекция, которая используется в мясном скотоводстве сопровождается снижением воспроизводства, изменением эффективности и качества мясного производства. Эта ситуация порождает экономические потери, которые трудно компенсировать. Нарушения скелета, такие как синдактилия, арахномелия, остеопороз, часто приводят к снижению продуктивности животных [1].

Синдром арахномелии (АС), встречающийся преимущественно у крупного рогатого скота бурой швицкой и симментальской пород, является врожденным летальным генетическим заболеванием. По результатам исследования у симментальского скота делеционная мутация длиной 2 п.н. с.1224_1225delCA в 11 экзоне гена MOCS1 является причиной синдрома – АС [2].

Синдром арахномелии (Arachnomelia syndrome, AS) является аутосомно-рецессивным наследственным заболеванием у крупного рогатого скота, больные телята обычно мертворожденные и сопровождаются сложными аномалиями. Таким образом, идентификация животных-носителей на основе генетических тестов имеет важное значение для контроля и устранения данного дефекта. По результатам ДНК тестирования крупного рогатого скота Китайской популяции 15 голов симментальской породы, 12 голов местной породы Sanhe оказались гетерозиготными носителями AS. Учеными для регулярного генетического скрининга мутаций AS в генах MOSC1 и SUOX крупного рогатого скота были разработаны тест системы, однако по локусу гена SUOX у исследуемой популяции не были выявлены гетерозиготные носители [3].

Целью исследования была оптимизация существующего ПЦР-ПДРФ способа диагностики носителей синдрома Arachnomelia и проведение генетического скрининга популяции крупного рогатого скота ангусской, герефордской пород, разводимых в Республике Казахстан.

Материалы и методы исследования. В качестве материала для исследования были использованы замороженные образцы крови крупного рогатого скота герефордской, абердин ангусской пород племенного хозяйства, расположенного в Балхашском районе Алматинской области, по 120 образцов каждой породы. Кровь для экстракции ДНК взяли из яремной, в отдельных случаях из хвостовой вены в объеме 2 мл в вакуумные пробирки с ЭДТА. Выделение геномной ДНК из замороженной крови проводилось в лаборатории «Зеленой биотехнологии и клеточной инженерии» Казахстанско-Японского инновационного центра Казахского национального аграрного исследовательского университета двумя способами: классическим фенольным методом и с помощью коммерческого набора PureLink™ Genomic DNA Mini Kit согласно инструкции производителя.

Детекция носителей генетического дефекта Arachnomelia syndrome (AS, ген MOCS1) у крупного рогатого скота абердин ангусской, герефордской пород проводилась с помощью праймеров: F-5'-ATGAAGGGACAGAGTGGTCGT-3' и R-5'-CGTGGGTCAGTTGGTCAGAGT-3', в результате амплификации образуется фрагмент размером 629 п.н., после рестрикции эндонуклеазой Dra III с сайтом узнавания CACNNN↓GTG образуются фрагменты у гомозиготных здоровых животных два фрагмента, (wt/wt type), 412 п.н. и 217 п.н. у гетерозиготных носителей синдрома три бэнда 629 п.н., 412 п.н. и 217 п.н. [4].

Результаты исследования. На первом этапе работы была анализирована последовательность гена MOCS1 и была идентифицирована генетическая природа возникновения генетического дефекта Arachnomelia syndrome, который возник в результате двухнуклеотидной делеции в составе гена MOCS1 5'-TTTCAGGTTCTGAGA[CA]CAGAGTGAGTTTCT del [CA]. Исходя из этиологии генетического дефекта, была разработана методология детекции носителей мутации с помощью молекулярно-генетических методов исследования.

Оптимальные параметры проведения полимеразной цепной реакции были: температура первоначальной денатурации 94⁰С - 5 мин, температура денатурации 94⁰С – 20 сек, температура отжига праймеров - 60⁰С 30 сек, элонгация при 72⁰С в течение 30 сек, завершающий синтез при 72⁰С в течение 7 мин, количество циклов 30. В результате амплификации получен ПЦР продукт гена MOCS1 длиной 629 п.н., для распознавания гетерозиготных носителей мутации синдрома Arachnomelia syndrome использована рестриктаза Dra III, с сайтом узнавания -CACNNN↓GTG. Гидролиз амплификата рестриктазой Dra III позволяет определить генотип исследуемого животного, у гомозиготных здоровых особей вследствие наличия сайта рестрикции для эндонуклеазы Dra III образуются два фрагмента – 412 п.н. и 217 п.н., у гетерозиготных носителей мутации на электрофореграмме обнаруживаются три фрагмента – 629 п.н., 412 п.н. и 217 п.н. По результатам генетического мониторинга у ангусской породы (n=120) встречаемость синдрома Arachnomelia syndrome составила 4,1%, у герефордской породы (n=120) была низкой и составила 2,5%.

Выводы. Проведена адаптация условий амплификации фрагмента гена MOCS1 и оптимизирован состав реакционной смеси, в результате получены хорошего качества электрофореграммы амплификата исследуемого гена и после рестрикции амплификата эндонуклеазой Dra III. Использование одной пары праймеров и рестриктазы Dra III позволяет идентифицировать гетерозиготных носителей, по нашим данным точность данного метода составляет 100%. Результаты генетического скрининга показывают, что у исследуемой группы животных встречаются гетерозиготные носители двухнуклеотидной делеции del [CA] с частотой 4,1% и 2,5%, у ангусской и герефордской пород, соответственно.

Финансирование. Данная работа была выполнена в рамках реализации проекта МНиВО РК «Мониторинг племенных животных мясного направления

продуктивности на носительство скрытых генетических аномалии», ИРН AP15473095.

Литература

1. Identification of the bovine Arachnomelia mutation by massively parallel sequencing implicates sulfite oxidase (SUOX) in bone development / C. Drogemuller, J. Tetens, S. Sigurdsson, A. Gentile, S. Testoni, K. Lindblad-Toh, T. Leeb // PLoS Genet 2010. – Vol. 6. – e1001079.
2. McClure, M. Genetic Disease and Trait Information for IDB / M. McClure, J. McClure // Genotyped Animals in Ireland. – 2016. – 43 p.
3. Identification of the Causative Gene for Simmental Arachnomelia Syndrome Using a Network-Based Disease Gene Prioritization Approach / Jiao Shihui, Chu Qin, Wang Yachun, Xie Zhenquan, Hou Shiyu, Liu Airong, Wu Hongjun, Liu Lin, Geng Fanjun, Wang Congyong, Qin Chunhua, Tan Rui, Huang Xixia, Tan Shixin, Wu Meng, Xu Xianzhou, Liu Xuan, Yu Ying, Yuan Zhang // PLOS ONE. – 2013. – May. – – Vol. 8. – Iss. 5. – e64468.
4. Establishment of the detection method for two causative genes of cattle Arachnomelia Syndrome / Chu Qin, Shi-Hui Jiao, Wang Ya-Chun, Liu Lin, Liu Ai-Rong, Wu Hong-Jun, Xie Zhen-Quan, Hou Shi-Yu, Geng Fan-Jun, Wang Cong-Yong, Huang Xi-Xia, Tan Shi-Xin, Tan Rui, Zhang Yi, Yu Ying, Zhang Yuan // Hereditas (Beijing). – 2013. – Vol. 5, Iss. 35(5). – pp. 623–627.