

ДИАГНОСТИКА НОСИТЕЛЕЙ ГАПЛОТИПА ФЕРТИЛЬНОСТИ HH2 У КОРОВ ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ

А.Б. Багдат, Д.Б. Зиябек, Ж.У. Муслимова, Е.С. Усенбеков

*НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»,
Алматы, Казахстан
e-mail: aika8989@bk.ru*

Аннотация. Авторами статьи был использован метод Tetra-Primer ARMS-PCR реакции для выявления гетерозиготных носителей гаплотипа фертильности HH2 у коров голштинской породы зарубежной селекции. Всего протестированы 150 образцов ДНК, из них оказались гетерозиготными носителями однонуклеотидной делеции 8 особей, частота вредной мутации составила 5,4%. Установлено, что обнаружение фрагментов ДНК на электрофореграмме размерами 281 п.н., 184 п.н. и 145 п.н., указывает, что животное является гетерозиготным носителем гаплотипа фертильности HH2. Следует отметить, что для контроля распространения вредных мутации необходимо проводить выборочно генетический мониторинг поголовья крупного рогатого скота.

Ключевые слова: гаплотип фертильности HH2, генетический мониторинг, Tetra-Primer ARMS-PCR реакции, программа Primer1, дизайн праймеров, голштинская порода.

DIAGNOSTICS OF CARRIERS OF HH2 FERTILITY HAPLOTYPES IN HOLSTEIN COWS

A.B.Bagdat, D.B.Ziyabek, Zh.U. Muslimova, Y.S. Ussenbekov

*NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty,
Republic of Kazakhstan
e-mail: aika8989@bk.ru*

Abstract. The authors of the article used the Tetra-Primer ARMS-PCR reaction method to identify heterozygous carriers of the HH2 fertility haplotype in Holstein cows of foreign selection. A total of 150 DNA samples were tested, of which 8 individuals turned out to be heterozygous carriers of single-nucleotide deletion; the frequency of the harmful mutation was 5.4%. It has been established that the detection of DNA fragments on an electropherogram with sizes of 281 bp, 184 bp. and 145 bp, indicates that the animal is a heterozygous carrier of the HH2 fertility haplotype. It should be noted that to control the spread of harmful mutations, it is necessary to conduct selective genetic monitoring of the cattle population.

Keywords: *fertility haplotype HH2, genetic monitoring, Tetra-Primer ARMS-PCR reactions, Primer1 program, primer design, Holstein breed.*

Введение. В мире у крупного рогатого скота в настоящее время встречаются 669 наследственных аномалии, из которых более 60 генетических дефектов можно идентифицировать с помощью молекулярно-генетических методов диагностики. Наблюдается тенденция увеличения количества скрытых генетических дефектов, особенно у голштинской, айрширской, джерсейской, бурой швицкой пород, которые часто сопровождаются эмбриональной смертностью, снижением репродуктивной функции коров. По информации Американских ученых известные летальные рецессивные аллели наносят значительный экономический ущерб животноводам и 20 таких дефектов регулярно отслеживаются у 9,4 миллиона голов молочных коров в США. Экономические потери в результате эмбриональной гибели и мертворождений, вызванных этими аллелями обходятся фермерам в США не менее чем в 11 миллионов долларов в год [1].

Первые исследования о изучении генетической природы возникновения генетического дефекта, гаплотипа фертильности HH2 проводились в 2014 году и результаты исследования были малоуспешными, т.е. не удалось точно определить (картирование гена BTA1 до 94 860 836 до 96 553 339, UMD3.1) локализацию и название ответственного гена за эту аномалию [2,3]. Однако, эффекты фертильности для HH2 были в значительной степени подтверждены путем сравнения нормальных показателей зачатия для голштинов (31%) с коэффициентом при скрещивании гетерозиготных самцов с дочерьми гетерозиготных самцов [3].

В настоящее время установлена этиологическая роль сдвига рамки считывания в кодирующей части гена IFT80 на 1 хромосоме 107,172,615 bp (p.Leu381fs) и этот сдвиг сопровождается нарушением передачи сигналов WNT и приводит к гибели гомозиготных эмбрионов. Конкордантный INDEL был расположен на btau1:107,172,615, как было обнаружено, индуцировал сдвиг рамки считывания в 11-м экзоне гена IFT80, который привел к раннему усечению белкового продукта. В 2021 году была предложена учеными Колумбии метод ПЦР-ПДФ анализа для детекции гетерозиготных носителей гаплотипа фертильности HH2 у коров голштинской породы. Для амплификации нужного фрагмента гена IFT80 (11 экзонная часть гена) используются следующая пара праймеров: F-5'- CACTGTTTAGGACTCTGCCT-3'; R-5'- CTCTCTGAGTAATGATACCATAGCA-3' в результате амплификации образуется ПЦР продукт размером 620 п.н. Однако, данный способ не позволяет идентифицировать гетерозиготных носителей, так как не предусмотрены способы детекции мутантного и дикого типов аллелей гена IFT80. В работе учеными доказана роль мутации в составе гена IFT80 в этиологии эмбриональной смертности в условиях *in vitro* культивирования

предимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота голштинской породы [4].

Целью исследования была оптимизация способа диагностики носителей гаплотипа фертильности HH2 у коров голштинской породы с помощью молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы исследования. В экспериментах была использована замороженная периферическая кровь коров голштинской породы в количестве 150 образцов племенного хозяйства №1 Илийского района Алматинской области. Существуют различные способы выделения ДНК из различных тканей животных. Выделение ДНК из образцов крови проводилось с помощью коммерческого набора PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. Используется для выделения ДНК 100 мкл крови, кровь берут из яремной или хвостовой вены в вакуумные пробирки с ЭДТА.

В нашей работе для детекции носителей гаплотипа фертильности гаплотипа фертильности HH2 был использован метод Tetra-Primer ARMS-PCR реакции, в настоящее время известно место локализации точечной мутации, выбор последовательностей прямого и обратного праймеров осуществлен программой Primer 1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>), которая позволяет определить последовательности (внешние и внутренние) прямого и обратного праймеров. Применение внешних праймеров позволяет амплифицировать нужный фрагмент гена. Детекция дикого или мутантного типа аллелей генов основана в амплификации фрагмента гена с помощью внутренних праймеров, последний нуклеотид которых соответствует SNP полиморфизму.

С учетом места локализации однонуклеотидной делеции для Tetra-Primer ARMS-PCR реакции были с помощью программы Primer 1 подобраны последовательности тетрапраймеров. Для генотипирования образцов ДНК по локусу гена IFT80 были использованы следующие праймеры: Forward inner primer (T allele) 5'- CATCTTTATTCTGTATTTTTTTAGGCT -3', Reverse inner primer (A allele): 5'- CCACCATCTACAAGAAGAAGAT -3', F outer (5' - 3'): TTTCAGGTTGTTTTTATATTTTCG -3', R outer (5' - 3'): CAGAGAGACAGTCTGTGCATT-3, размеры ПЦР продуктов соответственно были: Product size for T allele: 145 п.н., Product size for A allele: 184 п.н. и Product size of two outer primers: 281 п.н., температура отжига праймеров была определена с помощью программы Primer 1 и составила 62 °С.

Результаты исследования. ДНК паспортизация образцов ДНК коров голштинской породы зарубежной селекции (n=150) проводилась способом Tetra-Primer ARMS-PCR реакции. Детекция делеции и точечной мутации в кодирующей части соответствующих генов предусматривает в первую очередь определение место локализации SNP полиморфизмов. Нами был проведен анализ последовательности гена IFT80 и установлены место локализации однонуклеотидной делеции del[T] в 11 экзонной части гена IFT80. Длина фрагмента гена IFT80, амплифицированного методом Tetra-Primer ARMS-PCR с помощью внешнего прямого и внешнего обратного праймеров составляет 281

п.н., диагностическое значение имеет амплификация участка гена с помощью внутреннего прямого и обратного праймеров. Обнаружение фрагментов на электрофореграмме длиной 281 п.н., 184 п.н. и 145 п.н. свидетельствует, что животное является гетерозиготным носителем генетического дефекта, гаплотипа фертильности HH2. Из протестированных 150 коров голштинской породы, у 8 особей выявлены мутационные делеции, что составляет 5,4%.

Выводы. Известно, что генетический дефект гаплотип фертильности HH2 у крупного рогатого скота возник в результате однонуклеотидной делеции TTTTAGACA[T]TTTCTTCTTG TAGTTTTAGACATTTTCTTCTTG TAG [T]. Поэтому, нами для диагностики гетерозиготных носителей делеции был использован способ Tetra-Primer ARMS-PCR реакции, так как для детекции делеции рестриктазы не используются. Данный молекулярно-генетический способ является простым, доступным способом диагностики и позволяет исключить применение рестриктазы, что снижает себестоимость диагностических исследований. По данным нашей работы распространенность гетерозиготных носителей гаплотипа фертильности HH2 у коров голштинской породы составила 5,4%.

Финансирование. Данная работа была выполнена в рамках реализации проекта МНиВО РК «Разработка способов диагностики гаплотипов HH2, HH6, JH1, JH5 у крупного рогатого скота и изучение встречаемости летальных аллелей у исследуемой популяции», ИРН AP14972822

Литература

1. Haplotype tests for recessive disorders that affect fertility and other 346 traits / J. B. Cole, P. M. VanRaden, D. J. Null, J. L. Hutchison, S. M. Hubbard // AIP Research Report GENOMIC5, 2021.

2. Bovine exome sequence analysis and targeted SNP genotyping of recessive fertility defects BH1, HH2, and HH3 reveal a putative causative mutation in SMC2 for HH3 / M. C. McClure, D. Bickhart, D. Null, P. Vanraden, L. Xu, G. Wiggans, G. Liu, S. Schroeder, J. Glasscock, J. Armstrong, J. B. Cole, C. P. Van Tassell, T. S. Sonstegard // PLOS One, 2014, Mar 25; 9(3): e92769. – DOI: 10.1371/journal.pone.0092769.

3. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes / P. M. VanRaden, K. M. Olson, D. J. Null, and J. L. Hutchison // J. Dairy Sci, 2011, 94:6153–6161. – DOI: 10.3168/jds.2011-4624.

4.. Truncation of IFT80 causes early 1 embryonic loss in cattle / M. Sofia Ortega, Derek M. Bickhart, Kelsey N. Lockhart1, Daniel J. Null, Jana L. Hutchison, Jennifer C. McClure, John B. Cole. 2022; January 7. – DOI: 10.1101/2021.07.02.450952.