

Е. С. Усенбеков, В. П. Терлецкий, М. Н. Джуланов, А. С. Шамшидин, М. В. Соломадин

## Генетическая природа наследственных болезней крупного рогатого скота и молекулярно-генетические методы их диагностики

**Аннотация.** В данной статье рассматривается роль точечной мутации в этиологии наследственных болезней крупного рогатого скота, авторами для детекции генетических дефектов BLAD, BC, CVM, DUMPS у быков-производителей был использован метод полимеразной цепной реакции и ПДРФ анализа. Проведена аттестация племенных быков АО «Асыл-Тулик» и ТОО «Асыл». Установлено, что племенные быки локальных пород являются свободными от вредных генетических мутаций.

**Ключевые слова:** ПЦР, рестрикция амплификата, электрофорез, летальная аутосомальная рецессивная мутация, BLAD, Citrullinemia, CVM, DUMPS.

*Сведения об авторах:*

**Усенбеков Есенгали Серикович** — кандидат биологических наук, доцент кафедры акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства КазНАУ, e-mail: usen03@mail.ru, моб тел 8-7059160272;

**Терлецкий Валерий Павлович** — доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБНУ ВНИИГРЖ;

**Джуланов Мардан Нурмухамбетович** — доктор ветеринарных наук, заведующий кафедрой акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства;

**Шамшидин Альжан Смайлулы** — кандидат сельскохозяйственных наук, председатель правления АО «РЦПЖ» «Асыл-Тулик»;

**Соломадин Максим Валерьевич** — биолог-инженер ТОО «ZALMA Ltd».

**Введение.** В настоящее время в Республике Казахстан животноводство является ведущей отраслью сельскохозяйственного производства, поставщиком ценных продуктов питания для человека и сырья для промышленности. Вместе с тем все чаще проявляются признаки генетической эрозии — накопления 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. У крупного рогатого скота выявлено 46 генетических дефектов, при которых в настоящее время разработаны молекулярно-генетические методы диагностики [1,2].

BLAD — (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency) дефицит адгезии лейкоцитов, наследственная аутосомальная рецессивная болезнь, обусловленная точечной мутацией в кодирующей части гена CD 18, контролирующего синтез гликопротеида — интегрин, играющего большую роль в регуляторной функции лейкоцитов. Экспрессия  $B_2$  —интегрин

требует межклеточной ассоциации субъединиц CD 11 и C 18, однако точечная мутация в 383 положении гена CD 18 запрещает подобную ассоциацию из-за замены аспарагиновой кислоты на глицин. Был выделен из геномной библиотеки крупного рогатого скота ген, кодирующий CD 18-гликопротеид и определена последовательность этого гена. Установлены две точечные мутации в кодирующей части гена CD 18 у крупного рогатого скота в положениях 383 А-Г, и 775 С-Т. Вторая мутация оказалась молчащей, а первая и является причиной этой аутосомальной рецессивной болезни [3].

CVM — (Complex vertebral malformation), комплексное уродство позвоночника у крупного рогатого скота, как летальная аутосомальная рецессивная наследственная болезнь впервые была описана в 2001 году датским ученым Agerholm J. S. Ген SLC35A3, кодирующий синтез UDP- N-acetylglucosaminetransporter расположен на 3-ей хромосоме, размер гена 58582 пар нуклеотидов. В результате данной мутации произошла замена аминокислоты валина на фенилаланин в составе пептида в позиции 180 [4].

BC (Bovine Citrullinaemia) — это врожденное нарушение обмена веществ из-за дефицита фермента цикла мочевины, аргининсукцинат синтетазы (L-citrulline:L-aspartate ligase). Эта болезнь была впервые описана у людей, но относительно недавно установлена у молочного скота Австралии. Анализ последовательности гена ASS показал, что нуклеотидная замена С на Т является точечной мутацией у крупного рогатого скота. Известно, что у животных носителей мутации Citrullinemia исчезает сайт рестрикции для эндонуклеазы Ava II и этот полиморфизм используется для ПЦР диагностики. Дефицит аргининсукцинатсинтетазы обусловлен наличием гена ASS, локализованного на 11-й хромосоме, в пептидном продукте которого происходит замещение аминокислоты, вследствие чего утрачивается его активность [5].

DUMPS (Deficiency of uridine monophosphate synthase), является смертельным наследственным аутосомно-рецессивным расстройством крупного рогатого скота, которое сопровождается эмбриональной смертностью в период имплантации в начальной стадии стельности у коров. Ген UMP локализован на I (q31-36) хромосоме, имеет длину 65 062 пар оснований, аутосомальная рецессивная болезнь возникла в результате точечной замены нуклеотида G на T кодона 405 экзона 5 гена UMP. У здоровых животных (животные с диким типом аллели) амплифицируемый фрагмент имеет сайт рестрикции для рестриктазы AvaI (CYCGRG), где Y — T или C, а R — A или G нуклеотиды и амплификат режется на три фрагмента, у гетерозиготных животных выявляется четыре фрагмента, а у гомозиготных животных — два фрагмента, так как исчезает сайт рестрикции для рестриктазы AvaI [3].

В настоящее время молекулярно-генетические основы генетических дефектов крупного рогатого

скота достаточно хорошо изучены, на основании этих исследований разработаны методы диагностики наследственных заболеваний. По изучаемым нами локусам, известны места локализации генов, кодирующих синтез соответствующего пептида, параметры генов, где и в какой позиции произошла точечная мутация.

**Цель и задачи.** Целью исследования является изучение распространенности аутосомальных рецессивных летальных мутаций у племенных быков-производителей Республики Казахстан. В связи с вышеизложенным, была поставлена задача поставить технологию ПЦР диагностики и ПДРФ анализа для выявления генетических дефектов у быков-производителей.

**Методы.** Исследования проводились на 67 племенных быках-производителей АО «Асыл-Тулик» и на 43 быках ТОО «Асыл» в учебно-научно-диагностической лаборатории Казахстанско-Японского инновационного центра Казахского национального аграрного университета. В качестве материала для исследования были использованы замороженные образцы спермы быков-производителей. С целью оптимизации и выделения более качественной ДНК из спермы быков-производителей нами был использован способ предварительной обработки спермы следующим образом: вносили в пробирку 200 мкл спермы, затем добавляли 1 мл лизирующего буфера, имеющий состав 100 мМТрис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМNaCl, pH 8,0 и перемешивали в течение 30 секунд, далее центрифугировали при обороте 10000 об/мин в течение 5 минут. После центрифугирования, суспендировали осадок в 500 мкл буфера: 100 мМТрис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМNaCl, pH 8,0 и добавляли 8 мкл 2-меркаптоэтанола. Затем перемешивали на вортексе в течение 1 минуты и оставляли на 30 минут при комнатной температуре. Подготовленную таким способом смесь в количестве 100 мкл

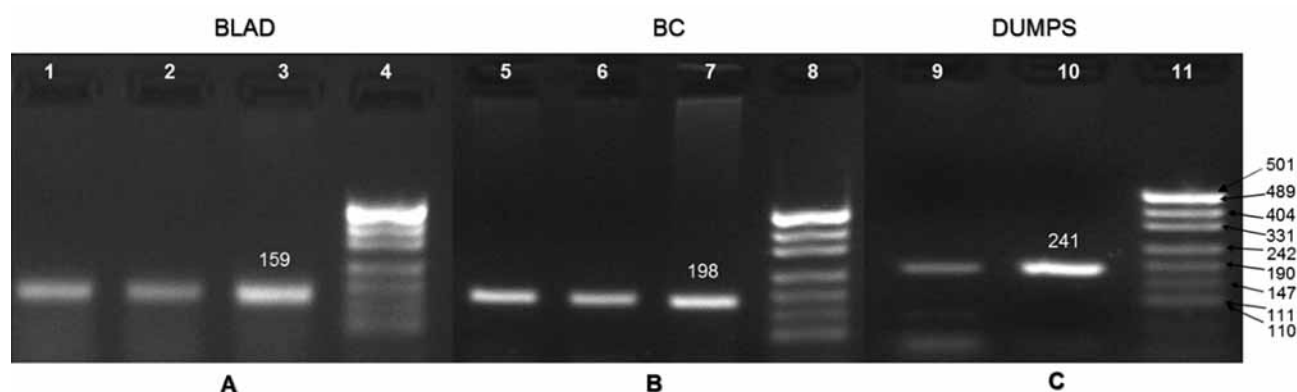


Рис. 1. Электрофореграмма амплификатов BLAD, BC и DUMPS

использовали для выделения ДНК с помощью набора «ДНК сорб-В» согласно инструкции.

Полимеразную цепную реакцию проводили на термоциклере «Терцик». Для выявления полиморфизма гена CD 18 мы использовали следующие праймеры: F 5' — AGGCAGTTGCGTTCAATGTGA-3' и R 5' — CCGACTCGGTGATGCCATTGA-3', гена SLC35A3 аллель специфические праймеры прямые F 5' — CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAG-3' и F 5' — CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAT-3' и обратные R 5' — CGATGAAAAAGGAACCAAAAAGGG-3'.

Для ПЦР анализа по локусам DUMPS, Citrul-linemia кроме существующих праймеров, мы разработали дизайн собственных праймеров. Так, для амплификации участка гена ASS (Citrul-linemia) прямой праймер Usen-1, 5' — AAGGAGTTGTTGGAGGAGTTCAT-3' и обратный праймер Usen-2, 5' — GAGACACATACTTGGCTCCTTC-TC-3'. Использование данного набора праймеров позволяет амплифицировать фрагмент гена ASS длиной 151 п.н. и после рестрикции получаем фрагменты размерами: 58, 93 и 151 п.н.

Зарубежные ученые для детекции точечной мутации DUMPS использовали праймеры: F 5' — GCAAATGGCTGAAGAACATTCTG-3' и R 5' — GCTTCTAACTGAACTCCTGGAGT-3', при этом длина амплификата была 108 п.н., после рестрикции были бэнды 52, 56 и 108 п.н. Нами были разработаны праймеры, F 5' — TGAGTTCAATGTGACATGAGAAAAT-3' и R 5' — ATTACCAATCAATAGGCTTACCTCC-3', позволяющие амплифицировать фрагмент гена UMP размером 241 п.н. (рисунок 1) и после обработки эндонуклеазой Ava I — 83, 158 и 241 п.н. Специфические праймеры были синтезированы лабораторией Applied Biosystems.

Условия проведения полимеразной цепной реакции: первый шаг — 94 °C — 5 минут, второй шаг — денатурация при 94 °C — 45 сек, отжиг праймеров — 62 °C — 45 сек и элонгация при температуре 72 °C 45 сек. Объем реакционной смеси был 50 мкл, и имел следующий состав: 5 мкл 10 X буфера для ПЦР, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мкл 25 мкМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл 0,2 mM концентрации каждого dNTP, 0,5 мкл фермента Taq Polymerase с активностью 5u/μl, 5 мкл ДНК и 26,5 мкл дистиллированной воды.

Для выявления здоровых животных и гетерозиготных носителей продукт амплификации подвергается рестрикции. Горизонтальный электрофорез проводили в 3% агарозном геле: напряжение 180 В, сила тока 150 мА и продолжительность 45–60 минут. Для визуализации результатов электрофореза использовали гель документирующую систему.

**Результаты.** Всего протестированы 110 животных, в том числе 67 голов АО «Асыл-Тулик» и 43 головы ТОО «Асыл». По результатам ПЦР диагностики выявлены один бык-производитель гетерозиготный носитель BLAD синдрома и два быка оказались гетерозиготными носителями CVM. Низкую частоту мутации генетических дефектов по локусам BLAD и CVM и отсутствие носителей точечной мутации генов ASS и UMP у племенных быков-производителей можно объяснить тем, что основная часть исследуемых животных, были местной Алатауской, Аулиекольской, Казахской бело-головой, Аулиеатинской пород, которые в своей родословной не имеют предков, носителей мутации.

**Выводы.** На основании исследования рекомендуем для исключения распространения вредных мутации, BLAD, BC, CVM, DUMPS проводить регулярно мониторинг племенных животных методом ПЦР-ПДРФ анализа.

## Литература

1. Patel R. K. (2010). Autosomal recessive genetic disorders of cattle breeds Worldwide — a Review. Journal of Livestock Biodiversity. Vol.2 n 1. pp 35–41
2. Яковлев А. Ф., Терлецкий В. П., Митрофанова О., Дементьева Н. Определение носителей генетических дефектов среди быков-производителей. Молочное и мясное скотоводство. — 2004. — Т.6. — С. 31–32
3. Rahimi G., Nejati A., Olek K. (2006). Genotyping BLAD DUMPS and k-CSN Loci Holstein Yong Bulls of the National Animal Breeding Center of Iran. Pakistan Journal Biological Sciences 9 (7): pp 1389–1392
4. Agerholm J. S., Bendixen C, Andersen O & Arnbjerg J (2001). Complex vertebral malformation in Holstein calves. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 13: pp283–289
5. Dennis J. A., Healy P. J., Beaudet A. L. & O'Brien W. E. (1989). Molecular definition of bovine agrininosuccinatesynthetase deficiency. Proceeding of the National Academy of Sciences 86: pp. 7947–7951

Ussenbekov Y. S., Terletskiy V. P., Julanov M. N., Shamshidin A. S., Solomadin M. V.

## Genetic nature of hereditary diseases cattle and molecular genetic methods of diagnosis

**Abstract.** *This article discusses the role of a point mutation in the etiology of hereditary diseases of cattle, the authors for the detection of genetic defects BLAD, BC, CVM, DUMPS in tribal sires was used polymerase chain reaction and RFLP analysis. Found that domestic breeding bulls are free from harmful genetic mutations.*

**Keywords:** PCR, restriction amplificate, electrophoresis, lethal autosomal recessive mutation, BLAD, Citrullinemia, CVM, DUMPS.

*Authors:*

**Ussenbekov Y. S.** — candidate of Biological Sciences, assistant professor of obstetrics, surgery and reproduction biotechnology KazNAU, e-mail: usen03@mail.ru, моб тел 8-7059160272;

**Terletskiy V. P.** — Dr. of Biological Sciences, Professor, senior researcher Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding;

**Julanov M. N.** — Dr. of Veterinary Science, Head of the Department of Obstetrics, surgery and biotechnology of reproduction;

**Shamshidin A. S.** — candidate of agricultural sciences, chairman of the Board АО «РЦПЖ» «Асыл-Тулик»;

**Solomadin M. V.** — biologist-engineer ТОО «ZALMA Ltd».