

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БРАХИСПИНАЛЬНОГО СИНДРОМА И ДЕФИЦИТА ХОЛЕСТЕРИНА



Ольга Епишко,
заведующая отраслевой
научно-исследовательской
лабораторией ДНК-технологий
Гродненского государственного
аграрного университета, кандидат
сельскохозяйственных наук, доцент



Елена Юрченко,
начальник научно-
исследовательского отдела
молекулярно-генетических
экспертиз отраслевой научно-
исследовательской лаборатории
ДНК-технологий Гродненского
государственного аграрного
университета, аспирант



Ольга Вертинская,
начальник научного отдела
Гродненского государственного
аграрного университета, кандидат
сельскохозяйственных наук, доцент

УДК 636:2:4.082

Проблема недополучения здорового и жизнеспособного потомства при разведении сельскохозяйственных животных остается актуальной уже не один десяток лет. Интенсивная селекция по желаемым признакам привела к росту инбридинга и, как следствие, к появлению новых рецессивных мутаций в популяции. Их диагностика, а в особенности тех, что ассоциированы с летальными наследственными заболеваниями, играет важную роль в системе генетического мониторинга молочного скота. Генотипирование племенного поголовья позволит своевременно выявить носителей и не допустить дальнейшего бесконтрольного распространения мутации в процессе воспроизводства.

Снижение фертильности пород белголштин отечественной селекции и черно-пестрой связано со многими причинами, в том числе с накоплением в популяции генетических дефектов в гомозиготном состоянии. Интенсивное использование искусственного осеменения быками – скрытыми носителями – привело к накоплению различного рода Lof-мутаций. Четвертая часть потомства от таких родителей погибает еще на эмбриональной стадии развития или рождается с дефектами, не совместимыми с жизнью [8]. Мониторинг поголовья помогает обеспечить генетическую безопасность племенного материала.

В мире среди голштинского скота зарегистрировано 12 гаплотипов фертильности (НН0, НН1, НН2, НН3, НН4, НН5, НН6, НН7, НСD, ННВ, ННС, ННD), ассоциированных с эмбриональной смертностью или гибелью телят в постнатальный период [10]. Особое место в этом ряду занимают НН0 и НСD.

Дефицит холестерина – новый генетический дефект, вызывающий гибель телят в первые недели или месяцы жизни. Он был идентифицирован в немецкой популяции голштинского скота, и впервые данные о нем были представлены на конференции Interbull в июле 2015 г. В январе 2016 г. швейцарской научной группой была идентифицирована мутация (инсерция размером 1,3 kb) в гене аполипопротеина В (АРОВ), ассоциированная с летальным фенотипом. Ее происхождение отследили от известного быка-производителя канадского происхождения CAN000005457798 Mauglin STORM (1991 г.р.).

У гомозиготных носителей мутации нарушается метаболизм холестерина, что приводит к физической слабости, потере веса и аппетита, идиопатической диарее, не поддающейся лечению, обезвоживанию, низкому уровню жирорастворимых витаминов А и Е, гипокалиемии, лейкоцитозу, кахексии, пониженному уровню гемоглобина и, как следствие, к гибели телят в первые недели или месяцы жизни [7]. Гетерозиготные носители НСД имеют низкие показатели холестерина в сыворотке крови, нарушения жирового обмена и, как следствие, значительно отстают в развитии [6]. Было установлено, что гетерозиготные животные имеют пониженное содержание холестерина в крови, в то время как у гомозиготных особей он вообще отсутствует. По данным литературных источников, частота встречаемости скрытых носителей нового гаплотипа дефицита холестерина НСД составляет от 6% до 17% [1]. Тестирование быков голштинской породы на предмет его носительства за рубежом обязательно [9].

Группой ученых установлено, что причина НСД кроется в инсерции мобильного LTR элемента (ERV2-1) размером 1299 bp после позиции 77 958 994 на ВТА 11, расположенного между нуклеотидами 24 и 25 экзона 5 гена АРОВ. Это обуславливает сдвиг рамки считывания, начиная от аминокислоты 135 АРОВ, и приводит к отсечению 97% соответствующего белка длиной 4567 аминокислот (Gly135ValfsX10). АРОВ занимает центральное место в системе аполипопротеинов и является обязательным компонентом липопротеинов низкой плотности и хиломикрон [2]. Ученый Льежского университета (Бельгия) Carole Charlier подтвердил локализацию мутации, при этом указав, что полный размер инсерции эндогенного ретровирусного элемента (BoERV) составляет около 7 kb [3].

Необходимость проведения массового тестирования племенного поголовья голштинского и голштинизированного скота в Беларуси на наличие НСД обусловлена наследованием мутантного аллеля как по отцовской, так и по материнской линии. Исследовать на наличие гаплотипа НСД следует не только производителей, но и быкопроизводящих коров, что позволит снизить вероятность появления рецессивных гомозиготных потомков и избежать экономических потерь [5]. Тестирование быкопроизводителей, быкопроизводящих коров и ремонтного молодняка на предмет носительства гаплотипа НСД в нашей стране предусмотрено на законодательном уровне и является обязательным. При подборе родительских пар необходимо учитывать статус по НСД и тех, и других.

По данным зарубежных авторов, животные – гетерозиготные носители мутации отличаются низкими темпами прироста живой массы, следовательно, позже достигают сроков первого осеменения [6].

Синдром *brachyspina* (BS) – рецессивный генетический дефект молочного голштинского крупного рогатого скота. Его второе название – гаплотип фертильности НН0, ассоциированный с мертворождением. Мутация выявлена в гене FANCI (*Fanconianemicomplementation-group*), локализованном на 21 хромосоме в позиции 21 184 869–21 188 198. Мутантный аллель, который обуславливает данный генетический дефект, характеризуется наличием делеции 3.3 тыс. п.н. (Del (V877Lfs27X) в гене FANCI [11]. Данное заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Потомство рождается со сниженной массой тела, несмотря на нормальную или слегка увеличенную продолжительность периода беременности, очевидным укорочением позвоночника, длинными стройными конечностями, нижним брахигнатизмом или микрогнатизмом, а в некоторых случаях – пороками внутренних органов: сердца, почек и половых желез. Широкое распространение гаплотипа НН0 произошло через известного американского быка Sweet Heaven Tradition [14].

В Республике Беларусь в 2021 г. утвердили породу крупного рогатого скота белголштин отечественной селекции молочного направления продуктивности, которая является высокоголштинизированной. Цель наших исследований – изучение генетической структуры популяции крупного рогатого скота новой породы, а также черно-пестрой с целью исключения распространения данных мутаций. Исследования

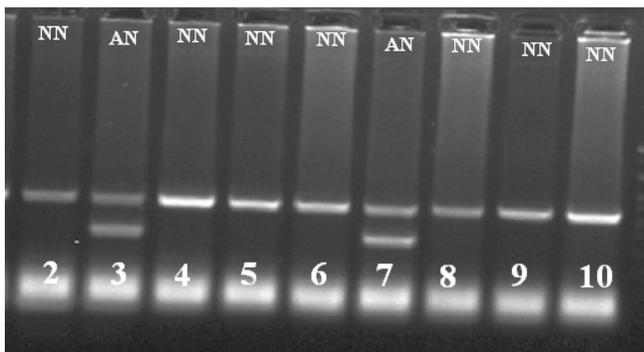


Рис. 1. Электрофореграмма гена APOB, где М – маркер молекулярного веса, 1, 2, 4–6, 8–10 – свободные от мутации животные (NN); 3, 7 – носители мутации (AN)

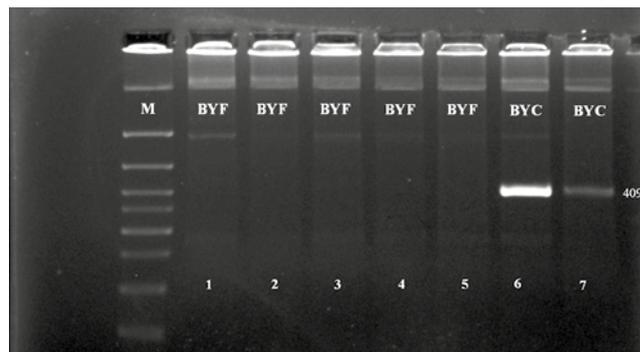


Рис. 2. Электрофореграмма гена FANCI, где М – маркер молекулярного веса, 1–5 – свободные от мутации животные (BYF); 6, 7 – носители мутации (BYC)

проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Основные растворы для выделения ДНК готовили по Т. Маниатису [4].

Генотипирование крупного рогатого скота по выявлению дефицита холестерина и синдрома *brachyspina* осуществлялось на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории ДНК-технологий Гродненского государственного аграрного университета. В качестве биологического материала для выделения ДНК использовали ушную выщип животных, содержащихся в племенных хозяйствах Гродненской, Брестской и Минской областях. Ядерную ДНК получили перхлоратным методом.

Исследования полиморфизма по гену APOB и FANCI было проведено в 2020 г. на выборке племенного поголовья в количестве 344 голов. Гаплотип HCD диагностировали с помощью следующих праймеров:

- 1 – for – GCTGCAAAGCCACCTAGCCT;
- 2 – aff – AAATGCTCGAGAATATCCGGGG;
- 3 – N – GCAGCTGAGCCCACGATCCA.

Использована ПЦР-программа HCD: «горячий старт» – 7 мин при 95 °С; 35 циклов: денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг 30 с при 68 °С, синтез – 30 с при 72 °С; достройка – 7 мин при 72 °С.

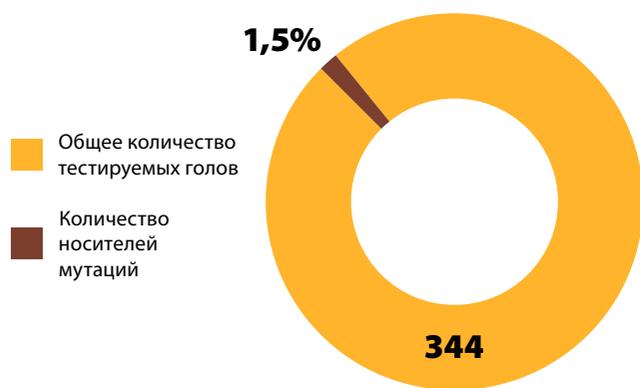
Состав реакционной смеси общим объемом 15 мкл: 14,5 мкл амплификационной смеси + 0,5 мкл ДНК; 0,25 мкл – MgCl₂; 0,2 мкл – dNTP; 2 мкл – буфера; 15 пмоль каждого праймера; 1U Taq-полимеразы; 11,35мкл – H₂O.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали электрофоретическим методом в 2%-ном агарозном геле (при напряжении 110–130 В). Длина амплифицированного фрагмента – 327 п.н.

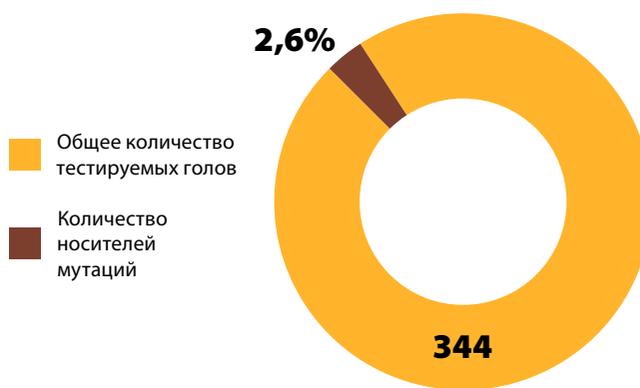
При расщеплении продуктов амплификации идентифицировались следующие генотипы (рис. 1):

- NN – 327 п.н. (свободный от мутации);
- AN – 327/215 п.н. (носитель мутации);
- AA – 215 п.н. (летальный).

Международная отметка в родословной племенных животных мутации, ассоциирован-



Генетическая структура популяции крупного рогатого скота по гену APOB



Частота встречаемости гена FANCI

ной с гаплотипом фертильности HCD: 1% – свободный от мутации, 50% – носитель мутации.

Изучение генетической структуры популяции крупного рогатого скота по гену APOB установило полиморфизм, частота встречаемости мутантного аллеля составила 1,5%.

Диагностика гаплотипа HHO (BS) велась с использованием следующих праймеров и программы:

– BS1: 5'– GCTCAAGTAGTTAGTTGCTCCACTG-3';

– BS2: 5'– АТАААТАААТАААГСАГГАТГСТГААА-3';

– ПЦР-программа: «горячий старт» – 5 мин при 95 °С; 30 циклов: денатурация – 1 мин при 94 °С, отжиг – 1 мин при 60 °С, синтез – 1 мин при 73 °С; достройка – 5 мин при 73 °С.

Состав реакционной смеси общим объемом 25 мкл: 14 мкл амплификационной смеси + 1 мкл ДНК: 0,48 мкл – dNTP; 3 мкл – буфера Turbo; 15 пмоль каждого праймера; 1U Taq-полимеразы; 20,9 мкл – H₂O.

Генотипы идентифицируются без проведения рестрикции, по результатам амплификации:

– BSF – отсутствие продукта амплификации (свободный от мутации);

– BSC – 409 п.н. (носитель мутации).

В качестве контрольного образца использовали ДНК животного – носителя мутантного аллеля. Концентрацию и специфичность амплификата оценивали электрофоретическим методом в 2%-м агарозном геле (при напряжении 110–130 В). У здорового животного (BYF) на электрофореграмме отсутствует продукт амплификации, у животного – носителя мутации (BYC) визуализируется полоса размером 409 п.н. – мутантный аллель (рис. 2).

Международная отметка в родословной племенных животных мутации, ассоциированной с гаплотипом фертильности HHO: BSF – свободный от мутации, BSC – носитель мутации.

В результате молекулярно-генетического тестирования популяции животных крупного рогатого скота был выявлен полиморфизм гена FANSI (BS). Частота встречаемости мутантного аллеля составила 2,6%, что свидетельствует о необходимости обязательного мониторинга и проведения генотипирования на элиминацию данной мутации.

Несмотря на невысокую концентрацию мутантных аллелей в популяции, необходим строгий и обязательный мониторинг генетических заболеваний [12, 13]. Своевременное выявление носителей позволит избежать спаривания двух гетерозиготных особей. Чтобы не допустить

дальнейшего бесконтрольного распространения мутаций, необходимо тестировать не только быков-производителей, но и быкопроизводящих коров. Это позволит оздоровить племенное поголовье страны и ускорить целенаправленный селекционный процесс в племенном животноводстве. ■

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Зиновьева Н. А., Костюнина О. В., Волкова В. В., Ермилов А. Н., Янчуков И. Н. Дефицит холестерина – новый рецессивный генетический дефект голштинского скота / Н. А. Зиновьева [и др.] // Молочное и мясное скотоводство. №2. 2016. С. 5–7.
2. Menzi F, Besuchet-Schmutz N., M. Fragnière, S. Hofstetter, V. Jagannathan, T. Mock, A Raemy, E. Studer, K. Mehinagic, N. Regenscheit, M. Meylan, F. Schmitz-Hsu, and C. Drögemüller. 2016. A transposable element insertion in APOB causes cholesterol deficiency in Holstein cattle // Anim. Genet., doi: 10.1111/age.12410.
3. Charlier C. The role of mobile genetic elements in the bovine genome // Plant Anim. Genome XXIV Conf., 2016. abstr. W636.
4. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук – М., 1984.
5. Позовникова М. В., Митрофанова О. В., Дементьева Н. В. Оценка встречаемости генетического дефекта HCD в стадах голштинского скота северо-западного региона / М. В. Позовникова [и др.] // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: наука и высшее профессиональное образование. 2020. №2(58). С. 265–271.
6. Лихачева Т. Е., Позовникова М. В. Влияние гаплотипа «дефицит холестерина» (HCD) на интенсивность прироста живой массы телок голштинской породы // Известия Оренбургского гос. аграрного ун-та. 2019. №1(75). С. 166–168.
7. Позовникова М. В. Живая масса и уровень холестерина в сыворотке крови телят с генетической мутацией в гене APOB / М. В. Позовникова // Материалы ежегодной международной научной конференции VIII «Лужские научные чтения. Современное Научное знание: теория и практика». Отв. редактор Т. В. Седлецкая. 2020. Ленинградский государственный университет им. А. С. Пушкина (Санкт-Петербург). С. 8–10.
8. Ковалюк Н. В., Сацук В. Ф., Мачульская Е. В., Шахназарова Ю. Ю. Генетические anomalies крупного рогатого скота / Н. В. Ковалюк [и др.] // Сборник научных трудов краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. 2018. Том 7. №1. С. 27–32.
9. Escouffaire H. C., Mesbah-Uddin C., Barbat M., Boussaha A., Deloche M. C., Boichard D., Fritz S., Capitan A. A splice site mutation in CENPU is associated with recessive embryonic lethality in Holstein cattle // Journal of Dairy Science. 2020. V. 103. No1. P. 607–612.
10. Rauw W. M., Kanis E., Noordhuizen-Stassen E.N., Grommers F. J. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. LivestockProductionScience. 1998. Vol. 56. P. 15–33.
11. Rezaee A. R. Implication of complex vertebral malformation and deficiency of uridine mono-phosphate synthase on molecular-based testing in the Iranian Holstein bulls population / A. R. Rezaee, M. R. Nassiry, B. Sadeghi, A. ShafaghMotlagh, M. Tahmoospour, R. Valizadeh // African Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 8(22). P. 6077–6081.
12. Fang L. Identification of brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle / Lingzhao Fang, Yanhua Li, Yi Zhang, Dongxiao Sun, Lin Liu, Yuan Zhang and Shengli Zhang // J. Vet. DiagnInvest. 2013, 25 (4). P. 508–510.
13. Charlier C., Agerholm W. Coppieters P., Karlskov-Mortensen W., Li A. Deletion in the bovine FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. PLoS ONE. 7(8). e43085. doi: 10.1371/journal.pone.0043085. x.
14. Усова Т. П., Усманова Н. Н., Литвина Н. И., Усов Н. В. Распространение Brachyspina (BY) у быков-производителей голштинской породы отечественной и импортной селекции / Т. П. Усова, Н. Н. Усманова, Н. И. Литвина, Н. В. Усов // Вестник Мичуринского государственного университета. 2018. №2. С. 116–119.