

УДК 619:636.2:636.234.1:577.21

РАЗРАБОТКА НАБОРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГОЛШТИНСКИХ ГАПЛОТИПОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ННЗ, НН6, НН7) МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

© 2024 г. В. Д. Зубарева¹, М. В. Бытов¹, О. С. Зайцева¹, О. В. Соколова^{1, *}

¹Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620142 Россия

*e-mail: nauka_sokolova@mail.ru

Поступила в редакцию 07.09.2023 г.

После доработки 15.09.2023 г.

Принята к публикации 19.09.2023 г.

Молочная селекция крупного рогатого скота направлена на повышение продуктивных признаков, в основном за счет использования ограниченного числа племенных быков-производителей. В результате наблюдается рост инбридинга, приводящий к накоплению гетерозигот – носителей рецессивных летальных мутаций. Повышение числа носителей рецессивных летальных аллелей снижает рентабельность животноводческих хозяйств, поскольку увеличивается частота эмбриональной и постэмбриональной смертности, снижается фертильность коров. В данной статье представлены результаты разработок тест-систем для быстрой и недорогой диагностики значимых для животноводства генетически детерминированных заболеваний крупного рогатого скота, а именно для голштинских гаплотипов 3, 6 и 7. Технология диагностики представляет собой ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов. Носителей голштинского гаплотипа 3 не было обнаружено ни в одной из исследованных популяций. Частоты носителей для НН6 и НН7 составили 0.95 и 1.92% соответственно. Полученные значения совпадают с результатами мировых исследований, однако стоит отметить, что в настоящее время проведено мало масштабных скринингов, поскольку казуальные локусы картированы относительно недавно.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, голштинские гаплотипы, летальные мутации, SNP, делеция, ПЦР, TaqMan.

DOI: 10.31857/S0016675824020091 **EDN:** DQPVZA

Особенностью селекции крупного рогатого скота голштинской породы является использование ограниченного числа племенных быков-производителей. Один бык может являться отцом нескольких тысяч дочерей (эффект основателя), что служит причиной увеличения инбридинга в популяции [1]. Такой принцип разведения крупного рогатого скота вызывает быстрое накопление в популяции рецессивных аллелей, в том числе аллелей аутосомно-рецессивных LoF-мутаций (LoF – loss of function), приводящих к утрате функций генов. Появление LoF-мутаций влечет за собой либо ухудшение качества жизни животного, либо эмбриональную или постэмбриональную смертность, принося значительный экономический ущерб животноводческим предприятиям [2].

О возникновении LoF-мутаций при инбридинге известно уже давно [3], однако картирование локусов казуальных мутаций продолжает выполняться [4–6], в том числе и для новых гаплотипов [7–10].

Голштинский гаплотип 3 (OMIAID 001824-9913) открыт в 2014 г. при помощи чипов BovineSNP50 (Illumina, США) и представляет собой миссенс мутацию на хромосоме 8 в 24-ом экзоне гена *SMC2*, кодирующего хромосом-ассоциированный полипептид E [11]. Голштинский гаплотип 6 (OMIA ID 002149-9913) обнаружен после анализа данных генотипирования по той же технологии и картирован к участку размером 1.1 Мб на 16-й хромосоме в виде SNP мутации в гене *SDE2* (кодирует гомолог обслуживания теломер) [5]. Голштинский гаплотип 7 (OMIA ID 001830-9913) обнаружен в результате анализа геномных данных на 27-ой хромосоме в интервалах 13.0–14.4 Мб в виде делеции четырех оснований гена *CENPU* (кодирует центромерный белок U) [6].

Актуальность настоящей разработки обусловлена отсутствием коммерческих тест-систем для диагностики голштинских гаплотипов 3, 6 и 7. Несмотря на то, что данные аутосомно-рецессивные мутации картированы уже несколько лет

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в исследовании

Последовательность 5'–3'	Размер ампликона, пн
Holstein haplotype 3	
F: TCGATGCAGCCCTGGATCTTT R: GCCTCTTTCCTTCTGGAACCAT Probe_A: [HEX]ATGTGTGAAATGAGTACGTA[BHQ2] Probe_G: [ROX]ATGTGTGGAATGAGTACG[BHQ2]	240
Holstein haplotype 6	
F:GCAGTGTGCGACGGATAAA R:CGAGCTTACGTCATCAAGATA Probe_T: [HEX]TGG [LNA-G]TGAGATGGC[LNA-G]GA[BHQ2] Probe_C: [ROX]TGG GTG AGA CGG CGG A[BHQ2] Cotrol_T: GCAGTGTGCGACGGATAAAATCCGCCATCTCACCCAATATCTTGATGACGTAAGCTCG Control_C: GCAGTGTGCGACGGATAAAATCCGCCGTCTCACCCAATATCTTGATGACGTAAGCTCG	193 57 57
Holstein haplotype 7	
F:GTGGTGCTCAAATGTTTACA R:GCTGCGATTAAATCCCTATTTT Probe_del: [FAM]AA[LNA_T]TTCGATATTACTG[LNA_A]AGCA[BHQ1] Probe_pr_WT: [ROX]ATTTCGATATTACTTACTGAAGCA[BHQ2] Cotrol_del:GTGGTGCTCAAATGTTTACAGTGCTTCAGTAATATCGAAATTGAAAATAGGGATTTAATCG CAGC Control_TTAC:GTGGTGCTCAAATGTTTACAGTGCTTCAGTAAGTAATATCGAAATTGAAAATAGGGAT TTAATCGCAGC	165 65 69

назад, методы их диагностики являются дорогостоящими и трудоемкими в использовании. Например для скрининга голштинских гаплотипов 3 и 6 применяется метод ПЦР-ПДРФ с использованием дорогостоящих эндонуклеаз рестрикции. Для голштинского гаплотипа 7 ПЦР-методов диагностики в литературе не описано.

Цель проекта – разработка новых тест-систем ПЦР для диагностики летальных генетических мутаций крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ДНК животных выделяли из крови, законсервированной в ЭДТА, с использованием набора “DiatomDNAprep-400” (Изоген, Россия). Отбор крови осуществляли из хвостовой вены. Проведение исследований было одобрено Комитетом по институциональной этике ФГБНУ “Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук” (протокол № 566 от 5 сентября 2023 г.). Детекцию проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-RadLaboratories, Inc., США). Для диагностики на носительства мутаций использовали специфические олигонуклеотидные праймеры, синтезированные компанией Lumiprobe (Россия) (табл. 1). Дизайн олигонуклеотидов, положительных и от-

рицательных контрольных образцов выполнен с помощью FastPCR 6.8 [12, 13]. Определение температур плавления и отжига праймеров проведено с использованием PrimerBLAST [14] и IDT-DNAOligoAnalyser [15], а проверка на наличие димеров – с помощью ThermoFisherMultiplePrimerAnalyzer [16]. Для контроля эффективности протекания ПЦР при каждом запуске использовали разработанные нами комплекты положительных химических контрольных образцов для мутантного и здорового аллелей. Амплификацию ДНК проводили с помощью экстра-микса HS-Taq ПЦР (2×) (diaGene, Россия).

Температурные режимы, оптимальные для протекания реакций, представлены в табл. 2. Скрининг на наличие голштинских гаплотипов 3, 6 и 7 был проведен на 360, 423 и 417 особях соответственно, включая 89 быков-производителей, чья сперма используется на территории Свердловской области. Оценку специфичности разработанных реакций проводили с использованием гель-электрофореза и системы капиллярного электрофореза Qsep100 (BiOptic, Тайвань). Для капиллярного электрофореза использованы картриджи S2 (BiOptic, Тайвань), выравнивающий маркер 20 пн – 1 Кб и маркер длин ДНК от 15 до 622 пн. С помощью специализированного ПО Q-Analyzer выбраны условия электрофореза

Таблица 2. Режимы амплификации, используемые в исследовании

Гаплотип	Режим амплификации		
	Начальная денатурация	Денатурация, отжиг, элонгация	Окончательная элонгация
	1 цикл	45 циклов	1 цикл
НН3	95° – 10 мин	95° – 15 с, 59° – 30 с, 72° – 30 с 📷*	72° – 10 мин
	1 цикл	40 циклов	1 цикл
НН6	95° – 5 мин	95° – 20 с, 60° – 30 с, 72° – 20 с 📷*	72° – 10 мин
	1 цикл	40 циклов	1 цикл
НН7	95° – 5 мин	95° – 20 с, 57° – 30 с, 72° – 20 с 📷*	72° – 10 мин

* – сканирование.

для наиболее точного анализа и проведена интерпретация результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Каждая из разработанных тест-систем была проверена на специфичность с помощью пластинчатого гель-электрофореза и капиллярного гель-электрофореза (рис. 1). Наблюдается соответствие длины ампликонов с результатами анализа по базе данных Primer BLAST.

Всего на носительство голштинского гаплотипа 3 было исследовано 360 особей крупного рогатого скота Свердловской и Пермской областей, а также Удмуртии. Носителей данной мутации не выявлено. В схожем скрининговом исследовании в выборке из 390 голштинских коров китайской популяции при помощи конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP, kompetitiveallele-specific PCR) была определена доля носительства данной летальной мутации – 2.6% [17].

В ходе работы проведен скрининг 423 особей крупного рогатого скота Свердловской и Пермской областей, а также Удмуртии на носительство голштинского гаплотипа 6. Обнаружено четыре носителя данной аутосомно-рецессивной генетической мутации, что составляет 0.95% от общего исследованного поголовья. Доля носителей в данной выборке не превышает значения в группе быков, сперма которых используется на территории Уральского региона [18]. Полученные данные также совпадают с исследованием китайских ученых, которые проводили скрининг 1633 коров голштинской породы на носительство восьми летальных генетических мутаций при помощи метода KASP, средняя доля носительства составила 1.86% [19].

Кроме того, нами подобрана тест-система для диагностики голштинского гаплотипа 7. Было разработано два комплекта олигонуклеотидов (праймеры и зонды), для каждого из которых проведена оценка эффективности с целью выбора оптимального. С помощью созданной

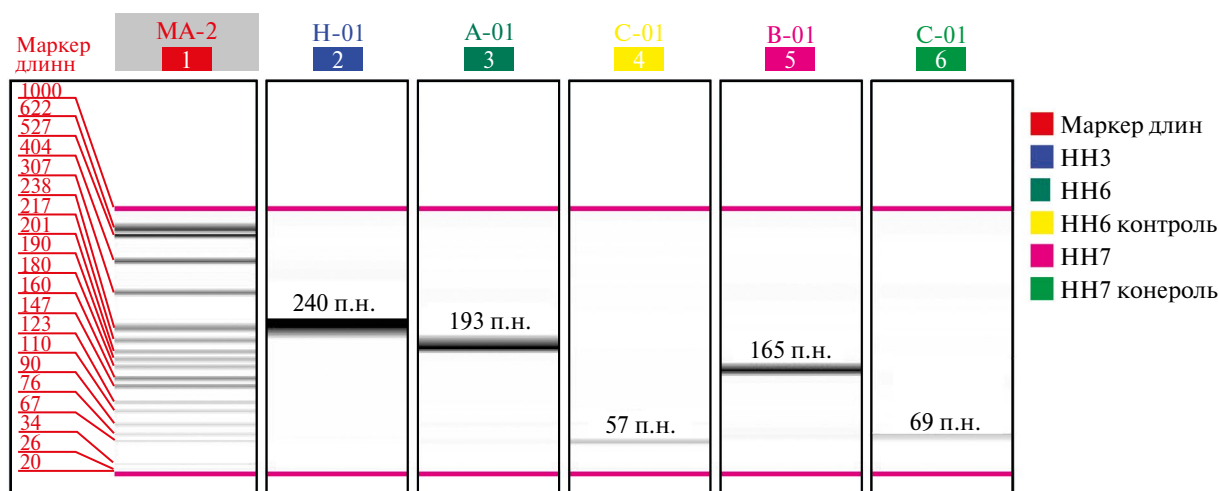


Рис. 1. Результаты капиллярного электрофореза.

ПЦР-системы проведен скрининг 417 особей крупного рогатого скота Свердловской, Пермской и Кировской областей. Всего обнаружено восемь носителей генетического заболевания, то есть 1.92% от общего поголовья. В 2023 г. шведскими учеными исследованы геномные данные более 24000 коров для поиска аллелей летальных мутаций. Частота встречаемости генотипов с HH7 составила 0.29%, и сделан вывод, что носителями данного генетического заболевания являются исключительно потомки голштинских быков [20]. Согласно Решению Коллегии Евразийской экономической комиссии от 2 июня 2020 г. № 74, голштинский гаплотип 7 не подлежит обязательному скринингу, в связи с чем наблюдается накопление данной генетической мутации в популяциях крупного рогатого скота России.

ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые были созданы тест-системы для детекции аллелей голштинских гаплотипов 3, 6, 7 в режиме реального времени. Наша разработка позволяет проводить быструю диагностику данных рецессивных летальных мутаций без использования дорогих коммерческих наборов (KASP) или эндонуклеаз рестрикции (ПЦР-ПДРФ).

Носителей голштинского гаплотипа 3 не было обнаружено ни в одной из исследованных популяций. HH6 выявлен только у представителей голштинской породы крупного рогатого скота. Носители HH7 обнаружены среди коров голштинской породы, а также быков-производителей, чья сперма используется на территории Свердловской обл. Кроме того, носительство летальной мутации выявлено в локальной популяции тагильской черно-пестрой породы, что вероятно связано с использованием быков голштинской породы в селекционных программах. Ранее было показано, что в Уральском регионе наблюдается крайне низкое генетическое разнообразие черно-пестрого голштинизированного крупного рогатого скота [21]. Таким образом, использование испытывающих инбредную депрессию популяций крупного рогатого скота для селекции аборигенных пород может способствовать накоплению генетически детерминированных заболеваний.

В связи с высокой частотой распространения голштинского гаплотипа 7 в уральской популяции крупного рогатого скота желательно проводить мониторинговые исследования племенных

производителей и доноров эмбрионов животных для обеспечения устойчивого развития животноводства в регионе.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России по теме № 0532-2022-0004 “Разработка технологии для маркер-ориентированной селекции крупного рогатого скота по генам, ассоциированным с устойчивостью к заболеваниям”.

Работа выполнена при поддержке Фонда им. Геннадия Комиссарова.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдельманова А.С., Волкова В.В., Доцев А.В. и др. Характеристика генетического разнообразия современной и архивной популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы с использованием микросателлитных маркеров // Достиж. науки и техники АПК. 2020. № 34-2. С. 34–38. <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2020-10207>
2. Зиновьева Н.А. Гаплотипы фертильности голштинского скота // С.-хоз. биология. 2016. Т. 51. № 4. С. 423–435. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.4.423rus>
3. Van Raden P.M., Olson K.M., Null D.J. et al. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes // J. Dairy Sci. 2011. V. 94. № 12. P. 6153–6161. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4624>
4. Ortega M.S., Derek M.B., Kelsey N.L. et al. Truncation of IFT80 causes early embryonic loss in cattle // bioRxiv. 2022. <https://doi.org/10.1101/2021.07.02.450952>
5. Fritz S., Hoze C., Rebours E. et al. An initiator codon mutation in SDE2 causes recessive embryonic lethality in Holstein cattle // J. Dairy Sci. 2018. V. 101. № 7. P. 6220–6231. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14119>
6. Hoze C., Escoufflaire C., Mesbah-Uddin M. et al. Short communication: A splice site mutation in CENPU is associated with recessive embryonic lethality in Holstein cattle // J. Dairy Sci. 2020. V. 103. № 1. P. 607–612. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17056>
7. Hafliger I.M., Spengeler M., Seefried F.R. et al. Four novel candidate causal variants for deficient homozygous haplotypes in Holstein cattle // Sci. Rep. 2022. V. 12. № 1. Article 5435. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09403-6>
8. Wu X., Mesbah-Uddin M., Guldbrandtsen B. et al. Novel haplotypes responsible for prenatal death in Nordic Red and Danish Jersey cattle // J. Dairy Sci. 2020. V. 103. № 5. P. 4570–4578.

- <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17831>
9. Dechow C.D., Frye E., Maunsell F.P. Identification of a putative haplotype associated with recumbency in Holstein calves // *JDS Commun.* 2022. V. 3. № 6. P. 412–415. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2022-0224>
 10. Wu X., Mesbah-Uddin M., Guldbrandsen B. et al. Haplotypes responsible for early embryonic lethality detected in Nordic Holsteins // *J. Dairy Sci.* 2019. V. 102. № 12. P. 11116–11123. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16651>
 11. McClure M.C., Bickhart D., Null D. et al. 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 // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092769>
 12. Kalendar R., Lee D., Schulman A.H. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis // *Genomics*. 2011. V. 98. № 2. P. 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.04.009>
 13. Kalendar R., Khassenov B., Ramankulov Y. et al. Fast PCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis // *Genomics*. 2017. V. 109. № 3–4. P. 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>
 14. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics*. 2012. V. 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
 15. Owczarzy R., Tataurov A.V., Wu Y. et al. IDT SciTools: A suite for analysis and design of nucleic acid oligomers // *Nucl. Ac. Res.* 2008. V. 36. Article W163–W169. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn198>
 16. Breslauer K.J., Frank R., Blocker H. et al. Predicting DNA duplex stability from the base sequence // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1986. V. 83. № 11. P. 3746–3750. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.3746>
 17. Zhang Y., Liang D., Huang H. et al. Technical note: Development and application of KASP assays for rapid screening of 8 genetic defects in Holstein cattle // *J. Dairy Sci.* 2020. V. 103. № 1. P. 619–624. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16345>
 18. Модоров М.В., Мартынов Н.А., Шкуратова И.А. и др. Распространение рецессивных генетических нарушений в уральской популяции крупного рогатого скота // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 4. С. 429–437. <https://doi.org/10.31857/S0016675822040105>
 19. Khan M.Y.A., Omar A.I., He Y. et al. Prevalence of nine genetic defects in Chinese Holstein cattle // *Vet. Med. Sci.* 2021. V. 7. № 5. P. 1728–1735. <https://doi.org/10.1002/vms3.525>
 20. Bengtsson C., Stalhammar H., Thomasen J.R. et al. Mating allocations in Holstein combining genomic information and linear programming optimization at the herd level // *J. Dairy Sci.* 2023. V. 106. № 5. P. 3359–3375. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22926>
 21. Модоров М.В., Ткаченко И.В., Грин А.А. и др. Генетическая структура популяции голштинизированного черно-пестрого скота на территории Урала // *Генетика*. 2021. Т. 57. № 4. С. 437–444. <https://doi.org/10.31857/S001667582104010X>

NOVEL REAL-TIME PCR METHODS FOR BOVINE HAPLOTYPES HH3, HH6, HH7 DIAGNOSIS

V. D. Zubareva¹, M. V. Bytov¹, O. S. Zaitseva¹, O. V. Sokolova¹, *

¹Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620142 Russia

*e-mail: nauka_sokolova@mail.ru

Dairy cattle breeding is aimed at improving the productivity, mainly through the use of a limited number of breeding bulls. As a result, an increase in inbreeding is observed causing accumulation of heterozygotes-carriers of recessive lethal mutations. A rise in the number of carriers reduces the profitability of dairy farms, since the frequency of embryonic and post-embryonic mortality increases, and the fertility of cows decreases. This paper presents the results of the development of test systems for rapid and inexpensive diagnostics of genetically determined cattle diseases that are significant for animal husbandry, namely for Holstein haplotypes 3, 6 and 7. The diagnostic technology is real-time PCR using TaqMan probes. Carriers of the Holstein haplotype 3 were not found in any of the studied populations. The carrier frequencies for HH6 and HH7 were 0.95 and 1.92%, respectively. Carrier frequencies are consistent with the results of studies worldwide, however, it is worth noting that only few large-scale screening studies have been carried out, since causative loci have been mapped relatively recently.

Keywords: cattle, Holstein haplotypes, lethal mutations, SNP, deletion, PCR, TaqMan.