



ДИАГНОСТИКА НА МУТАНТНИЯ АЛЕЛ НА КОМПЛЕКСА ОТ АНОМАЛИИ НА ГРЪБНАЧНИЯ СТЬЛБ (СVM) ПРИ ХОЛЩАЙНИЗИРАНО ЧЕРНО-ШАРЕНО ГОВЕДО ЧРЕЗ PCR-RT МЕТОДА
ДИАГНОСТИКА МУТАНТНОГО АЛЛЕЛЯ КОМПЛЕКСА АНОМАЛИЙ ПОЗВОНОЧНИКА (СVM) МЕТОДОМ PCR-RT У ЧЕРНО-ПЕСТРОГО ГОЛШТИНИЗИРОВАННОГО СКОТА
DIAGNOSTICS OF COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION (СVM) IN BLACK AND WHITE CATTLE BY PCR-RT

Саида Марзанова¹, Давудай Девришов¹, Ирина Турбина¹, Виктор Нагорный¹, Яков Алексеев², Нина Коновалова², Дмитрий Сочивко², Петър Люцканов^{3*}, Нурбий Марзанов⁴
Саида Марзанова¹, Давудай Девришов¹, Ирина Турбина¹, Виктор Нагорный¹, Яков Алексеев², Нина Коновалова², Дмитрий Сочивко², Петр Люцканов^{3*}, Нурбий Марзанов⁴
Saida Marzanova¹, Davydai Devrishov¹, Irina Turbina¹, Viktor Nagorny¹, Iakov Alekseev², Nina Konovalova², Dmitrii Sochivko², Petr Liutskanov^{3*}, Nurbii Marzanov⁴

¹Московска държавна академия по ветеринарна медицина и биотехнологии „К.И. Скрябин“, 109472, г. Москва ул. „Академик Скрябин“, д.23

²Държавно научно учреждение Всероссийски научноизследователски институт по селскостопански биотехнологии Россельхозакадемия, Затворено акционерно общество «Синтол», 127550, Москва, ул. „Тимирязевская“, 42

³Научно-практически институт по биотехнологии в зоотехниката и ветеринарната медицина, Република Молдова MD-6525, Новоаненский район, с. Максимовка

⁴Държавно научно учреждение Всероссийский научноизследователски институт по животноводство Россельхозакадемии, 142132, Московска област, Подолский район, пос. Дубровицы

¹Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23

²Государственное Научное Учреждение Всероссийский научно исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Закрытое Акционерное Общество «Синтол», 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

³Научно-практический институт биотехнологий в зоотехнии и ветеринарной медицине Республики Молдова, MD-6525, Новоаненский район, с. Максимовка

⁴Государственное Научное Учреждение Всероссийский научно исследовательский институт животноводства Россельхозакадемии, 142132, Московская область, Подольский район, пос. Дубровицы

¹The Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skriabin, 109472, г. Moscow, ul. Akademika Skriabina, 23

²State Scientific Institution All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology, Agricultural Academy of Russia, Closed Joint Stock Company «SINTOL», 127550 Moscow, ul. Timiriazevskaya, 42

³Scientific Institute of Applied Biotechnology in Animal Husbandry and Veterinary Medicine of the Republic of Moldova, MD-6525, Novoanenskii r-n, Maksimovka

⁴State Scientific Institution All-Russian Scientific Research Institute of Animal of Agricultural Academy of Russia 142132, Moskovskaya oblasty, Podolyskiy rayon, pos. Dubrovitsi

*E- mail: liutskanov@mail.ru

Резюме

В статията е представена кратка характеристика на методите за екстракция на ДНК, установяването на мутантния алел CV и неговата честота при холщайнизирното черно-шарено говедо.

Резюме

В статье приводится краткая характеристика методов выделения ДНК, определение мутантной аллели, частота встречаемости CV аллеля у голштиinizированного черно-пестрого скота.

Abstract

The article provides a brief description of the methods of DNA extraction, identification of mutant alleles, the frequency of occurrence CV allele in black-and-white Holstein cattle.

Ключови думи: PCR-RT, CVM, говеда, алел.

Ключевые слова: PCR-RT, CVM, крупный рогатый скот, аллель.

Key words: PCR-RT, CVM, cattle, allele.

ВВЕДЕНИЕ

По данным FAO, голштинская черно-пестрая порода охватывает ареал в 128 государствах мира. Жесткая селекционная работа при создании голштинской черно-, и красно-пестрой пород привела к тому, что наряду с высокой продуктивностью, ряд выдающихся быков оказались носителями наследственных заболеваний. Эти мутации распространились по всему миру, явившись шлейфом высокой продуктивности. Одним из таких заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования является комплекс аномалий позвоночника Complex Vertebral Malformation (CVM). Впервые природа болезни была изучена у датской популяции голштинского скота в 1999 году, в результате чего была выявлена мутация, вызывающая развитие данной патологии. Главным источником распространения мутантного аллеля явился элитный бык голштинской породы – Карлин М. Айвенго Белл 1667366 (Agerholm et al., 2001; 2004). Он оказал огромное влияние на улучшение молочной продуктивности у черно-пестрого скота не только в Российской Федерации, но и во всем мире.

Мутация была выявлена во многих странах мира. В гомозиготном состоянии CV аллель вызывает высокую эмбриональную смертность, массовые аборт, большое число мертворожденных телят. Телята, гомозиготные по CV аллелю при рождении имеют множественные анатомические отклонения, это касается шейной и грудной области позвоночного столба, уменьшенным числом ребер и контрактурами конечностей.

Причиной болезни является миссенс-мутация в локусе SLC35A3, замена гуанина на тимин (G559T), в результате в синтезируемом белке происходит замена аминокислоты валина на фенилаланин в 180 позиции (V180F).

Методика диагностики наследственного заболевания была запатентована датскими учеными, а позднее и в других странах. Начиная с 2007 года, в открытой печати появляются новые методы диагностики CVM (Rusc and Kaminski, 2007; Schutz et al., 2008). Однако в условиях Российской Федерации, они потребовали существенной доработки.

Целью данной работы явилась разработка метода выявления мутантного CV аллеля у чёрно-

пестрого голштинизированного скота, установление его встречаемости, генетическая оценка родословных быков-носителей данного аллеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованиями на CVM было охвачено 488 образца семени и крови. Из них, 462 образца были получены от быков и 26 коров черно-пестрого голштинизированного скота. Дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) выделяли из замороженного семени быка и крови коров с помощью фенольно-хлороформного (Maniatis et al., 1984) и сорбентного ДНК-сорб-В, методом разработанным Закрытым Акционерным Обществом «Синтол». Реакцию ПЦР в реальном времени (PCR RV) проводили на приборе Rotor Gene Q (Corbett Research, Австралия). Реакционная смесь имела следующий состав: 50 mM KCl, 50 mM TRIS-HCl, 250 nM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 2,5 ед. ДНК-полимеразы Syntaq. Праймеры использовали в концентрации 200 нМ, флуоресцентные зонды – в концентрации 100нМ. Все реактивы произведены Закрытым Акционерным Обществом «Синтол». Обработку статистического материала осуществляли по общепринятой методике (Marzanov, 1991).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работа проводилась в несколько этапов. На первом этапе был отработан метод выделения ДНК. Для этого были использованы: классический (фенольно-хлороформный) и сорбентный методы выделения ДНК. Вначале был проведен анализ образцов семени. Сравнительный анализ выделения ДНК показал, что лучшим является фенольно-хлороформный метод, несколько уступает сорбентный метод. Однако классический метод, хотя и давал высокоочищенную ДНК, требовал при этом больших затрат времени. Оптимальным для нашей работы представляется сорбентный метод выделения ДНК. Он обладает технической простотой и позволяет экономить время, не прибегая к трудоемкой процедуре фенольной экстракции.

Мы применили аллельспецифические зонды для детекции мутаций в исследуемом фрагменте генома. Для локуса мутации подбирали пару зондов, таких чтобы один из зондов специфически



гибридизовался при температуре проведения элонгации цепей с аллелем дикого типа, а второй зонд – с аллелем мутантного типа. Эти зонды метили разными флуорофорами, и результаты реакции с ними регистрировали на двух различных каналах детекции прибора для PCR-RT. После отработки всей методологии и надежного выявления мутантного аллеля у ряда животных, мы приступили к формированию генетической генеалогии быков-производителей, у которых по результатам ПЦР был выявлен мутантный аллель.

Под генетической генеалогией мы понимаем характеристику родословных на основе использования результатов ДНК-тестов совместно с традиционными методами исследования. В нашем случае вначале был проведен анализ семени черно-пестрого голштинизированного быка Пломбира 998. Бык Пломбир 998 принадлежал ОАО Открытому Акционерному Обществу «Смоленское» по племенной работе. Он был широко использован среди черно-пестрой популяции, разводимой в условиях двух кавказских республик: Кабардино-Балкарии и Ингушетии. Несмотря на его известную родословную и отсутствие анализа на Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) и SVM, семя быка интенсивно использовалось в двух республиках.

Отцом быка Пломбира 998 был Пионер 188. Бык-производитель Пионер 188 принадлежал Открытому Акционерному Обществу «Головному Центру Воспроизводства Сельскохозяйственных Животных» (ОАО ГЦВ) из Московской области. Следует отметить, что он в свою очередь, являлся сыном Карлин М. Айвенго Белла 1667366. Сам Карлин М. Айвенго Белл 1667366 был сыном Пенстейт Айвенго Стар 1441440, который передал своему сыну оба мутантных аллеля, вызывающих BLAD и SVM. Однако бык Пионер 188 не был аттестован на два наследственных заболевания BLAD и SVM, поскольку он использовался в системе племенной службы СССР, а позднее и Российской Федерации до разработки ДНК-диагностики. Исходя из полученных нами результатов, следует, что Пломбир 998 получил обе мутации от отца Пионера 188. Линия быка Монтвика Чифтейна 95679, куда входит Пионер 188, является одной из консолидированных популяций в голштинской породе. Она дает одни из лучших высокопродуктивных потомков, поэтому, когда идет отбор ремонтного молодняка, специалисты Открытого Акционерного Общества «Головной Центр Воспроизводства Сельскохозяйственных Животных» всегда имеют это в виду.

Анализ 488 животных черно-пестрого голштинизированного скота из различных регионов Российской Федерации на носительство CV аллеля показал, что носителями мутации в гетерозиготной форме являются 10 животных или 2,0%, а число особей

с нормальным генотипом соответственно оказалось равным 478 или 98,0%.

Частота встречаемости мутантного аллеля у исследованной популяции черно-пестрого голштинизированного скота составила 1,0%. При этом, сравнение ожидаемых и наблюдаемых чисел конкретных генотипов всей группы выявило отсутствие нарушения генетического равновесия по SLC35A3 локусу у исследованной популяции животных ($\chi^2=0,11$; $df=1$; $p > 0,05$).

Проведенный анализ показал, что быки Голливуд 64, Бэтман 8694, Спектр 1729, Кубок 1459, Кодек 1452 оказались носителями мутантного CV аллеля. Исходя из анализа полученных материалов, следует, что эти животные были правнуками и праправнуками Карлин М. Айвенго Белла 1667366. Причем, из 5 быков-носителей, в племенной сети России были использованы только два: Кубок 1459 и Кодек 1452.

В ряде генетических лабораторий Российской Федерации накоплен довольно большой опыт по диагностике дефицита лейкоцитарной адгезии (BLAD) у чистопородных и помесных животных по голштинской породе (Marzanov et al., 2003; 2008; Norouzy et al., 2005). Полученные данные заносятся в периодически издаваемые каталоги быков. Что же касается комплекса аномалии позвоночника, то первая диагностика с помощью ДНК-анализа была осуществлена датскими учеными. Они же оформили на нее патент, что создало трудности в приобретении и соответственно проведении диагностики в Российской Федерации в течение длительного времени. Создание собственной методической базы позволит удешевить аттестацию быков на SVM в условиях России.

Следует отметить, что ДНК-тесты представляют собой не просто подспорье в генеалогических исследованиях, это современный передовой инструмент, который специалисты могут использовать для установления или опровержения носительства конкретным животным мутантного аллеля, ответственного за определенное наследственное заболевание.

Каждое животное, как и человек, несет в себе своего рода «биологический документ», который не может быть утерян - это ядерная, митохондриальная и Y хромосомы ДНК.

Широкое использование ДНК-маркеров позволит решать многие фундаментальные проблемы, связанные с происхождением животного, определением достоверности происхождения потомков, выявлением породоспецифических аллелей, а также хозяйственно-полезных признаков.

Ярким примером эффективного использования ДНК-технологии служит молекулярно-генетическая

диагностика наследственных болезней, одним из которых является комплекс аномалий позвоночника.

ВЫВОДЫ

1. Впервые в условиях Российской Федерации предложен PCR-RT метод диагностики носительства мутантного CV аллеля. Отработан режим выделения ДНК с помощью сорбентного метода. Проведен анализ носительства CV аллеля у элитных быков и племенных коров.
2. Диагностика мутантного CV аллеля и анализ по ним родословных элитных быков-производителей позволил заложить основы ветеринарно-медицинского консультирования специалистов по купированию молекулярных болезней на современном этапе разведения молочного скота.

LITERATURA

- Agerholm, J. S., C. Bendixen, J. Arnbjerg, O. Anderson, 2001. Complex vertebral malformation in Holstein calves. - Vet. Diagn. Invest., vol. 13, 283-289.*
- Agerholm, J. S., O. Anderson, M. B. Almskou, C. Bendixen, J. Arnbjerg, G. P. Aamand, 2004. Evaluation of the inheritance of the complex vertebral malformation syndrome by breeding studies. - Acta Vet Scand, vol. 45, 133-137.*
- Norouzy, A., M. R. Nassiry, E. Shahrody, A. Javadmanesh, M. R. Mohammad Abadi, G. Sulimova, 2005. Identification of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Holstein and Braun Swiss AI bulls in Iran. - Genetica, vol. 41, N12, 1697-1701.*
- Rusc, A. and S. Kaminski, 2007. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls. - Genetica, vol. 48, N3, 247-252.*
- Schutz, E., M. Scharfenstein, B. Brenig, 2008. Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency DNA-based Testing on disease frequency in the Holstein population. - Dairy Sci., vol. 91, 4854-4859.*
- Maniatis, T., Y. Frich, Dzh. Sýmbruk, 1984. Metodû geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie. per. s angl., Moskva, Mir, 479 s.*
- Marzanov, N. S., 1991. Immunologia i immunogenetika ovets i koz. Izd-vo «Shtiintsya», Kishinev, 237 s.*
- Marzanov, N., H. Amerhanov, G. Eskin, G. Turbina, E. Fedorova, I. Turbina, Yu. Samorukov, E. Kiyko, N. Popov, E. Shukyurova, N. Chervyakov, D. Devrishev, 2008. Genogeografia BLAD v populyatsiyah cherno-pestrogo skota Rossii i za rubezhom. - Molochnoe i myasnoe skotovodstvo, N 4, 2-5.*
- Marzanov, N. S., I. S. Turbina, G. V. Eskin, G. S. Turbina, A. N. Popov, V. M. Ignatyev, B. Harlitsius, 2003. Skrining gena defitsita leykotsitarnoy adgezii u cherno-pestrogo golshtinizirovannogo skota. - Selyskohozyaystvennaya biologia, N 6, 23-30.*

Статията е приета на 12.12.2012 г.
Рецензент – проф. д-р Васил Николов
E-mail: vsn3480@abv.bg