

ПРЕИМУЩЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА TETRA-PRIMER ARMS-PCR РЕАКЦИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ НОСИТЕЛЕЙ ГАПЛОТИПОВ ФЕРТИЛЬНОСТИ ННЗ, НН5 У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ж.Ж. Бименова¹ , В.П. Терлецкий² , А. Багдат¹ , Е.С. Усенбеков¹ *

¹ НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»,
Казахстан, usen03@mail.ru

² Ленинградский государственный университет им А.С. Пушкина,
Российская Федерация, Санкт-Петербург-Пушкин, valeriter@mail.ru

Аннотация: стратегия элиминации вредных мутации у голштинской породы включает проведение генетического мониторинга распространенности скрытых наследственных аномалий с помощью молекулярно-генетических методов. В настоящее время существует тенденция увеличения количества наследственных заболеваний у высокопродуктивных племенных животных вследствие интенсивной селекции и инбридинга. Целью настоящего исследования были разработка новых и совершенствование существующих молекулярно-генетических способов диагностики носителей гаплотипов фертильности ННЗ, НН5 у коров голштинской породы и изучение уровня встречаемости указанных заболеваний. Диагностика гетерозиготных носителей мутации в кодирующей части гена SMC2 проведена методом tetra-primer ARMS-PCR реакции, последовательности внешних и внутренних праймеров определены с помощью программы Primer 1. Для детекции носителей делеции в составе гена TFB1M использованы аллельспецифические праймеры, размеры ПЦР продукта у гомозиготных здоровых животных 442 п.н., у гетерозиготных носителей 442 п.н. и 256 п.н. По результатам генетического мониторинга у исследуемой популяции частота гетерозиготных носителей гаплотипа фертильности ННЗ была – 3,23%, НН5 – 8,35%. Рекомендуются с целью контроля риска заболеваемости племенного поголовья наследственными аномалиями проводить генетический скрининг племенного поголовья молочных хозяйств с охватом диагностических исследований в пределах от 10% до 20% от общего поголовья.

Ключевые слова: гаплотипы фертильности ННЗ; НН5; гены SMC2; TFB1M; tetra-primer; ARMS-PCR реакция; дизайн праймеров; программа Primer 1.

Введение

В настоящее время у крупного рогатого скота зарегистрированы 608 наследственных аномалий, из которых более 50 генетических дефектов идентифицируются с помощью молекулярно-генетических методов диагностики. Известно, наследственные аномалии являются следствием хромосомных нарушений, абберации, изменений в составе соответствующих генов, в виде точечной мутации, инсерции или делеции. Учеными была выявлена новая мутация ARMC3, связанная с морфологическим нарушением в области хвоста спермиев быков производителей. Установлено, что пропорция спермиев с дефектами головки варьировалась от 47% до 62%, данный показатель в десять раз выше, чем в сперме у здоровых животных [1].

Генотипирование образцов ДНК для детекции носителей гаплотипа фертильности HH3 проводится с помощью STAS PCR метода. Используются внешние праймеры: F 5'-TTAGTGGCTCTGTCAATTAATCCTG-3' и R 5'-ATACTGACCATTACTAAAGAATAG-3' и внутренние праймеры F 5'-TGGACATATGCTACGTACTCATTC-3' и R 5'-TTGGTTCTTACCTGAGAATGTGTGA-3'. Использование внешних праймеров позволяет амплифицировать фрагмент гена SMC2 (structural maintenance of chromosomes 2) длиной 219 п.н., детекция аллелей мутантного и дикого типов осуществляются с помощью внутренних праймеров (дикий тип аллели – 155 п.н., мутантный тип аллели – 112 п.н.) [2].

Первые сообщения об использовании tetra-primer ARMS-PCR реакции для детекции гетерозиготных носителей точечной мутации в медицинской практике, в ветеринарии, также для ДНК паспортизации племенных животных появились в 2013 году. Так, ученые для идентификации аллелей гена каппа казеина крупного рогатого скота использовали эффективную методику – способ tetra-primer ARMS-PCR реакции, которая имеет некоторые преимущества, по сравнению с существующими классическими ПЦР-ПДРФ способами: не применяются эндонуклеазы, сокращается длительность ДНК анализа, снижается себестоимость исследования, так как нет необходимости проведения рестрикции амплификата. Следует отметить, что дизайн праймеров для tetra-primer ARMS-PCR реакции осуществляется с помощью программы Primer 1: (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) [3].

Учеными проводится работа по оптимизации и модификации условий проведения tetra-primer ARMS-PCR, так как в составе реакционной смеси в течение 35-40 циклов работают одновременные три пары праймеров: прямой внешний и обратный внешний праймеры, прямой внешний и обратный внутренний праймеры, прямой внутренний и обратный внешний праймеры [4].

Таким образом, этап оптимизации реакции является достаточно сложным процессом и требует много времени. Важными факторами являются: методы изоляции ДНК, температура отжига праймеров, ПЦР протоколы, реагенты и концентрация праймеров. Температура плавления считалась важным фактором амплификации, однако небольшие изменения концентрации реагентов также существенно влияют на ПЦР, особенно концентрация $MgCl_2$. Необходимо каждый раз оптимизировать концентрацию внутренних и внешних праймеров в составе реакционной смеси [5].

Другими исследователями для tetra-primer ARMS-PCR реакции праймеры были подобраны с помощью http://primer1.soton.ac.uk/public_html/primer1.html и специфичность разработанных праймеров были проверены с помощью <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Определяющими факторами для оптимизации метода tetra-primer ARMS-PCR были: необходимая концентрация реагентов ПЦР, соотношение внешнего и внутреннего праймеров, а также температура отжига [6].

Точные и недорогие методы генетического исследования SNP полиморфизмов актуальны в ветеринарной практике, особенно когда нужно проанализировать большое поголовье животных на генетические аномалии. Дефицит адгезии лейкоцитов крупного рогатого скота (BLAD) является важным генетическим заболеванием и для ПЦР диагностики разработаны специальные праймеры, позволяющие выявить гетерозиготных носителей BLAD [7]. Для выявления носителей мутации CVM применяется в основном аллель-специфическая реакция, так как отсутствуют рестриктазы для распознавания SNP полиморфизма (SNP rs438228855). Следует отметить, что существующий способ сложный, в некоторых случаях неточный, длительный. У гомозиготных здоровых животных появляются фрагменты: 389 п.н. и 199 п.н., у гетерозиготных носителей 389 п.н., 241 п.н. и 199 п.н. [8]. Гаплотипы фертильности HH3, HH5 у коров голштинской породы сопровождается эмбриональной смертностью, ранними абортами и соответственно, разработка способов диагностики имеет большое практическое значение. Целью настоящего исследования

является разработка и внедрение для выявления точечной мутации способа tetra-primer ARMS-PCR реакции при генетических дефектах, гаплотипах фертильности HH3, HH5 у крупного рогатого скота.

Материалы и методы

В качестве материала для ДНК тестирования коров были использованы 207 образцов замороженной крови крупного рогатого скота голштинской породы племенного хозяйства №1 и 164 образца крови племенного хозяйства №2 Алматинской области. Экстракция ДНК из замороженной крови проводилась в лаборатории «Зеленой биотехнологии и клеточной инженерии» Казахстанско-Японского инновационного центра КазНАИУ согласно инструкции производителя коммерческого набора. Количество изолированной геномной ДНК и степень очистки ДНК определяли с помощью микроспектрофотометрического анализа (NanoDrop™ 2000). Для анализа последовательностей генов SMC2, TFB1M использовалась информация, имеющаяся на Американском сайте NCBI в форматах FASTA и GenBank, последовательности праймеров для tetra-primer ARMS-PCR реакции определяли с помощью программы Primer 1: Forward inner primer (T allele): 885 TTGGACATATGCTACGTAAGTCTCAGTT 909, Reverse inner primer (C allele): 930 GTTCTTACCTGAGAATGTGGGG 909, Forward outer primer (5' – 3'): 773 AGGTCTTTAGTGGCTCTGTCAATTAAT 798, Reverse outer primer (5'–3'): 1125 TTGTAATTCCAGGCTCTTTCTTTAA 1101, температура отжига 59 (54)°C, Product size for T allele: 242 bp, Product size for C allele: 158 bp и Product size of two outer primers: 353 bp.

Детекция аллелей гена TFB1M (гаплотип HH5) у коров проводилась с помощью следующих пар праймеров: прямого праймера для дикого типа F–WD: 5'–CAGCATCCAGAAGCATCATTTGTAAG–3' и прямого праймера для мутантного типа аллели F–MT: 5'–CAGAAGCATCATKGTAATTGTAATCAT–3', обратного праймера для дикого типа аллели R–R–WD: 5'–AAGGCAGCTGTCAAATTTATTGTTGTTT–3', обратного праймера для мутантного типа аллели R–MT: 5'–CTATGAATTTTGTGAATGGTATGGTGTA–3'. Использование вышеуказанной пары праймеров позволяет амплифицировать участок гена длиной 90 п.н., реакция проводится в двух отдельных пробирках одновременно и где идет амплификация, идентифицируется как гетерозиготные носители гаплотипа фертильности HH5.

Также, для выявления инсерции в части гена TFB1M был использован другой способ: F: 5'–AGATATGCTAAAGTTTACCTAGAAGAA–3', Wild R: 5'–CTGAAGCTCCATTCTGAGTCAT–3', Mutant R: 5'–TGCTCTATGAATTTTGTGAATGGT–3'. В зависимости от генотипа животных в результате амплификации образуются фрагменты: 442 п.н. и 256 п.н., первый фрагмент соответствует дикому типу аллели, второй мутантному типу аллели гена TFB1M. Разделение фрагментов ДНК, амплификата осуществлялось в 3% агарозном геле с помощью горизонтального электрофореза.

Результаты

Проведено ДНК тестирование 371 образца крови коров голштинской породы зарубежной селекции племенных хозяйств Алматинской области на генетические дефекты, гаплотипы фертильности HH3, HH5 с помощью tetra-primer ARMS-PCR реакции. Компьютерная программа Primer 1 позволяет осуществлять дизайн внешних и внутренних праймеров: Forward outer primer 5'–AGGTCTTTAGTGGCTCTGTCAATTAAT 3', Reverse outer primer 5'–TTGTAATTCCAGGCTCTTTCTTTAA 3', Forward inner primer (T allele): прямой 5 TTGGACATATGCTACGTAAGTCTCAGTT и обратный Reverse inner primer (C allele): обратный GTTCTTACCTGAGAATGTGGGG. Прямые и обратные внешние праймеры позволяют амплифицировать фрагмент гена SMC2 длиной 353 п.н., который не имеет диагностическое значение (рисунок 1).

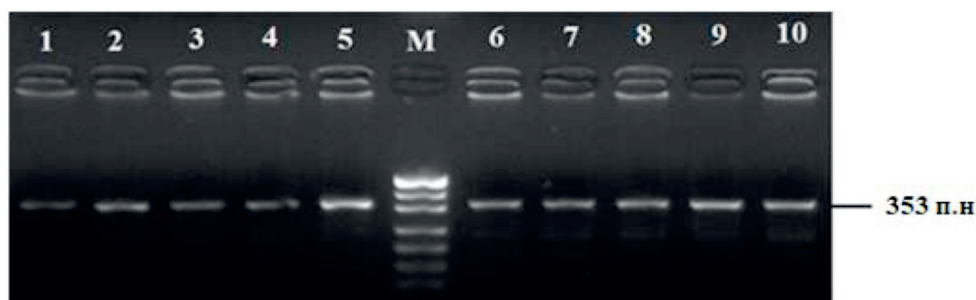


Рисунок 1. Электрофореграмма амплификата гена SMC2 (гаплотип HH3), 3% агароза, 1-10 лунки ампликат размером 353 п.н., М – ДНК маркер pUC19/MspI

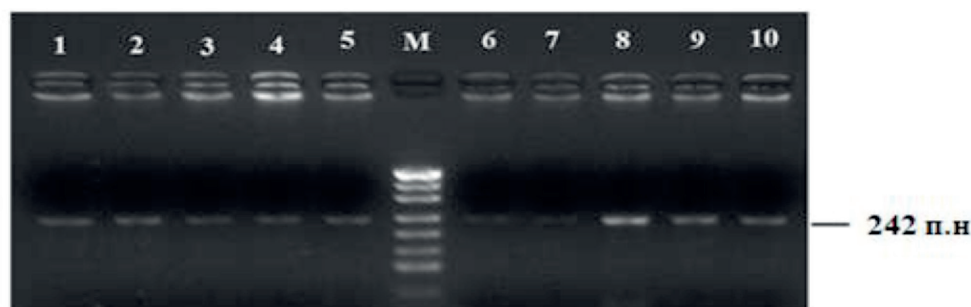


Рисунок 2. Электрофореграмма результата tetra-primer ARMS-PCR реакции, амплификат гена SMC2 характерный для дикого типа аллели Т, 4% агароза, 1-10 лунки здоровые гомозиготные животные, фрагмент 242 п.н., М – ДНК маркер pUC19/MspI

Идентификация гомозиготных здоровых особей и гетерозиготных носителей мутации гаплотипа фертильности HH3 нами осуществлялась с помощью tetra-primer ARMS-PCR реакции, с помощью внутреннего прямого и внешнего обратного праймеров были синтезированы фрагменты, длиной 242 п.н., характерные для гомозиготных здоровых животных (рисунок 2). На электрофореграмме (рисунок 3) продемонстрированы образцы ДНК гетерозиготных носителей, амплифицированные с использованием специфичных для мутантного типа С аллели праймеров, внешнего прямого и внутреннего обратного праймеров, на электрофореграмме хорошо видны фрагменты размером 158 п.н., оптимальной температурой отжига праймеров составила 54°C.

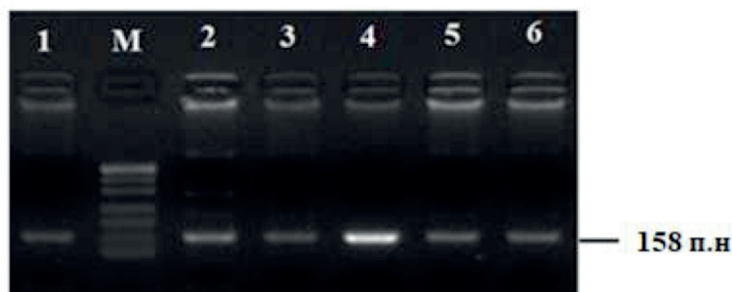


Рисунок 3. Электрофореграмма tetra-primer ARMS-PCR реакции с праймерами для мутантного типа аллели С гена SMC2, 4% агароза, 1, 2-6 лунки гетерозиготные носители HH3, амплификат 158 п.н., М – ДНК маркер pUC19/MspI

В наших экспериментах на первом этапе работы для диагностики носителей делеции в составе гена TFB1M (гаплотип фертильности HH5) был использован способ амплификации участка гена с помощью аллель специфических праймеров, одновременно в двух разных пробирках, размер полученного амплификата 90 п.н. (рисунок 4).

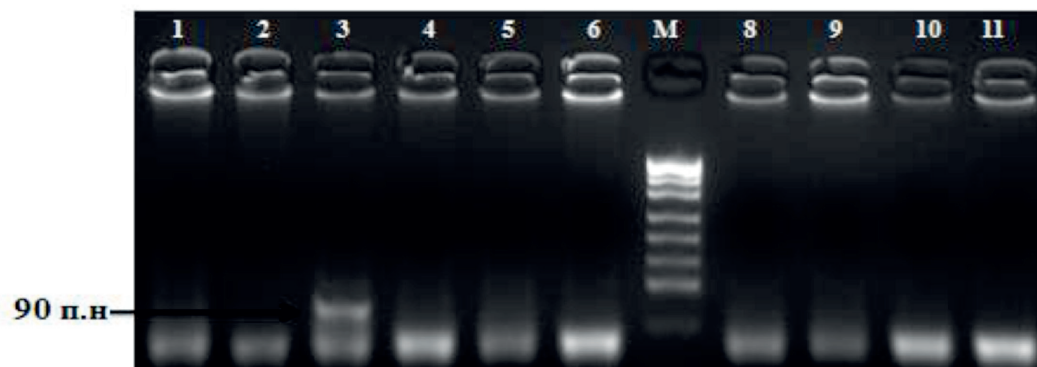


Рисунок 4. Электрофореграмма амплификата гена TFB1M, 4,0% агароза, 1-2, 4-11 лунки отрицательный результат, здоровые гомозиготные, 3-лунка гетерозиготный носитель гаплотипа HH5, длина фрагмента 90 п.н., М – ДНК маркер pUC19/MspI

Следует отметить, что прямые праймеры для дикого и мутантного типов аллелей имеют одинаковую последовательность, идентифицировать гомозиготных здоровых особей и гетерозиготных носителей позволяет применение специфических обратных праймеров, которые комплементарны к дикому и мутантному типам аллелей гена TFB1M. Методологическая сущность метода заключается в том, что при одновременной амплификации образцов ДНК, в двух разных пробирках идет амплификация во всех образцах, если животные являются гомозиготными здоровыми, во второй пробирке, с обратными праймерами для мутантного типа аллелей идет амплификация фрагмента гена только, у гетерозиготных носителей. Амплификация проводится параллельно в двух разных пробирках, так как ПЦР продукт имеет одинаковый размер – 90 п.н., визуализация результатов амплификации осуществляется в 4,0% агарозном геле (рисунок 4).

Таким образом, с помощью вышеизложенного способа идентифицирует гетерозиготных носителей гаплотипа фертильности HH5, однако данный способ трудоемкий, затратный, одновременно необходимо поставить ПЦР в двух разных пробирках, размер полученного амплификата небольшой (90 п.н.), который слабо визуализируется на электрофореграмме. Поэтому, нами на следующем этапе работы был использован альтернативный способ детекции носителей гаплотипа фертильности HH5 с помощью следующих праймеров: F: 5'-AGATATGCTAAAGTTTACCTAGAAGAA-3', R: 5'-CTGAAGCTCCATTCTGAGTCAT-3', R: 5'-TGCTCTATGAATTTTGTGAATGGT-3'. В состав реакционной смеси входят три праймера, общий прямой и два обратных, специфичных для дикого (442 п.н.) и мутантного типов аллелей (256 п.н.) (рис 4).

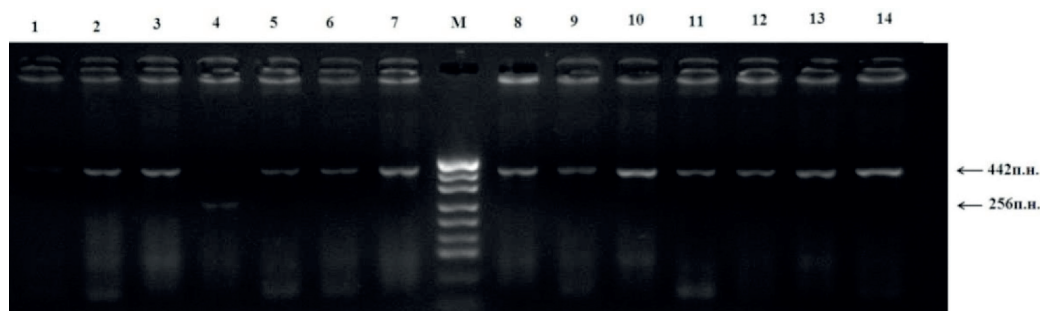


Рисунок 5. Электрофореграмма амплификата гена TFB1M, 3% агароза, 1-3, 5-14 лунки здоровые гомозиготные, 4-лунка – гетерозиготный носитель гаплотипа HH5, длина фрагментов 442 п.н., 256 п.н., М – ДНК маркер pUC19/Mspl

ПЦР диагностика носителей гаплотипа фертильности HH5 проводится в двух вариантах, где в состав реакционной смеси входят все три праймера и позволяет определить гомозиготных здоровых животных и гетерозиготных носителей. Другой вариант, в состав реакционной смеси входят общий прямой праймер и обратный праймер для мутантного типа аллели и в результате амплификации образуется ПЦР продукт размером 256 п.н., характерный для гетерозиготных носителей (рисунок 5).

В результате генетического скрининга 371 коров были выявлены гетерозиготные носители мутации гаплотипа фертильности HH3 у 7 коров (3,38%) голштинской породы Канадской селекции в племенном хозяйстве №1 и у 5 коров (3,04%) в племенном хозяйстве №2. Распространенность другого гаплотипа HH5 у коров племенного хозяйства №1 была высокой и составила 11,59% (24 животные), у коров племенного хозяйства №2 – 4,26% (7 голов).

Обсуждение

Известно, что ген SMC2 (гаплотип HH3) локализован на хромосоме 8, данный генетический дефект появился в результате точечной мутации Т→С в позиции F1135S (95410507) [9]. Российские ученые для детекции носителей гаплотипа фертильности HH3 используют три праймера, специфичные для дикого и мутантного типов аллелей, идентификация генотипов животных осуществляется путем рестрикции полученного ПЦР продукта рестриктазой SspMI с сайтом узнавания C↑TAG, на электрофореграмме у здоровых гомозиготных животных появляются два фрагмента: 219 п.н. и 155 п.н., у гетерозиготных носителей три фрагмента: 219 п.н., 155 п.н. и 112 п.н. [10]. Установлена локализация точечной мутации в составе гена SMC2, выделена красным цветом в квадратной скобке: GCCCTGGATCTTTCT CATACTCAGAATATTGGACATATGCTACGTA[Т/С]CTCA

TTACACATTCTCAGGTAAGAACCAAAA. Нами, с помощью программы Primer 1 были определены последовательности двух внешних и двух внутренних праймеров, у гетерозиготных носителей гаплотипа фертильности на электрофореграмме были обнаружены фрагменты размером 158 п.н. (рисунок 3). Разработанный способ tetra-primer ARMS-PCR реакции отличается от существующего способа тем, что исключается применение рестриктазы, что снижает себестоимость диагностических исследований. Также важным фактором являются оптимальные размеры полученных с помощью tetra-primer ARMS-PCR реакции фрагментов: 353 п.н., 242 п.н. и 158 п.н., которые хорошо визуализируются в 3,0% агарозном геле при горизонтальном электрофорезе.

Согласно стратегии снижения распространения летальных вредных мутации у крупного рогатого скота голштинской породы предусмотрено проведение генетического мониторинга поголовья племенных животных с охватом не менее 10-20% от общего поголовья.

В племенном хозяйстве №1 количество крупного рогатого скота разной половозрастной группы составило 800 голов, в племенном хозяйстве №2 600 голов, уровень охвата диагностическим исследованием на генетические дефекты HH3, HH5, составил 25,8% и 27,3%, соответственно.

Заключение

Существуют три варианта возникновения генетических дефектов у крупного рогатого скота, в результате точечной мутации, (замена одного нуклеотида, SNP полиморфизм), инсерции (вставка в кодирующей части гена) и делеции (удаление участка гена). В работе для выявления точечной мутации в позиции F1135S T→C гена SMC2 был использован способ tetra-primer ARMS-PCR реакции, последовательности праймеров определены программой Primer 1, так как нет соответствующей рестриктазы для идентификации мутантного и дикого типов аллелей. Таким образом, разработанный способ является быстрым, точным и позволяет проводить генетический мониторинг животных в большом количестве. Причиной возникновения гаплотипа фертильности HH5 у голштинской породы скота является делеция участка гена TFB1M, длиной 138 347 п.н., соответственно для детекции носителей данного гаплотипа были использованы три праймера: прямой общий и обратный праймер для дикого типа аллели, обратный праймер для мутантного типа аллели. Полученные в результате амплификации фрагменты ДНК достаточного размера, 442 п.н. и 256 п.н., хорошо визуализируются на электрофореграмме. Частота гетерозиготных носителей гаплотипа HH3 и HH5 у исследуемой популяции составила 3,23% и 8,35%, соответственно.

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта: «Разработка молекулярно-генетических способов детекции скрытых мутации у крупного рогатого скота и управление процессом элиминации наследственных аномалии» на 2021-2023 годы.

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководству и сотрудникам Казахстанско-Японского инновационного центра КазНАИУ за оказанную помощь в проведении данных исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- 1 Hubert Pausch, Heli Venhoranta, Christine Wurmser, Kalle Hakala, Terhi Iso-Touru, Anu Sironen, Rikke K. Vingborg, Hannes Lohi, Lennart Söderquist, Ruedi Fries and Magnus Andersson. A frameshift mutation in ARMC3 is associated with a tail stump sperm defect in Swedish Red (Bos taurus) cattle // BMC Genetics. – 2016. – P. 17-49.
- 2 Багдат А.Б., Усенбеков Е.С. Модификация способа диагностики носителей гаплотипа фертильности HH3 у коров голштинской породы с помощью STAS PCR метода //Материалы международной научной конференции студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ЭЛЕМИ» Алматы, Казахстан, 6-9 апреля 2020. – С. 227
- 3 P.A.S. Fonseca, I.C. Rosse, M. DeMiranda, M.A. Machado, R.S. Verneque, M.G.C.D. Peixoto and M.R.S. Carvalho. A new tetra-primer ARMS-PCR for genotyping bovine kappa-casein polymorphisms// – 2013. – Vol. 12. – P. 6521-6526.
- 4 Hamzeh Mesrian Tanha, Marjan Mojtabavi Naeini, Soheila Rahgozar, Seyed Mohammad Mahdi Rasa, and Sadeq Vallian. Modified Tetra-Primer ARMS PCR as a Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping Tool // GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS. – 2015. – Vol. 19, №3. – P. 1-6
- 5 Ruan Felipe Vieira Medrano, Camila Andre´a de Oliveira. Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR Technique Development. Mol Biotechnol. – 2014. – Vol. 56, P. 599–608, DOI 10.1007/s12033-014-9734-4

- 6 Ana Sofia Zabala, Miriam Ester Vasquez Gomez, Micaela Fernanda Álvarez, Susana Siewert. Tetra Primer ARMS PCR Optimization to Detect Single Nucleotide Polymorphism of the KLF14 Gene // Open Access Library Journal – 2017. – Vol. 4.
- 7 Rafeeqe R. Alyethodi, Umesh Singh, Sushil Kumar, Rajib Deb, Rani Alex, Sheetal Sharma, Gyanendra S. Sengar and B. Prakash. Development of a fast and economical genotyping protocol for bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in cattle // SpringerPlus – 2016. – Vol. 5. – P.1442.
- 8 Alyethodi R. R., Singh U., Kumar S., Alex R., Sengar G. S., Raja T. V., Deb R. and Prakash B. Designing, optimization, and validation of whole blood direct T-ARMS PCR for precise and rapid genotyping of complex vertebral malformation in cattle // Alyethodi et al. BMC Biotechnology. – 2021. – P. 21-36.
- 9 Hayes B, Daetwyler HD, Fries R, Guldbandsen B, Lund MS, et al. The 1000 Bull Genomes Project – Toward Genomic Selection From Whole Genome Sequence Data In Dairy and Beef Cattle // Plant Anim Genome XXI Conf. San Diego, CA: Abstr. – 2013. – Vol.150.
- 10 Романенкова О.В., Гладырь Е.А., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Разработка тест-системы для диагностики гаплотипа фертильности крупного рогатого скота HH3, ассоциированного с ранней эмбриональной смертностью // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. № 11.

References

- 1 Hubert Pausch, Heli Venhoranta, Christine Wurmser, Kalle Hakala, Terhi Iso-Touru, Anu Sironen, Rikke K. Vingborg, Hannes Lohi, Lennart Söderquist, Ruedi Fries and Magnus Andersson. A frameshift mutation in ARMC3 is associated with a tail stump sperm defect in Swedish Red (Bos taurus) cattle // BMC Genetics. – 2016. – P. 17-49.
- 2 Bagdat A.B., Usenbekov E.S. Modifikaciya sposoba diagnostiki nositelej gaplotipa fertil'nosti HH3 u korov golshtinskoj porody s pomoshch'yu STAS PCR metoda // Materialy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii studentov i molodyh uchenykh «FARABI ALEMI» Almaty, Kazakhstan, 6-9 aprelya 2020. – S. 227.
- 3 P.A.S. Fonseca, I.C. Rosse, M. DeMiranda, M.A. Machado, R.S. Verneque, M.G.C.D. Peixoto and M.R.S. Carvalho. A new tetra-primer ARMS-PCR for genotyping bovine kappa-casein polymorphisms// – 2013. – Vol.12. – P. 6521-6526.
- 4 Hamzeh Mesrian Tanha, Marjan Mojtavavi Naeini, Soheila Rahgozar, Seyed Mohammad Mahdi Rasa, and Sadeq Vallian. Modified Tetra-Primer ARMS PCR as a Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping Tool // GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS. – 2015. – Vol.19, №3. – P. 1-6
- 5 Ruan Felipe Vieira Medrano, Camila Andre'a de Oliveira. Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR Technique Development. Mol Biotechnol. – 2014. – Vol. 56, P. 599-608, DOI 10.1007/s12033-014-9734-4
- 6 Ana Sofia Zabala, Miriam Ester Vasquez Gomez, Micaela Fernanda Álvarez, Susana Siewert. Tetra Primer ARMS PCR Optimization to Detect Single Nucleotide Polymorphism of the KLF14 Gene // Open Access Library Journal – 2017. – Vol. 4.
- 7 Rafeeqe R. Alyethodi, Umesh Singh, Sushil Kumar, Rajib Deb, Rani Alex, Sheetal Sharma, Gyanendra S. Sengar and B. Prakash. Development of a fast and economical genotyping protocol for bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in cattle // SpringerPlus – 2016. – Vol. 5. – P.1442.
- 8 Alyethodi R.R., Singh U., Kumar S., Alex R., Sengar G.S., Raja T.V., Deb R. and Prakash B. Designing, optimization, and validation of whole blood direct T-ARMS PCR for precise and rapid genotyping of complex vertebral malformation in cattle // Alyethodi et al. BMC Biotechnology. -2021.- P.21-36.
- 9 Hayes B, Daetwyler HD, Fries R, Guldbandsen B, Lund MS, et al. The 1000 Bull Genomes Project – Toward Genomic Selection From Whole Genome Sequence Data In Dairy and Beef Cattle // Plant Anim Genome XXI Conf. San Diego, CA: Abstr. – 2013. – Vol. 150.
- 10 Romanenkova O.V., Gladyr E.A., Kostyunina O.V., Zinoveva N.A. Razrabotka test-sistemy dlya diagnostiki gaplotipa fertil'nosti krupnogo rogatogo skota HH3, associirovannogo s rannej embrional'noj smertnost'yu // Dostizheniya nauki i tekhniki APK. – 2015. – Т. 29. № 11.

ІРІ ҚАРА МАЛЫНДА ННЗ, НН5 ҰРЫҚТАНҒЫШТЫҚ ГАПЛОТИПТЕРІН БАЛАУ ЖАСАУҒА TETRA-PRIMER ARMS-PCR РЕАКЦИЯ ӘДІСІН ҚОЛДАНУДЫҢ АРТЫҚШЫЛЫҚТАРЫ

Ж.Ж. Бименова¹ , В.П. Терлецкий² , А. Багдат¹ , Е.С. Усенбеков¹ *

¹ КЕАҚ «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті»,
Қазақстан, usen03@mail.ru

² А.С. Пушкин атындағы Ленинград мемлекеттік университеті,
Ресей Федерациясы, Санкт-Петербург-Пушкин valeriter@mail.ru

Аңдатпа: Голштейн тұқымындағы зиянды мутацияны жою стратегиясы молекулалық-генетикалық әдістерді қолдана отырып, жасырын тұқым қуалайтын ауытқулардың таралуына генетикалық мониторинг жүргізуді қамтиды. Қазіргі уақытта қарқынды селекция және инбридинг бір популяция аумағындағы жақын түрлердің будандасуы салдарынан жоғары өнімді асыл тұқымды жануарлардағы тұқым қуалайтын аурулар санының ұлғаюы байқалады. Осы зерттеудің мақсаты голштейн тұқымдас сиырлардағы ННЗ, НН5 ұрықтанғыштық гаплотиптерінің тасымалдаушыларын диагностикалаудың жаңа және қолданыстағы молекулалық-генетикалық әдістерін жасау және осы аурулардың пайда болу деңгейін зерттеу болып табылды. SMN2 генінің кодтау бөлігіндегі гетерозиготалы мутация тасымалдаушыларын диагностикалау tetra-primer ARMS-PCR реакциясы арқылы жүзеге асырылады, сыртқы және ішкі праймерлердің тізбектері Primer 1 бағдарламасының көмегімен анықталады. TFB1M генінің құрамындағы делеция тасымалдаушыларын анықтау үшін аллельді арнайы праймерлер қолданылды, гомозиготалы сау жануарлардағы ПТР өнімінің мөлшері 442 ж. н., гетерозиготалы тасымалдаушыларда 442 ж.н. және 256 ж.н. анықталды. Генетикалық мониторинг нәтижелері бойынша зерттелген популяцияда ННЗ ұрықтанғыштық гаплотипінің гетерозиготалы тасымалдаушыларының жиілігі – 3,23%, НН5 – 8,35% құрады. Асыл тұқымды мал басының тұқым қуалайтын ауытқулармен ауру қаупін бақылау мақсатында диагностикалық зерттеулерді қамти отырып, жалпы мал басының 10%-дан 20%-ға дейінгі ауқымын асыл тұқымды сүт шаруашылықтарының мал басына генетикалық скрининг жүргізу ұсынылады.

Түйін сөздер: ННЗ; НН5 ұрықтанғыштық гаплотиптері; SMC2; TFB1M гендері; tetra-primer; ARMS-PCR реакциясы; праймер дизайны; Primer 1 бағдарламасы.

№10
2022

ADVANTAGES OF USING TETRA-PRIMER ARMS-PCR REACTION METHOD FOR DETECTING CARRIERS OF NN3, NN5 FERTILITY HAPLOTYPES IN CATTLE

Zh.Zh. Bimenova¹ , V.P. Terlestky² , A.B. Bagdat¹ , Y.S. Ussenbekov¹ *

¹ NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Kazakhstan, usen03@mail.ru

² Leningrad State University named after A.S. Pushkin, Russian Federation,
St. Petersburg-Pushkin, valeriter@mail.ru

Abstract: the strategy for eliminating harmful mutations in the Holstein breed includes genetic monitoring of the prevalence of hidden hereditary anomalies using molecular genetic methods. Currently, there is a tendency to increase the number of hereditary diseases in

highly productive breeding animals due to intensive selection and inbreeding. The aim of this study was to develop new and improve existing molecular genetic methods for diagnosing carriers of fertility haplotypes HH3, HH5 in Holstein cows and to study the incidence of these diseases. Diagnosis of heterozygous carriers of the mutation in the coding part of the SMC2 gene was carried out using the tetra-primer ARMS-PCR reaction, the sequences of external and internal primers were determined using the Primer 1 program. Allele-specific primers were used to detect carriers of the deletion in the TFB1M gene, the sizes of the PCR product in homozygous healthy animals 442 bp, in heterozygous carriers 442 bp. and 256 b.p. According to the results of genetic monitoring in the study population, the frequency of heterozygous carriers of the HH3 fertility haplotype was 3.23%, HH5 – 8.35%. It is recommended, in order to control the risk of morbidity of breeding stock with hereditary anomalies, to carry out genetic screening of breeding stock of dairy farms with the coverage of diagnostic tests ranging from 10% to 20% of the total livestock.

Key words: fertility haplotypes HH3; HH5; SMC2 genes; TFB1M; tetra-primer; ARMS-PCR reaction; primer design; Primer 1 program.