

МРНТИ 68.41.57

УДК 636.223.1, 636.2.033

<https://doi.org/10.52269/RWEP252128>

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЦР-ПДРФ АНАЛИЗА И РЕАЛ-ТАЙМ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НОСИТЕЛЕЙ СИНДРОМОВ DEVELOPMENTAL DUPLICATIONS, ARTHROGRIPOSIS MULTIPLEX У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Дюсекенова Н.Т. – магистр ветеринарных наук, кафедра «Клинические дисциплины», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, Республика Казахстан.

Турғумбеков А.А. – PhD доктор, старший преподаватель, кафедра «Клинические дисциплины», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, Республика Казахстан.

Хусаинов Д.М. – кандидат ветеринарных наук, профессор, кафедра «Биологическая безопасность», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, Республика Казахстан.

Усенбеков Е.С.* – кандидат биологических наук, профессор, кафедра «Клинические дисциплины», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, Республика Казахстан.

Авторами статьи проведена оптимизация молекулярно-генетических способов детекции носителей синдромов *Developmental Duplications*, *Arthrogriposis multiplex*, определена распространенность указанных аномалий у ангусской, герефордской, казахской белоголовой, аулиекольской, калмыцкой пород ($n=37$). На основании детального анализа последовательностей генов *NHLRC2*, для диагностики носителей *Developmental Duplications* был использован метод ПЦР-ПДРФ анализа, идентификация точечной мутации *g.34618072 T>C* в 5 экзонной части гена *NHLRC2* была осуществлена с помощью эндонуклеазы *MwoI*. С целью совершенствования способа диагностики генетической аномалии *Developmental Duplications* был разработан метод Реал Тайм ПЦР диагностики, который позволяет в течение 2 часов определить гетерозиготных носителей мутации *g.34618072 T>C* в 5 экзонной части гена *NHLRC2*. Известно, что синдром *Arthrogriposis multiplex* появился вследствие обширной делеции, которая охватила кодирующие участки трех генов – *ISG15*, *HES4*, *AGRN* – длиной 38 000 п.н. Были подобраны последовательности одного общего прямого праймера и двух обратных праймеров, идентифицирующих мутантные и дикие типы аллелей генов *ISG15*, *HES4*, *AGRN*. По результатам генотипирования частота встречаемости генетической аномалии *Developmental duplication* у ангусской породы составила 12,5%, синдрома *Arthrogriposis multiplex* у герефордской породы – 11,1%.

Ключевые слова: наследственные аномалии *Developmental Duplications*, *Arthrogriposis multiplex*, гены *NHLRC2*, *ISG15*, *HES4*, *AGRN*, делеция, ПЦР-ПДРФ, Реал-Тайм ПЦР, генетический скрининг.

ІРІ ҚАРА МАЛЫНДА DEVELOPMENTAL DUPLICATIONS, ARTHROGRIPOSIS MULTIPLEX СИНДРОМДАРЫНЫҢ ТАСЫМАЛДАУШЫЛАРЫН ПТР-РФҰП ТАЛДАУ ЖӘНЕ РЕАЛ-ТАЙМ ПТР ӘДІСТЕРІМЕН БАЛАУДЫҢ ТИІМДІЛІГІ

Дюсекенова Н.Т. – ветеринария ғылымдарының магистрі, «Клиникалық пәндер» кафедрасы, «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КЕАҚ, Алматы қ., Қазақстан Республикасы.

Турғумбеков А.А. – PhD докторы, «Клиникалық пәндер» кафедрасы аға оқытушысы, «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КЕАҚ, Алматы қ., Қазақстан Республикасы.

Хусаинов Д.М. – ветеринария ғылымдарының кандидаты, «Биологиялық қауіпсіздік» кафедрасының профессоры, «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КЕАҚ, Алматы қ., Қазақстан Республикасы.

Усенбеков Е.С.* – биология ғылымдарының кандидаты, «Клиникалық пәндер» кафедрасының профессоры, «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КЕАҚ, Алматы қ., Қазақстан Республикасы.

Мақала авторлары *Developmental Duplications*, *Arthrogriposis multiplex*, синдромының тасымалдаушыларын анықтаудың молекулалық-генетикалық әдістерін оңтайландырып, бұл аномалиялардың ангус, герефорд, қазақтың ақбас, әулікөл және қалмақ тұқымдарында ($n=37$) таралуын анықтады. *NHLRC2* генінің тізбегін егжей-тегжейлі талдау негізінде *Developmental Duplications* тасымалдаушыларын балау үшін ПТР-РФҰП талдау әдісі қолданылды; *NHLRC2* генінің 5-ші экзондық бөлігіндегі *g.34618072 T>C* нүктелік мутацияның идентификациясы *MwoI* эндонуклеазасы көмегімен жүзеге асырылды. *Developmental Duplications* генетикалық ақауының балау әдісін жетілдіру мақсатында *NHLRC2* генінің 5 экзондық бөлігінде *g.34618072 T>C* мутациясының гетерозиготалы

тасымалдаушыларын 2 сағат ішінде анықтауға мүмкіндік беретін Real Time ПТР балау әдісі әзірленді. Белгілі болғандай, Arthrogriposis multiplex синдромы, ұзындығы 38 000 ж.н. болатын үш геннің ISG15, HES4, AGRN кодтау аймақтарын қамтитын үлкен делеция нәтижесінде пайда болды. ISG15, HES4 және AGRN гендерінің мутантты және жабайы типті аллельдерін анықтау үшін бір жалпы тура праймер және екі кері праймер тізбегі таңдалды. Генотиптеу нәтижелері бойынша Developmental Duplications генетикалық аномалияның, жиілігі Ангус тұқымында 12,5%, герефорд тұқымында Arthrogriposis multiplex генетикалық ақауының жиілігі 11,1% құрады.

Түйінді сөздер: Developmental Duplications, Arthrogriposis multiplex тұқым қуалайтын кемтарлықтары, NHLRC2, ISG15, HES4, AGRN гендері, делеция, ПТР-РФҰП, Реал-Тайм ПТР, генетикалық скрининг.

EFFICIENCY OF USING PCR-RFLP ANALYSIS AND REAL-TIME PCR FOR DIAGNOSTICS OF DEVELOPMENTAL DUPLICATIONS, ARTHROGRIPOSIS MULTIPLEX SYNDROMES CARRIERS IN CATTLE

Dyussekenova N.T. – Master of Veterinary Sciences, Department of clinical disciplines, Kazakh National Agrarian Research University NJSC, Almaty, Republic of Kazakhstan.

Turgumbekov A.A. – PhD, Senior Lecturer of the Department of clinical disciplines, Kazakh National Agrarian Research University NJSC, Almaty, Republic of Kazakhstan.

Khussainov D.M. – Candidate of Veterinary Sciences, Department of biological safety, Kazakh National Agrarian Research University NJSC, Almaty, Republic of Kazakhstan.

Ussenbekov Y.S.* – Candidate of Biological Sciences, Professor of the Department of clinical disciplines, Kazakh National Agrarian Research University NJSC, Almaty, Republic of Kazakhstan.

The authors of the article optimized the molecular genetic methods for detecting carriers of Developmental Duplications, Arthrogriposis multiplex syndromes, determined the prevalence of the specified anomalies in the Angus, Hereford, Kazakh White-Headed, Auliekol, Kalmyk breeds ($n = 37$). Based on a detailed analysis of the NHLRC2 gene sequences, the PCR-RFLP analysis method was used to diagnose carriers of Developmental Duplications, the point mutation g.34618072 T> C in the 5th exon part of the NHLRC2 gene was identified using MwoI endonuclease. In order to improve the method for diagnosing the genetic anomaly Developmental Duplications, the Real Time PCR diagnostics method was developed, which allows for the determination of heterozygous carriers of the mutation g.34618072 T> C in the 5th exon part of the NHLRC2 gene within 2 hours. It is known that the syndrome – Arthrogriposis multiplex appeared as a result of an extensive deletion that covered the coding regions of three genes, ISG15, HES4, AGRN with a length of 38,000 bp. The sequences of one common forward primer and two reverse primers identifying mutant and wild types of alleles of the genes ISG15, HES4, AGRN were selected. According to the results of genotyping, the frequency of occurrence of the genetic anomaly Developmental duplication in the Angus breed was 12,5%, the syndrome Arthrogriposis multiplex in the Hereford breed was 11,1%.

Key words: hereditary anomalies Developmental Duplications, Arthrogriposis multiplex, genes NHLRC2, ISG15, HES4, AGRN, deletion, PCR-RFLP, Real-Time PCR, genetic screening.

Введение. В нашей стране ежегодно увеличивается поголовье крупного рогатого скота, в том числе поголовье животных мясного направления продуктивности: ангус, герефорд, аулиекольская, калмыцкая, казахская белоголовая порода. По данным зарубежных ученых, в настоящее время у крупного рогатого скота мясных пород встречаются следующие наследственные аномалии: арахномелия, синдактилия, остеопетроз, карликовость, синдром кривого хвоста, мышечная гиперплазия, болезнь накопления гликогена, протопорфирия, которые наносят ощутимый экономический ущерб [1, с. 461-471].

Известно, что своевременная диагностика летальных и сублетальных рецессивных мутаций особенно важна, когда идет интенсивный обмен генетическими материалами между странами, искусственное осеменение коров спермой зарубежных быков, импорт живого скота, пересадка эмбрионов. По результатам исследований ученых, встречаемость носителей мутации генетического дефекта множественного артрогрипоза (Arthrogriposis multiplex, AM) у коров ангусской породы составила 2,38%, у быков производителей – в пределах от 1,67% до 0,19 %, аутосомального дефекта Developmental duplication (DD) у коров – от 0,65% до 0,07%, у быков – в пределах от 0,90% до 0,10% [2, с. 678].

Интенсивная селекция, которая используется в мясном скотоводстве сопровождается снижением воспроизводства, изменением эффективности и качества мясного производства. Нарушения скелета, такие как синдактилия, арахномелия, остеопетроз, часто приводят к снижению продуктивности животных [3, с. 1-6; 4, с. 1-12]. Различные формы карликовости приводят к абортам или смерти приплода после рождения, часто телята рождаются со сниженным иммунитетом [5, с. 1-10; 6, с. 535-549].

Кроме того, такие наследственные аномалии мясного крупного рогатого скота, как мышечная гиперплазия, синдром кривого хвоста желательны для селекционеров из-за увеличения мышечной массы, но к сожалению, они связаны, например, с низкими показателями репродукции: слабая костная

система, недостаточность органов или нарушения нервной системы, которые могут привести к снижению численности животных в стаде [7, с. 1-7].

Известно, что синдром Arthrogriposis multiplex в основном встречается у крупного рогатого скота ангусской породы. Причина болезни – обширная делеция (38 000 п.о.) участка ДНК, охватывающего два различных гена. Результатом указанной делеции является отсутствие продуцируемого белка. Главными клиническими симптомами болезни являются пониженный мышечный тонус, скрученные задние ноги с анкилозными суставами. Иногда наблюдаются абдоминальные грыжи и дефекты черепа [7, с. 1-7; 8, с. 24-33; 9, с. 426-429; 10, с. 409-416].

По результатам генетического скрининга, поголовья ангусской породы в России встречаемость гетерозиготных носителей DD составила 0,9-12,8%, В США в период с 2017 по 2018 годы распространенность носителей DD достигла до 20%. В связи с высокой частотой встречаемости мутантного аллеля гена NHLRC2, обуславливающего проявление клинических случаев DD, существует риск увеличения встречаемости данной аномалии на территории Республики Казахстан. Известно место локализации точечной мутации в позиции 932 T→C в составе гена NHLRC2, который расположен на 26 хромосоме [11, с. 20-24].

По сведениям Американских ученых, у абердин-ангусской породы крупного рогатого скота наблюдается появление ряда генетических аномалий, среди которых множественный артрогрипоз (AM), остеопетроз (OC), дупликация развития (ДД) и двойная мускулатура (М1). Следует отметить, что AM и OC являются летальными генетическими дефектами, приводящими к гибели телят, а ДД и М1 – нелетальными, но нежелательными состояниями. Детальный анализ причин возникновения множественного артрогрипоза (AM), показывает, что генетический дефект появился в результате делеции в составе трех генов ubiquitin-like modifier (ISG15), 5' фланкирующей части гена hairy and enhancer split 4 (HES4), две делеции в составе второго экзона agrin gene (AGRN) [12, с. 394-401].

Дупликация развития (DD) – моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное неполной пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью гена NHLRC2 у абердин-ангусской породы. Первыми носителями мутантного аллеля считают родившихся в 1977 г. потомков быка US AI sire, Ken Caryl Mr Angus 8017. В Австралии почти все выявленные животные, скрытые носители наследственного дефекта дупликации развития, являются потомками быка US Angus, B/R New Design 036. Спорадические случаи полимелии были зарегистрированы и у других пород, включая Bos indicus, но пока неизвестно, являются ли эти случаи результатом одной и той же мутации [13, с. 1-3; 14, с. 202-206; 15, с. 1-13].

Учеными с помощью программы Primer 3 осуществлен дизайн праймеров для амплификации гена NHLRC2 длиной 199 п.н. Анализ нуклеотидной последовательности гена NHLRC2 проведен с помощью Ensembl в форматах FASTA. Для анализа рестрикционных фрагментов была использована 1 ед. эндонуклеазы HpyF10VI. На электрофореграмме у здоровых гомозиготных животных был обнаружен фрагмент размером 199 п.н., у гетерозиготных носителей дефекта DDC фрагменты 107 п.н. и 92 п.н. [16, с. 102-107].

В настоящее время хорошо изучены только 138 летальных и сублетальных мутаций, что составляет 27,3% от общего их количества. Согласно Положению о порядке проведения молекулярной генетической экспертизы племенной продукции государств – членов Евразийского экономического союза (№ 74 от 02.06.2020 г.), рекомендовано проводить исследование биологического материала животных на выявление генетически детерминированных заболеваний. Однако, в настоящее время в Республике Казахстан нет ограничения на ввоз племенного материала (замороженная сперма, замороженные эмбрионы), живого скота, в частности в отношении носителей наследственных аномалий [17, с. 42-42].

Цель настоящего исследования – оптимизация существующих ПЦР, ПЦР-ПДРФ способов диагностики Developmental duplications, Arthrogriposis Multiplex и разработка Реал Тайм ПЦР метода диагностики синдрома Developmental duplications.

Задачи: сбор образцов спермы быков производителей, выделение ДНК из образцов спермы, оценка качества изолированной ДНК, анализ последовательностей генов NHLRC26, ISG15, HES4, AGRN, определение места локализации точечной мутации и делеции, дизайн праймеров, проведение генотипирования образцов ДНК на генетические дефекты Developmental Duplications, Arthrogriposis multiplex и выявление гетерозиготных носителей мутации.

Материалы и методы исследований. В качестве материала для исследования были использованы 37 образцов криоконсервированной спермы быков производителей. Выделение ДНК из спермы проводилось в лаборатории «Зеленой биотехнологии и клеточной инженерии» Казахстанско-Японского инновационного центра Казахского национального аграрного исследовательского университета с помощью коммерческого набора. Для идентификации гетерозиготных носителей мутации синдрома Developmental Duplications были использованы способы: ПТР-ПДРФ анализ и Реал Тайм ПЦР. Для генотипирования образцов ДНК по локусу гена NHLRC2 были использованы следующие праймеры: F-5-AGAGGCATGATGAAGGCGAG-3' и R-5'- CCAAGGGGAACATAATGGGCT- 3', которые описаны в работах авторов [10, с. 409-416; 11, с. 20-24]. Также, амплификация участка гена NHLRC2 проводилась с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени на амплификаторе Real Time Step One

Plus с использованием двух пар праймеров: F -5' – ACCTGTATTAATTTCTATAGATTGACCTAGAAGCT-3', R – 5' – CTCCACCTTCTTTATCTGTACCTTGA- 3'. меченые зонды: F – 5' – FAM – CAGTGCTCGCCATCT – 3', F – 5' – VIC – ACAGTGCTCACCATCT- 3'.

Результаты исследования. ДНК паспортизация племенных быков производителей казахской белоголовой, ангусской, герефордской, аулиекольской, калмыцкой пород в количестве 37 образцов проводилась тремя способами, по локусу гена: NHLRC2 методом ПЦР-ПДРФ анализа и Реал Тайм ПЦР, по локусу генов ISG15, HES4, AGRN методом ПЦР. Подбор последовательностей для Реал Тайм ПЦР был осуществлен компанией Applied Biosystems на основании полученных результатов определения места локализации точечной мутации в кодирующей части гена NHLRC2, определена природа возникновения генетических дефектов и установлено, что Arthrogriposis multiplex возник в результате делеции, Developmental Duplications возникла в результате точечной мутации (таблица 1). Условия проведения ПЦР по локусу гена NHLRC2, первоначальная денатурация – 3 мин. при 95°C, количество циклов – 35, первый шаг – 94°C, 45 сек., отжиг праймеров – 61°C, 30 сек. и элонгация – 72°C, 40 сек., заключительный синтез – 72°C, 4 мин. Условия проведения ПЦР по локусу генов ISG15, HES4, AGRN, первоначальная денатурация – 3 мин. при 95°C, количество циклов – 37, первый шаг – 95°C, 45 сек., отжиг праймеров – 58°C, 30 сек. и элонгация – 72°C, 30 сек., заключительный синтез – 72°C, 7 мин.

Таблица 1 – Название генетических дефектов и их генетическая природа, место локализации точечной мутации

Характеристики	Название генетических дефектов	
	Developmental Duplications	Arthrogriposis multiplex
Название и локализация гена	NHLRC26, 26 хромосома	ISG15, HES4, AGRN, 16 хромосома
Дефект появился в результате	точечной мутации	делеции в части генов ISG15, HES4, AGRN
Участок гена, где локализована мутация (NHLRC2, MOCS1)	TAGAAGCTGAGATGG[T → C]GAGCACTGTG [20]	AAATGGCAACCCACTCCAGTGTTCT TGCCTGCAGAA Делеция длиной 38 000 п.н. [9]
Позиция локализации точечной мутации	g.34618072 T > C в 5 экзонной части гена	Делеция в кодирующей части 3 генов, длиной 38 000 п.н.
Размер ПЦР продукта	404 п.н.	357 п.н., 242 п.н.

Результаты амплификации проверяли с помощью горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле. Визуализацию результатов амплификации проводили с помощью гель документирующей системы (VilberLourmat, United States). Наличие фрагментов на электрофореграмме размером 404 п.н. свидетельствует об успешной амплификации участка гена NHLRC2 (рис. 1, лунки 1-6, 8-14), где лунка 7 – отрицательный контроль.

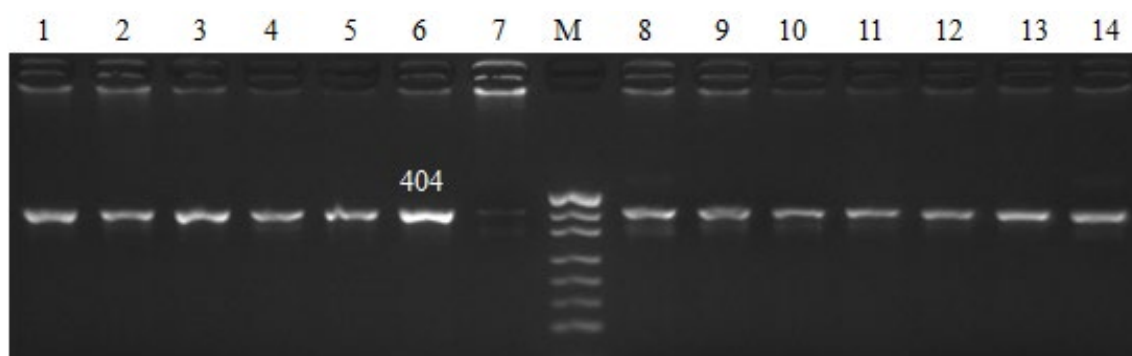


Рисунок 1 – Электрофореграмма амплификата гена NHLRC2, 3% агароза, лунки 1-7, 8-14 ПЦР продукт, длина 404 п.н., М-ДНК маркер pUC19/MspI

Нами для выявления носителей синдрома Developmental Duplications была использована рестриктаза MwoI с сайтом рестрикции GCNNNNN↑NNGC, температура инкубации 37 °C, длительность инкубации 4-5 часов.

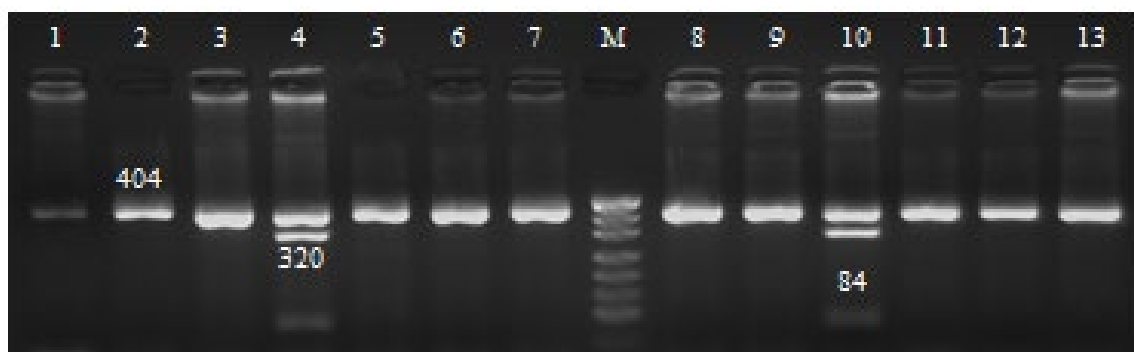


Рисунок 2 – Амплификат гена NHLRC2, после рестрикции эндонуклеазой MwoI, 3,0% агароза, лунки 1-3, 5-9, 11-13 гомозиготные здоровые, фрагмент 404 п.н., лунки 4, 10 гетерозиготные носители мутации DD, фрагменты 404 п.н., 320 п.н., 84 п.н., М-ДНК маркер pUC19/MspI

В настоящее время для диагностики носителей мутации Arthrogriposis multiplex (AM) используются следующие праймеры: общий прямой праймер F-5'-CGAAAGCCTTCTTTCCACTG-3' и обратные праймеры для мутантного и дикого типов аллелей R -5'- TTCTGCAGGCAAGAACACTG -3', R-5'-GAATGCCACTTCCCTCCTCTG -3', к II экзонной части гена AGRN, с температурой отжига 58°C [10, с 409-416]. Использование прямого праймера F-5'-CGAAAGCCTTCTTTCCACTG-3' и обратного общего праймера R-5'-GAATGCCACTTCCCTCCTCTG -3' позволяет амплифицировать фрагмент генов ISG15, HES4, AGRN длиной 357 п.н., который соответствует мутантному типу аллели, пара прямого праймера F-5'-CGAAAGCCTTCTTTCCACTG-3' и обратного праймера R -5'- TTCTGCAGGCAAGAACACTG -3' позволяет амплифицировать участок гена, размером 242 п.н., который соответствует мутантному типу аллели генов ISG15, HES4, AGRN. Применение общего прямого праймера и двух обратных праймеров позволяет идентифицировать гетерозиготных носителей мутации Arthrogriposis multiplex (рис 3).

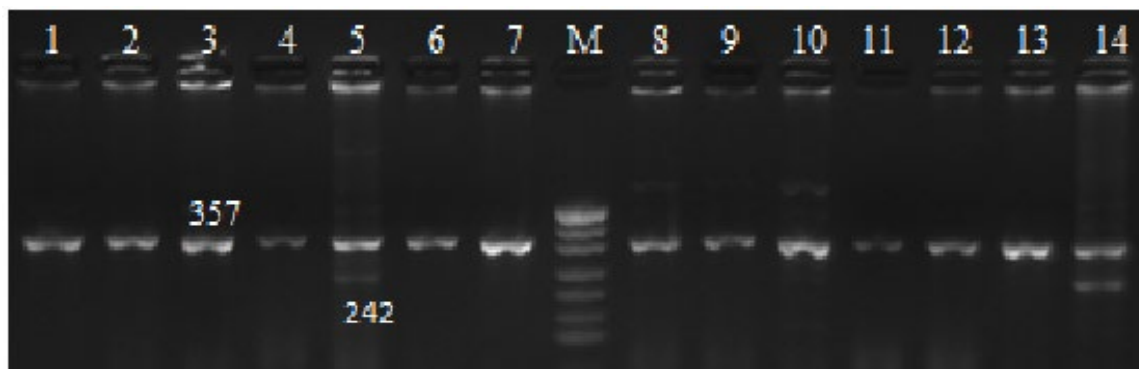


Рисунок 3 – Амплификат генов ISG15, HES4, AGRN, 3% агароза, лунки 1-4, 6-7, 8-13 ПЦР продукт, длина 357 п.н., гомозиготные здоровые животные, лунки 5,14, фрагменты 357 п.н., 242 п.н., гетерозиготные носители мутации Arthrogriposis multiplex, М-ДНК маркер pUC19/MspI

Методом Реал Тайм ПЦР были протестированы 37 образцов ДНК казахской, белоголовой, герефордской, ангусской, аулиекольской, калмыцкой пород. Аллельное распознавание было осуществлено путем анализа графиков аллельной дискриминации в режиме реального времени. Теоретически, зонды VIC типа будут комплементарны только дикому типу и формируют стандартный график аллельной дискриминации, в то время как FAM зонды комплементарны только мутантным аллелям и формируют собой график характерной аллельной дискриминации. Таким образом, генотип может быть точно определен посредством сравнения графиков аллельной дискриминации (Рисунок 4).

Таблица 2 – Распространенность гетерозиготных носителей синдромов Developmental duplication и Arthrogriposis multiplex у быков производителей (n=37)

Название генетических дефектов, способ диагностики	Порода и количество животных				
	Казахская бело-головая (n=13)	Ангусская (n=8)	Герефорд (n=9)	Аулиекольская (n=5)	Калмыцкая (n=2)
Developmental duplication (DD), NHLRC2I, ПЦР-ПДРФ, Реал Тайм ПЦР					
wt/wt (генотип TT)	13	7/87,5%	0	5/100,0%	2/100,0%
wt/mt (генотип TC)	0	1/12,5%	0	0	0

Продолжение таблицы 2

mt/mt (генотип CC)	0	0	0	0	0
Arthrogriposis multiplex (AM), ПЦР диагностика					
wt/wt	13	0/100,0%	8/88,9%	5/100,0%	2/100,0%
wt/mt	0	0	1/11,1%	0	0
mt/mt	0	0	0	0	0

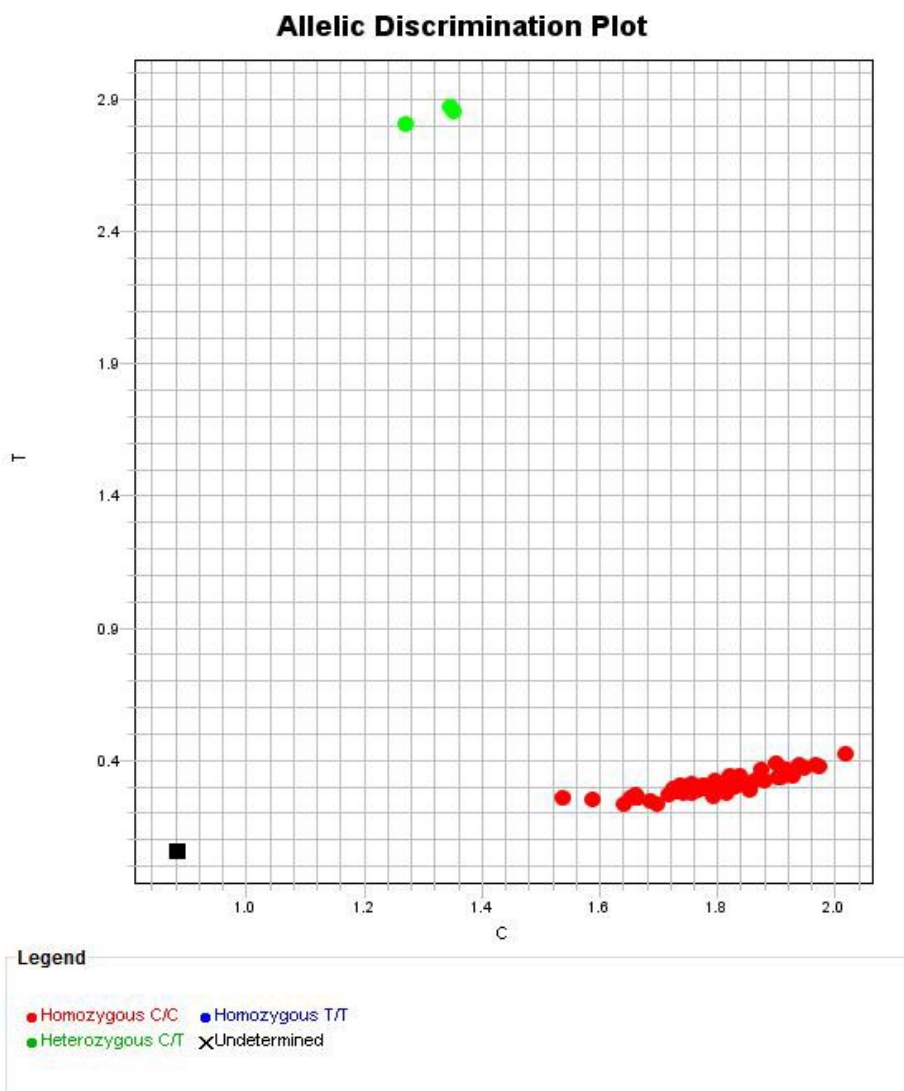


Рисунок 4 – График аллельной дискриминации, гетерозиготный носитель мутации NHLRC2 (амплификация с VIC зондом, дикий тип, аллель T, амплификация с FAM зондом, мутантный тип, аллель C)

Так, при Реал Тайм ПЦР диагностике гетерозиготных носителей синдрома Developmental Duplication (DD) у ангусской породы в результате амплификации участка гена NHLRC2 с мутантным аллелем (аллель C), олигонуклеотиды, меченые с FAM зондом, обеспечивают амплификацию мутантного аллеля и на графике аллельной дискриминации появляются точки флуоресценции с зондом FAM. Анализ полученного результата Реал Тайм ПЦР диагностики в формате аллельной дискриминации показывает, что на дисплее обнаруживаются изображение аллели гена NHLRC2 дикого типа C красного цвета, аллели мутантного типа T – голубого цвета (рис 4). Интерпретация результатов амплификации в формате кривых тоже позволяет идентифицировать гетерозиготных носителей синдрома Developmental Duplications, так как у гомозиготных здоровых особей идет более интенсивная амплификация с диким типом T аллели гена NHLRC2 (рисю 5), наоборот, у гетерозиготных образцов идет сильная амплификация с диким C типом аллели исследуемого гена. Таким образом, разработанная методика постановки Real Time PCR SNPs диагностики синдрома DD у крупного рогатого скота позволяет в

течение двух часов идентифицировать гетерозиготных носителей и значительно сокращает время для исследования образцов.

Обсуждение. Для идентификации носителей генетического дефекта Developmental Duplications (DD) был использован способ ПЦР-ПДРФ анализа. Размеры амплификата и фрагментов после рестрикции были 404 п.н., 320 п.н., 84 п.н., которые хорошо визуализируются в 3% агарозном геле. На основании анализа последовательности гена NHLRC2 было определено место локализации точечной мутации в кодирующей части гена NHLRC2, TAGAAGCTGAGATGG[T→C]GAGCACTGTG, где произошла замена нуклеотида Т на С. Результаты Реал Тайм ПЦР исследования анализировали в форматах – аллельной дискриминации и анализа полученных кривых. Оба способа позволяет с 100% точностью идентифицировать гетерозиготных носителей мутации в составе гена NHLRC2. Известно, что генетический дефект Arthrogriposis multiplex (AM) у крупного рогатого скота возник в результате обширной делеции размером 38 000 п.н. в экзонной части генов ISG15, HES4, AGRN, поэтому для детекции гетерозиготных носителей делеции был использован метод полимеразной цепной реакции с одним общим прямым праймером и двумя обратными праймерами, которые позволяют идентифицировать мутантные и дикие типы аллелей исследуемых генов, метод информативный и доступный.

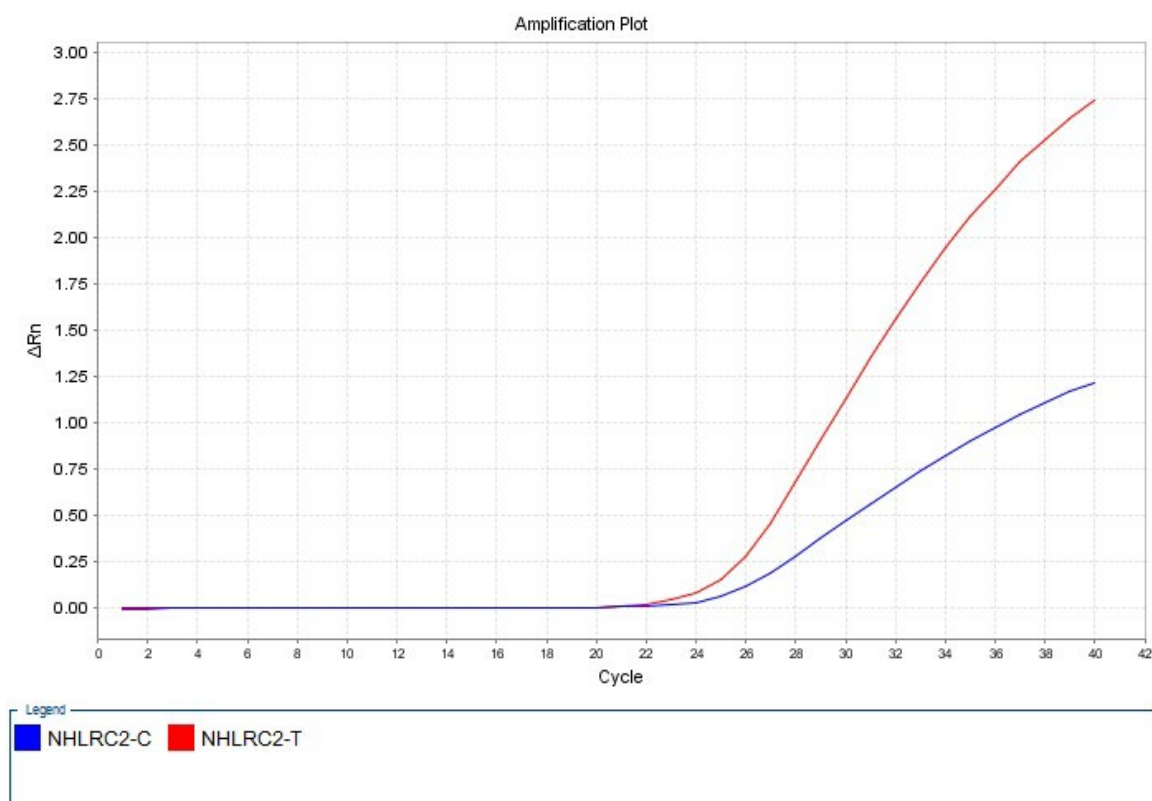


Рисунок 5 – Графическое изображение результатов Реал Тайм ПЦР диагностики, гетерозиготный носитель мутации NHLRC2 (амплификация с VIC зондом, дикий тип, аллель Т, амплификация с FAM зондом, мутантный тип, аллель С)

Анализ результатов генетического мониторинга показывает, как и ожидалось, поголовье местной казахской белоголовой породы оказалось свободными от носительства синдромов Developmental Duplications, Arthrogriposis Multiplex. Из 8 голов протестированных особей ангусской породы 1 бык-производитель оказался гетерозиготными носителями синдрома Developmental duplication, что составляет 12,5%, данный генетический дефект не был выявлен у скота герефордской породы. Распространенность генетического дефекта Arthrogriposis multiplex у герефордской породы – 11,1%. Анализ литературы свидетельствует, что у крупного рогатого скота ангусской породы Российской популяции встречаемость носителей мутации генетического дефекта множественного артрогрипоза (Arthrogriposis multiplex, AM) у коров была 2,38%, у быков производителей частота вредной мутации колебалась от 0,19 % до 1,67%, частота другого генетического дефекта Developmental duplication (DD) была более низкой и составила у коров от 0,07% до 0,65%, у быков – в пределах от 0,10% до 0,90% [2]. Однако, по данным зарубежных ученых, в 2013 году встречаемость генетического дефекта Developmental duplication у ангусской породы Австралии составила 15%, в период 2017-2019 годы распространенность данной скрытой вредной мутации у популяции ангусской породы США достигла 20% [11, с. 20-24; 13, с. 1-3]. В связи с высокой частотой встречаемости в мировой популяции ангусов мутантного аллеля гена

NHLRC2, обуславливающего генетический дефект дупликация развития, существует риск распространения данной патологии и среди абердин-ангусского скота Республики Казахстан и возникает необходимость проведения генетического скрининга популяции ангусской, герефордской, казахской белой породы на носительство генетических аномалий.

Выводы. Установлено, что генетический дефект Developmental Duplications, является следствием точечной мутации g.34618072 T > C в 5 экзонной части гена NHLRC2. Синдром Arthrogriposis multiplex возник в результате обширной делеции, которая охватила участки трех генов, ISG15, HES4, AGRN длиной 38 000 п.н. Для идентификации точечной мутации g.34618072 T>C в 5 экзонной части гена NHLRC2 нами был успешно использован метод полимеразной цепной реакции, распознавание мутантного и дикого типов аллелей было осуществлено с помощью рестриктазы MwoI. Молекулярно-генетическая диагностика носителей синдрома Arthrogriposis multiplex была обоснована в использовании трех праймеров, одного общего прямого праймера и двух обратных праймеров для мутантного и дикого типов аллелей генов ISG15, HES4, AGRN. Впервые для детекции носителей мутации генетического дефекта Developmental Duplications была успешно использована реакция Реал Тайм ПЦР, результаты которой были анализированы в двух форматах – аллельная дискриминация и анализ полученных кривых, которые позволяют точно определить гетерозиготных носителей мутации в части гена NHLRC2.

Финансирование. Данная работа была выполнена в рамках реализации проекта МНВО РК «Мониторинг племенных животных мясного направления продуктивности на носительство скрытых генетических аномалий», ИРН AP15473095.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Cieplach, A., Rutkowska K., Oprządek J., Poławska E. Genetic disorders in beef cattle: a review. [Text] / A. Cieplach, K. Rutkowska, J. Oprządek, E. Poławska // Genes Genomics. – 2017. – Vol. 39 (5). – pp. 461-471.
2. Konovalova, E., Romanenkova O., Kostyunina O., Gladyr E. The Molecular Bases Study of the Inherited Diseases for the Health Maintenance of the Beef Cattle [Text] / E. Konovalova, O. Romanenkova, O. Kostyunina, E. Gladyr // Genes. – 2021. – Vol.12. – pp. 678. <https://doi.org/10.3390/genes12050678>.
3. Drogemuller, J. Tetens S., Sigurdsson A., Gentile S., Testoni K., Lindblad-Toh T., Leeb Identification of the bovine Arachnomelia mutation by massively parallel sequencing implicates sulfite oxidase (SUOX) in bone development. [Text] / J. Drogemuller, S. Tetens, A. Sigurdsson, S. Gentile, K. Testoni, T. Lindblad-Toh // PLoS Genetics. – 2010. – 1-6 p, 6: e1001079.
4. Stark, Z., Savarirayan R. Osteopetrosis. [Text] / Z. Stark, R. Savarirayan / Orphanet J Rare Dis 4:5 – 2009. – 1-12 p.
5. Sartelet, A., Druet T., Michaux C., Fasquelle C., Géron S., Tamma N., Zhang Z., Coppieters W., Georges M., Charlier C. A splice site variant in the bovine RNF11 gene compromises growth and regulation of the inflammatory response. [Text] / A. Sartelet, T. Druet, C. Michaux, C. Fasquelle, S. Géron, N. Tamma, Z. Zhang, W. Coppieters, M. Georges, C. Charlier // PLoS Genet. – 2012. – 8:e1002581.
6. Whitlock, B.K., Kaiser L., Maxwell H.S. Heritable bovine fetal abnormalities. [Text] / B.K. Whitlock, L. Kaiser, H.S. Maxwell // Theriogenology. – 2008. – Vol.70. – pp.535-549.
7. Bouyer, C., Forestier L., Renand G., Oulmouden A. Deep intronic mutation and pseudo exon activation as a novel muscular hypertrophy modifier in cattle. [Text] / C. Bouyer, L. Forestier, G. Renand, A. Oulmouden // PLoS One. – 2014 9:e97399.
8. Gholap, P. N., Kale D. S., Sirothia A. R. Genetic Diseases in Cattle: a Review. [Text] / P. N. Gholap, D. S. Kale, A. R. Sirothia // Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences. – 2014, no. 2(2). – pp. 24-33.
9. Beever, J.E., Marron B.M. Screening for Arthrogryposis Multiplex in Bovines. U.S. [Text]: Patent 20110151440 A1, 2011.
10. Konovalova, E.N., Romanenkova O.S., Volkova V.V., Kostyunina O.V. DNA analysis of the Russian populations of Aberdeen Angus, Hereford and Belgian Blue cattle. [Text] / E.N. Konovalova, O.S. Romanenkova, V.V. Volkova, O.V. Kostyunina // Arch. Anim. Breed. – 2020. – Vol. 63. – pp.409-416. <https://doi.org/10.5194/aab-63-409-2020>.
11. Коновалова, Е. Н. ДНК-диагностика генетического дефекта дупликации (DD) у крупного рогатого скота абердин-ангусской породы [Текст] / Е. Н. Коновалова, О. В. Костюнина // Молочное и мясное скотоводство. – 2018. – № 4. – С. 20-24.
12. Windsor, P.A., Kessell, A.E., Finnie, J.W. Neurological diseases of ruminant livestock in Australia. V: Congenital neurogenetic disorders of cattle. [Text] / P.A. Windsor, A.E. Kessell, J.W. Finnie, // Aust. Vet. J. – 2011. – Vol. 89. – pp. 394-401.
13. Denholm, L. J., Martin, L. E. Polymelia (supernumerary limbs) in Angus calves [Text] / L. J. Denholm, L.E. Martin, // Flock and Herd case notes. – 2011. <http://www.flockandherd.net.au/cattle/reader/polymelia.html>.

14. Alam, M.R. Lee J.I., Lee H. B., et all A number of different congenital anomalies are known to occur in domestic cattle. [Text] / M.R. Alam, J.I. Lee, H. B. Lee //Veterinari Medicina. – 2007.– no 52 (5). – pp. 202-206.
15. Denholm, L. J., Martin, L. E. Developmental duplications in Angus calves. [Text] / L. J. Denholm, L. E. Martin, // Flock and Herd case notes. – 2013. <http://www.flockandherd.net.au/cattle/reader/developmental-duplication-angus.html>.
16. Романишко, Е. Л., Киреева А. И., Михайлова М. Е., Шейко Р. И. Выявление генетического дефекта дупликация развития (DD) в Белорусской популяции абердин-ангусского скота [Текст] / Е. Л.Романишко, А. И.Киреева, М. Е.Михайлова, Р. И. Шейко // Молекулярная и прикладная генетика. – 2022. – Т. 33.
17. Гладырь, Е.А., Коновалова Е.Н., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Генетические дефекты мясных пород крупного рогатого скота и стратегии их контроля [Текст]/ Е.А.Гладырь, Е.Н.Коновалова, О.В.Костюнина, Н.А. Зиновьева // Ветеринария и зоотехния: зоотехния. – 2017. – № 7. – С. 42-52.

REFERENCES:

1. A.Cieplach, K. Rutkowska, J. Oprządek, E.Poławska Genetic disorders in beef cattle: a review. *Genes Genomics*, 2017, vol. 39 (5), pp. 461-471.
2. E. Konovalova, O. Romanenkova, O. Kostyunina, E. Gladyr. The Molecular Bases Study of the Inherited Diseases for the Health Maintenance of the Beef Cattle. *Genes*, 2021, vol.12, pp. 678. <https://doi.org/10.3390/genes12050678>.
3. C. Drogemuller, J. Tetens, S. Sigurdsson et al. Identification of the bovine Arachnomelia mutation by massively parallel sequencing implicates sulfite oxidase (SUOX) in bone development. *PLoS Genetics*, 2010, pp. 1-6, 6:e1001079.
4. Stark Z., Savarirayan R. Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis*, 2009, 4:5, pp. 1-12.
5. Sartelet A., Druet T., Michaux C. Et al. A splice site variant in the bovine RNF11 gene compromises growth and regulation of the inflammatory response. *PLoS Genetics*, 2012, 8:e1002581.
6. Whitlock B.K., Kaiser L., Maxwell H.S. Heritable bovine fetal abnormalities. *Theriogenology*, 2008, vol.70, pp.535-549.
7. Bouyer C., Forestier L., Renand G., Oulmouden A. Deep intronic mutation and pseudo exon activation as a novel muscular hypertrophy modifier in cattle. *PLoS One*, 2014, 9:e97399.
8. Gholap P. N., Kale D. S., Sirothia A. R. Genetic Diseases in Cattle: a Review. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences*, 2014, no. 2(2), pp. 24-33.
9. Beever J.E., Marron B.M. Screening for Arthrogryposis Multiplex in Bovines. U.S. Patent 20110151440 A1, 2011.
10. E.N. Konovalova, O.S. Romanenkova, V.V. Volkova, O.V. Kostyunina. DNA analysis of the Russian populations of Aberdeen Angus, Hereford and Belgian Blue cattle. *Arch. Anim. Breed.*, 2020, vol. 63, pp.409-416. <https://doi.org/10.5194/aab-63-409-2020>.
11. Konovalova E.N., Kostyunina O.V. DNK-diagnostics geneticheskogo defekta duplikacii (DD) u krupnogo rogatogo skota aberdin-angusskoj porody' [DNA diagnostics of genetic duplication defect (DD) in Aberdeen Angus cattle]. *Molochnoe i myasnoe skotovodstvo*, 2018, no. 4, pp. 20-24. (In Russian)
12. Windsor P.A., Kessell A.E., Finnie J.W. Neurological diseases of ruminant livestock in Australia. V: Congenital neurogenetic disorders of cattle. *Aust. Vet. J*, 2011, vol. 89, pp. 394-401.
13. Denholm L.J., Martin L.E. Polymelia (supernumerary limbs) in Angus calves Flock and Herd case notes. 2011, available at: <http://www.flockandherd.net.au/cattle/reader/polymelia.html> (accessed 10 December 2024)
14. M.R. Alam, J.I. Lee, H.B. Lee, et all A number of different congenital anomalies are known to occur in domestic cattle. *Veterinari Medicina*, 2007, no 52 (5), pp. 202-206.
15. Denholm L.J., Martin L.E. Developmental duplications in Angus calves Flock and Herd case notes 2013, available at: <http://www.flockandherd.net.au/cattle/reader/developmental-duplication-angus.html> (23 November 2024).
16. Romanishko E.L., Kireeva A.I., Mihajlova M.E., Shejko R.I. Vy'yavlenie geneticheskogo defekta duplikaciy razvitiya (DD) v Belorusskoj populyacii aberdin-angusskogo skota [Detection of a developmental duplication (DD) genetic defect in the Belarusian population of Aberdeen Angus cattle]. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*, 2022, vol. 33. (In Russian).
17. Gladyr E.A., Konovalova E.N., Kostyunina O.V., Zinoveva N.A. Geneticheskie defekty' myasny'h porod krupnogo rogatogo skota i strategii ih kontrolya [Genetic defects of beef cattle breeds and strategies for their control]. *Veterinariya i zootehniya: zootehniya*, 2017, no. 7, pp. 42-52. (In Russian).

Сведения об авторах:

Дюсекенова Нурсауле Тугелбаевна – магистр ветеринарных наук, кафедра «Клинические дисциплины», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», Республика Казахстан, 0040444, Алматинская область Енбекшиказахский район, пос. Байдибек би, ул. Акбуюмова 2, кв. 6, тел.: +7-701-407-25-57, e-mail: nursaule796@yandex.ru.

Тургумбеков Асет Абдымаратович – PhD доктор, старший преподаватель, кафедра «Клинические дисциплины», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», Республика Казахстан, 041615, Алматинская область, Талгарский район, с. Аркабай, ул. Бухар Жырау 5 а, тел.: +7-707-292-15-50, e-mail: aset_turgumbekov83@mail.ru.

Хусаинов Дамир Микдатович – кандидат ветеринарных наук, профессор, кафедра «Биологическая безопасность», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», Республика Казахстан, 050061, г. Алматы, ул. Текелийская 42, тел.: +7-707-729-01-85, e-mail: doctor-vet@mail.ru.

Усенбеков Есенгали Серикович* – кандидат биологических наук, профессор, кафедра «Клинические дисциплины», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», Республика Казахстан, 050006, г. Алматы, микрорайон Калкаман 2, ул. Абилова 21, тел.: +7-705-916-02-72, e-mail: yessengali.ussembekov@kaznaru.edu.kz.

Дюсекенова Нурсауле Тугелбаевна – ветеринария ғылымдарының магистрі, «Клиникалық пәндер» кафедрасы, «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КЕАҚ, Қазақстан Республикасы, 040444, Алматы облысы, Еңбекшіқазақ ауданы, Байдибек Би ауылы, Акбуюмов көш, 2, 6-шы пәтер тел.:+7-701-407-25-57; e-mail: nursaule796@yandex.ru.

Тургумбеков Асет Абдымаратович – PhD докторы, аға оқытушы, «Клиникалық пәндер» кафедрасы, «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КЕАҚ, Қазақстан Республикасы, 041615, Алматы облысы, Талғар ауданы, Аркабай ауылы, Бухар Жырау көш, 5а тел.:+7-707-292-15-50; e-mail: aset_turgumbekov83@mail.ru.

Хусаинов Дамир Медкатович – ветеринария ғылымдарының кандидаты, профессор, «Биологиялық қауіпсіздік» кафедрасы, «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КЕАҚ, Қазақстан Республикасы, 050061, Алматы қ, Текелі көш, 42. тел.:+7-707-729-01-85; e-mail: doctor-vet@mail.ru.

Усенбеков Есенгали Серикович* – биология ғылымдарының кандидаты, профессор «Клиникалық пәндер» кафедрасы, «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КЕАҚ, Қазақстан Республикасы, 050006, Алматы қ, Калкаман 2 ш/а, Абилов көш. 21 тел.:+7-705-916-02-72; e-mail: yessengali.ussembekov@kaznaru.edu.kz.

Dyussekenova Nursaule Tugelbayevna – Master of Veterinary Sciences, Department of clinical disciplines, Kazakh National Agrarian Research University NJSC, Republic of Kazakhstan, 0040444, Almaty region, Yenbekshikazakh district, Baidibek bi village, Akbuyumov Str. 2, apt.6, tel.: +7-701-407-25-57; e-mail: nursaule796@yandex.ru.

Turgumbekov Asset Abdymaratovich – PhD, Senior Lecturer of the Department of clinical disciplines, Kazakh National Agrarian Research University NJSC, Republic of Kazakhstan, 041615, Almaty region, Talgar district, Arkabay village, 5a Bukhar Zhyrau Str., tel.: +7-707-292-15-50; e-mail: aset_turgumbekov83@mail.ru.

Khussainov Damir Mekdatovich – Candidate of Veterinary Sciences, Department of biological safety, Kazakh National Agrarian Research University NJSC, Republic of Kazakhstan, 050061, Almaty, 42 Tekeliyskaya Str., tel.:+7-707-729-01-85; e-mail: doctor-vet@mail.ru.

Ussenbekov Yessengali Serikovich* – Candidate of Biological Sciences, Head of the Department of clinical disciplines, Kazakh National Agrarian Research University NJSC, Republic of Kazakhstan, 050026, Almaty, 2 Kalkaman microdistrict, 21 Abilov Str., tel.:+7-705-916-02-72; e-mail: yessengali.ussembekov@kaznaru.edu.kz.

МРНТИ 68.41.29

УДК 619:616.367-002:636.7

<https://doi.org/10.52269/RWEP252137>

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВОСПАЛЕНИЯ ЖЕЛЧНОГО ПУЗЫРЯ У СОБАК
В УСЛОВИЯХ УРБАНИЗИРОВАННОЙ СРЕДЫ (НА ПРИМЕРЕ Г. КОСТАНАЙ)**

Жабыкпаева А.Г.* – PhD, старший преподаватель кафедры ветеринарной медицины, факультет сельскохозяйственных наук, НАО «Костанайский региональный университет имени Ахмет Байтұрсынұлы», Республика Казахстан.