

010078, Ақмола облысы, Қосшы қ., тел. 87023102555, mirzhan_82@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1031-3564>.

Естанов Аскар Кабешович – ауыл шаруашылығы ғылымдарының кандидаты, «Республикалық мал шаруашылығын асылдандыру орталығы «Асыл түлік» Акционерлік қоғамы, 010078, Ақмола облысы, Қосшы қ., тел. 87072056862, easkar1962@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6104-70>.

Tszyu Yelena* – Master of Veterinary Sciences, Joint Stock Company "Republican Center for breeding in animal husbandry "Asyl tulik", 010078, Akmola region, Kosshy, mob. 87056375959, yelenatszyu@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1639-0253>.

Urazgalieva Akyl – Master of Agricultural Sciences, 010000, Astana c., mob. 87775643387, uraz_97@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8051-0905>.

Mustafin Mirzhan – Master of Agricultural Sciences, Joint Stock Company "Republican Center for breeding in animal husbandry "Asyl tulik", 010078, Akmola region, Kosshy, mob. 87023102555, mirzhan_82@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1031-3564>.

Estanov Askar – Candidate of Agricultural Sciences, Joint Stock Company "Republican Center for breeding in animal husbandry "Asyl tulik", 010078, Akmola region, Kosshy, mob. 87072056862, easkar1962@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6104-70>.

УДК 636.52/58:575.174

МРНТИ 68.41.57

DOI: 10.52269/22266070_2023_1_228

ОПТИМИЗАЦИЯ TETRA-PRIMER ARMS-PCR СПОСОБА ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА СУБФЕРТИЛЬНОСТИ У БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Шорманова М.М*. – магистр ветеринарных наук, докторант НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы.

Нурпеисова Р.К. – магистр ветеринарных наук, докторант НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы.

Махмұтов А.К. – кандидат ветеринарных наук, заведующий кафедрой «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы.

Усенбеков Е.С. – кандидат биологических наук, профессор кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства», НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы.

Авторами работы были оптимизированы условия проведения TETRA-PRIMER ARMS-PCR реакции для детекции носителей синдрома субфертильности у быков-производителей разных пород зарубежной и отечественной селекции. Экспериментальным путем определена оптимальная концентрация прямого и обратного внешних и внутренних праймеров в количестве 1,0 мкл каждого праймера с конечным объемом реакционной смеси 25,0 мкл. Эффективным был следующий температурный режим: первоначальная денатурация при 95 °С -5 мин, на первом этапе амплификации количество циклов 17, денатурация при 94 °С – 30 сек, отжиг праймеров при 68°С-30 сек, со снижением температуры на 1°С за каждый цикл, элонгация при 72 °С – 30 сек, следующие 30 циклов денатурация при 94 °С – 30 сек, отжиг праймеров при 51 °С – 30 сек и элонгация при 72°С -30 сек, заключительный синтез при 72°С -5 мин. Установлено, что изменение концентрации магния хлорида существенно не влияет на результативность процесса амплификации гена TMEM95. Таким образом, оптимизированным TETRA-PRIMER ARMS-PCR способом были протестированы всего 223 племенных быков-производителей из трех племенных центров Республики Казахстан, выявлен один гетерозиготный носитель синдрома субфертильности, бык-производитель симметальской породы зарубежной селекции, встречаемость исследуемого генетического дефекта у быков-производителей была низкой и составила 0,44%.

Ключевые слова: ДНК тестирование быков производителей, ген TMEM95, синдром субфертильности, TETRA-PRIMER ARMS-PCR реакция, программа Primer 1, дизайн праймеров.

OPTIMIZATION OF THE TETRA-PRIMER ARMS-PCR METHOD FOR DIAGNOSING SUBFERTILITY SYNDROME IN BULLS

Shormanova M.M*. – master of veterinary sciences, Doctoral student of the Department of Obstetrics, Surgery and Biotechnology of Reproduction, NJSC Kazakh National Agrarian Research University, Almaty.

Nurpeissova R.K. – master of Veterinary Sciences, Doctoral student of the Department of Obstetrics, Surgery and Biotechnology of Reproduction, NJSC Kazakh National Agrarian Research University, Almaty.

Makhmutov A.K. – Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Department of Obstetrics, Surgery and Biotechnology of Reproduction, NJSC Kazakh National Agrarian Research University, Almaty.

Ussenbekov Y.S. – Candidate of Biological Sciences, Professor of the Department of Obstetrics, Surgery and Biotechnology of Reproduction, NJSC Kazakh National Agrarian Research University, Almaty.

The authors of the work optimized the conditions for conducting the TETRA-PRIMER ARMS-PCR reaction for the detection of carriers of the subfertility syndrome in bulls of different breeds of foreign and domestic selection. Experimentally determined the optimal concentration of forward and reverse external and internal primers in the amount of 1,0 µl of each primer with a final volume of the reaction mixture of 25,0 µl. The following temperature regime was effective: initial denaturation at 95 °C – 5 min, at the first stage of amplification, the number of cycles was 17, denaturation at 94 °C – 30 sec, primer annealing at 68 °C – 30 sec, with a decrease in temperature by 1 °C for each cycle, elongation at 72°C – 30 sec, next 30 cycles denaturation at 94°C – 30 sec, primer annealing at 51°C – 30 sec and elongation at 72°C – 30 sec, final synthesis at 72°C -5 minutes. It has been established that a change in the concentration of magnesium chloride does not significantly affect the effectiveness of the TMEM95 gene amplification process. Thus, using the optimized TETRA-PRIMER ARMS-PCR method, only 223 breeding bulls from three breeding centers of the Republic of Kazakhstan were tested, one heterozygous carrier of the subfertility syndrome was identified, a sire of the Simmental breed of foreign selection, the occurrence of the studied genetic defect in sires was low and amounted to 0.44%.

Key words: DNA testing of bulls, TMEM95 gene, subfertility syndrome, TETRA-PRIMER ARMS-PCR reaction, Primer 1 program, primer design.

АТАЛЫҚ БҰҚАЛАРДА СУБФЕРТИЛДІЛІК СИНДРОМЫН БАЛАУҒА TETRA-PRIMER ARMS-PCR ӘДІСІН ОҒТАЙЛАНДЫРУ

Шорманова М.М. – ветеринария ғылымдарының магистрі, КЕАҚ «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университетінің «Акушерлік, хирургия және өсіп өну биотехнологиясы» кафедрасы, Алматы қ.*

Нурпеисова Р.К. – ветеринария ғылымдарының магистрі, КЕАҚ «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университетінің «Акушерлік, хирургия және өсіп өну биотехнологиясы» кафедрасы, Алматы қ.

Махмутов А.К. – ветеринария ғылымдарының кандидаты, КЕАҚ «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университетінің «Акушерлік, хирургия және өсіп өну биотехнологиясы» кафедрасының меңгерушісі, Алматы қ.

Усенбеков Е.С. – биология ғылымдарының кандидаты, КЕАҚ «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университетінің «Акушерлік, хирургия және өсіп өну биотехнологиясы» кафедрасының профессоры, Алматы қ.

Жұмыстың авторлары шетелдік және отандық селекцияның әртүрлі тұқымындағы аталық бұқалардағы субфертильдік синдром тасымалдаушыларын анықтау үшін Tetra-PRIMER ARMS-PCR реакциясының жүргізу шарттарын оңтайландырған. Реакциялық қоспаның соңғы көлемі 25,0 мкл болғанда, тура және кері сыртқы және ішкі праймерлердің оңтайлы концентрациясы эксперименталды түрде анықталған және ол әрбір праймерлер көлемі 1,0 мкл мөлшерінде болған. Келесідей температуралық режим тиімді болды: алғашқы денатурация 95°C – 5 мин, амплификацияның бірінші кезеңінде циклдар саны 17, денатурация 94°C -30 сек, праймерлердің жабысуы 68°C – 30 сек, әр цикл ішінде температура 1°C төмендеген, элонгация 72 °C – 30 сек, келесі денатурация 94 °C – 30 сек циклдар саны 30, праймерлердің жабысуы 51 °C – 30 сек және элонгация 72°C -30 сек, аяқтаушы синтез 72°C -5 мин. Магний хлориді концентрациясының өзгеруі TMEM95 генінің амплификация процесінің нәтижесіне айтарлықтай әсер етпейтіні анықталды. Осылайша, TETRA-PRIMER ARMS-PCR оңтайландырылған әдісімен Қазақстан Республикасының үш асыл тұқымды орталығықтарында, барлығы 223 асыл тұқымды бұқалар тексерілген, субфертильдік синдромының бір гетерозиготалы тасымалдаушысы, шетелдік селекцияның симментал тұқымды аталық бұқасында анықталған, аталық бұқаларда зерттелген генетикалық ақаудың кездесуі төмен болды және ол 0,44%- ды құрады.

Түйінді сөздер: Аталақ бұқаларды ДНҚ тестілеу, TMEM95 гені, субфертильдік синдромы, TETRA-PRIMER ARMS-PCR реакциясы, Primer 1 бағдарламасы, праймерлер дизайны.

Введение. Исследования показали, что мембранный пептид TMEM95 располагается на поверхности сперматозоидов фертильных животных, тогда как он отсутствует в сперматозоидах

субфертильных животных. Эти данные подтверждают, что целостность пептида TMEM95 необходима для успешного оплодотворения. Результаты ученых показывают, что дефицит TMEM95 серьезно снижает репродуктивную способность быков-производителей и впервые выявлен фенотипический эффект, связанный с геномной изменчивостью TMEM95. Ген TMEM95 расположен на 19 хромосоме, в настоящее время хорошо изучена мутация rs378652941, с.483C> A, p.Cys161X в VI экзонной части данного гена [1, с. 1].

Трансмембранный белок 95 (TMEM95) тесно связан с репродуктивной функцией быков-производителей, однако не влияет на качество спермы. Проведено исследование уровня экспрессии гена TMEM95 с помощью ОТ-ПЦР метода, полученные авторами результаты обогащают понимание функции гена TMEM95 и полезны для улучшения воспроизводства самцов в животноводстве [2, с. 531].

В *in vivo* и *in vitro* условиях экспериментальным путем доказана низкая фертильность спермиев быков-производителей, носителей нонсенс мутации гена TMEM95, у гомозиготных носителей данной мутации быков спермий обладают низкой проникающей способностью через зону пеллюцида ооцитов [3, с. 50].

В другой работе авторы изучали влияния нонсенс-мутации в трансмембранном протеине 95 (TMEM95) у быков-производителей породы Fleckvieh на оплодотворяемость у коров. Общегеномным методом были исследованы 40 быков производителей породы Fleckvieh, при микроскопической оценке эякулят этих быков имел нормальную концентрацию сперматозоидов, морфологию, жизнеспособность и подвижность, однако только 1,7% инсеминаций закончились беременностью. Оценка фертильности спермиев указанных быков проводилась также в *in vitro* условиях. По результатам исследования, сперма от гомозиготных (mt/mt) самцов имела более низкую фертильность *in vitro*, чем сперма от быков дикого типа (wt/wt) или гетерозиготного (wt/mt) быка ($P < 0,01$). Кроме того, было отмечено раннее деление эмбриона в группе mt/mt ($P < 0,01$). Флуоресцентное окрашивание показало, что TMEM95 теряется после акросомной реакции. Это означает, что TMEM95 может участвовать в процессах, которые приводят к взаимодействию сперматозоидов с ооцитами. После оплодотворения, меньшее количество ($P < 0,01$) спермы быков mt/mt связано с zona pellucida (ZP). Сперма быков mt/mt также была менее способна проникать в ооциты без ZP ($P < 0,01$) [3, с. 50].

Выявление генов-кандидатов и генетических маркеров очень важны для молекулярной селекции крупного рогатого скота. Наличие бессмысленной мутации (rs378652941, с.483C> A, p.Cys161X) в трансмембранном белке крупного рогатого скота в VI экзонной части гена TMEM95 серьезно снизила репродуктивную способность быков, однако данная мутация не изучена у коренных китайских пород. Поскольку мутация с.483C> A может служить в качестве потенциального генетического маркера для отбора быков с более высокой фертильностью в настоящем исследовании для идентификации генетических вариантов по локусу гена TMEM95 были использованы способы T-ARMS-PCR реакции и ПЦР-ПДРФ анализ, метод секвенирования ДНК, однако авторами, у исследуемых животных носителей мутации с.483C> A не выявлены. Поэтому, у китайских пород крупного рогатого скота мутация с.483C> A не может использоваться в качестве генетического маркера в молекулярной селекции [4, с. 444].

В другой работе, авторы исследовали ассоциативное влияние аллелей гена TMEM95 на интенсивность роста крупного рогатого скота и воспроизводительные функции быков- производителей, по результатам предварительных исследований существует определенная связь данного SNP с указанными признаками [5, с. 58].

Сычевская порода относится к местным породам комбинированного направления продуктивности. Исследователями были протестированы 150 коров и 34 быков производителей сычевской породы в Смоленской области на следующие аномалии: FN4, BMS, TP, HH0, HCD, HH3, HH5. Из 150 коров 12 животных оказались гетерозиготными носителями синдрома субфертильности и 6 коров дефицита холестерина, что составляет $8 \pm 0,022\%$ и $4 \pm 0,016\%$, соответственно [6, с. 1].

В 2016 году группой ученых выявлена новая мутация ARMC3, ассоциированная с дефектом в области хвоста спермиев быков-производителей Шведской красной породы. Пропорция спермиев с аномальными головками варьировалась от 47 до 62%, что в десять раз выше, чем в обычном эякуляте. Фенотипическое проявление дефекта сперматозоидов проявлялось следующим образом: множественные aberrации, такие как короткие хвосты, рудиментарные хвосты с проксимальной каплей, рудиментарные хвосты без проксимальной капли, свернутые хвосты [7, с. 1].

В 2013 году в литературе появились первые сообщения об использовании новой разновидности полимеразной цепной реакции, tetra-primer ARMS-PCR для детекции носителей точечной мутации в медицине, для генотипирования племенных животных. Идентификация мутантного или дикого типа аллелей осуществляется за счет амплификации фрагментов гена с помощью внешних и внутренних праймеров. Дизайн праймеров осуществляется с помощью программы Primer 1, по следующей ссылке: <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html> [8, с. 6521].

В настоящее время установлены оптимальные условия проведения амплификации и температуры отжига праймеров для tetra-primer ARMS-PCR реакции. Так, с помощью программы

Primer 1, были подобраны последовательности праймеров: Inner forward (Allele G) AAAAACCTGTACTCTCTTTTCGGG, Inner reverse (Allele T) CTCAGAATCTTGGAAATCTCCCTA, Outer forward ATTCCAGCACATGATACTTCTTATGA и Outer reverse GAGCACGTAGGTGGTGAAGG, температура отжига для всех четырех праймеров – 59 °C, размер Allele G: 135 п.н., Allele T: 236 п.н. и длина общего фрагмента 324 п.н. [9, с. 1].

Метод Tetra-Primer ARMS-PCR предусматривает использование одновременно четырех праймеров в ПЦР, визуализация результатов реакции осуществляется горизонтальным гель-электрофорезом. Следует отметить, что этап оптимизации реакции является достаточно трудоемким процессом и требует много времени. Решающими факторами являются: методы экстракции ДНК, температуры отжига, 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. Таким образом, внедрение метода Tetra-Primer ARMS-PCR позволяет изучать SNP полиморфизмы у племенных животных, способ быстрый, надежный и недорогой [10, с. 599].

Определяющими факторами для оптимизации метода Tetra-Primer ARMS-PCR являются: необходимая концентрация реагентов ПЦР, соотношение внешнего и внутреннего праймеров, а также температура отжига праймеров. Оптимальной была концентрация для Forward outer primer, Reverse outer primer, Reverse inner primer (A allele) – 0,04 μM и для Forward inner primer (G allele) – 0,16 μM . Первоначальная денатурация при 94 °C – 3 мин, в течение 30 циклов: денатурация 94 °C – 60 сек, отжиг праймеров – 60 °C – 60 сек, элонгация – 72 °C 60 сек, завершающий синтез 72 °C – 10 мин [11, с. 11].

Быстрые и экономичные методы генетического анализа SNP полиморфизмов важны в диагностических исследованиях, особенно когда нужно тестировать большое количество животных на генетическое заболевание. Были сконструированы четыре праймера, внешние праймеры амплифицируют ампликон длиной 354 п.н. гена CD18. Специально разработанные внутренние праймеры в сочетании с модифицированной реакционной смесью и циклические условия обеспечивали амплификацию фрагментов диких или мутантных аллелей. Преимуществом разработанного способа является, исключение использования дорогостоящего оборудования и рестрикции ПЦР продукта [12, с. 1442].

Известно, что в настоящее время для диагностики носителей мутации CVM используется аллельспецифическая реакция, так как нет подходящей рестриктазы для распознавания SNP полиморфизма (SNP rs438228855). Однако данный методический подход сложный, в некоторых случаях неточный, длительный. В связи с вышеизложенным, для идентификации носителей комплексного уродства позвоночника у крупного рогатого скота авторами разработаны быстрые и дешевые способы диагностики, как Tetra-Primer ARMS-PCR реакции [13, с. 1].

Целью настоящего исследования была оптимизация условий проведения Tetra-Primer ARMS-PCR реакции для выявления гетерозиготных носителей генетического дефекта, синдрома субфертильности у племенных быков-производителей.

Материалы и методы исследований. В качестве материала для исследования были использованы криоконсервированные образцы спермы быков-производителей племенных центров №1, №2 и №3. Объем замороженной спермы в пайеттах колебался от 0,2 мл до 0,25 мл с содержанием в дозе 16-18 млн активных спермиев. Существуют разные способы выделения ДНК из биологических материалов, в нашей работе экстракция ДНК осуществлялась с помощью коммерческого набора. Работа по выделению ДНК из спермы быков-производителей проводилась в лаборатории «Генетики и цитогенетики животных» Института общей генетики и цитологии МОН РК согласно инструкции производителя коммерческого набора. Концентрацию изолированной геномной ДНК и степень очистки ДНК определяли с помощью микроспектрофотометрического анализа (NanoDrop™ 2000).

ДНК тестирование образцов ДНК быков-производителей на синдром субфертильности (ген TMEM95) проводилось методом T-ARMS-PCR реакции, который является разновидностью классической полимеразной цепной реакции. Для амплификации V интронной и VI экзонной частей гена TMEM95 были использованы две пары праймеров: одна пара внешних праймеров: прямой F (outer): CCTCACCCACCCAGATCTCTGAGCTC (1731-1758) и обратный R (outer): ACCTGAGGGAAAACAGAGGGTGGGAGGC (2015-2042) праймеры, вторая пара внутренних праймеров: прямой F (inner A): CTCGGATCCTGCTCCTTTGTGCGC (1847-1872) и обратный R (inner C): GGGACCCAGGAGCAGGGCAGTTTCT (1872-1898). Условия проведения амплификации были: 1 шаг – первоначальная денатурация при 95 °C, (5 мин); 2 шаг – количество циклов 17, денатурация при 94 °C, (30 сек); отжиг праймеров при 68 °C, (30 сек, со снижением температуры на 1 °C за каждый цикл, элонгация при 72 °C, (30 сек), следующие 30 циклов денатурация при 94 °C, (30 сек), отжиг праймеров при 51 °C, (30 сек) и элонгация при 72 °C, (30 сек), завершающий синтез при 72 °C (5 мин) [5].

Фрагмент амплифицируемого участка V интронной и VI экзонной частей гена TMEM95 у крупного рогатого скота, красным цветом выделены участки гена, которые соответствуют внешним прямым и обратным праймерам, подчеркнутые нуклеотиды соответствуют последовательностям прямого и обратного, внутренних праймеров, заглавным шрифтом в квадратной скобке выделен SNP полиморфизм (с.483 C> A).

ccTcaccsccsacccagatctctgagctctgaggcttccccagcatcgatgggtatggTccccgggatcactcactgcttctgggtcccctatagg aagtcacgatctttgggaagctcggatcctgctcctcttTgtgtg[c]ggaactgccctgctcctgggtgtcccagcctcgcggtggagtgagttgggggat cagggcgggagacagcctcaccacttcccaccagtaccsccctcatccttctcctgTggccctccctcctccctcccaggcctcccaccctctgt ttccctcaggt

Как известно, в диагностических лабораториях важными факторами для оптимизации метода Tetra-Primer ARMS-PCR реакции являются: оптимальная концентрация компонентов ПЦР, необходимое соотношение внешнего и внутреннего праймеров и температура отжига праймеров. Экспериментальным путем были оптимизированы концентрация внешних и внутренних праймеров и температура отжига праймеров. Таким образом, в зависимости от генотипа животных образуются фрагменты: гомозиготные здоровые животные, генотип CC: 312 п.н., 196 п.н., у гетерозиготных носителей мутации синдрома субфертильности, генотип CA: 312 п.н., 196 п.н. и 168 п.н. и гомозиготных носителей генетического дефекта, генотип AA: 312 п.н. и 168 п.н. Результаты амплификации проверяли в 3,0% агарозном геле методом горизонтального электрофореза и зафиксировали полученные электрофореграммы с помощью геля документирующей системы (Infinity VX2 3026, WL/LC/26M X-Press gel documentation system, Vilber Lourmat, United States).

Результаты и их обсуждение. Нами, в лаборатории «Зеленой биотехнологии и клеточной инженерии» Казахстанско-Японского инновационного центра КазНАИУ проведена ПЦР диагностика синдрома субфертильности у быков-производителей всего 223 животных, разных пород с помощью Tetra-Primer ARMS-PCR реакции. В настоящее время хорошо изучен SNP полиморфизм (с.483 C> A) в VI экзонной частей гена TMEM95 у крупного рогатого скота, который является причиной возникновения генетического дефекта – синдрома субфертильности у быков- производителей. Нами определено место локализации точечной мутации (с.483 C→A), ctcgatcctgctcctcttTgtgtg[c]ggaactgccctgctcctgggtgtccc, при синдроме субфертильности происходит замена нуклеотида C на A, методологическая суть способа Tetra-Primer ARMS-PCR реакции заключается в использовании для амплификации участка гена двух пар праймеров, внешние прямые и обратные праймеры, которые обеспечивают амплификацию фрагмента гена TMEM95 длиной 312 п.н., который не имеет диагностического значения. Идентификация дикого и мутантного типов аллелей гена TMEM95 осуществляется с помощью внутренних аллельспецифических праймеров (R (inner C): GGGACACCCAGGAGCAGGGCAGTTTCT (1872-1898), F (inner A): CTCGGATCCTGCTCCTCTTTGT GCGC (1847-1872).

С целью оптимизации условий проведения Tetra-Primer ARMS-PCR реакции, нами как представлены в таблице 1 проводились 3 серии экспериментов, где были использованы для полимеразной цепной реакции разные концентрации прямого и обратного внешних и внутренних праймеров, от 0,75 мкл до 1,25 мкл на одну реакционную смесь, общий объем реакционной смеси составил 25,0 мкл. Также, варьировалась концентрация такого важного компонента магния хлорида, от 1,5 мМ до 2,5 мМ.

Таблица 1. Оптимизация компонентов ПЦР для детекции гетерозиготных носителей мутации в экзонной части гена TMEM95 с помощью Tetra-Primer ARMS-PCR реакции у быков-производителей

Состав реакционной смеси	Количество компонентов ПЦР на 1 реакционную смесь (мкл.)		
	I – вариант	II – вариант	III – вариант
10x ПЦР буфер KCl	2,5	2,5	2,5
Смесь dNTP	2,0	2,0	2,0
Праймер F внешний	0,75	1,0	1,25
Праймер R внешний	0,75	1,0	1,25
Праймер F внутренний	0,75	1,0	1,25
Праймер R внутренний	0,75	1,0	1,25
25 mM MgCl ₂	1,5 (2,0, 2,5)	1,5 (2,0, 2,5)	1,5 (2,0, 2,5)
Taq полимераза	0,2	0,2	0,2
Деионизированная H ₂ O	12,8	11,8	10,8
Образцы ДНК	3,0	3,0	3,0
Объем реакционной смеси	25,0	25,0	25,0

Результаты первого эксперимента показывают, что использование внешних и внутренних праймеров в количестве 0,75 мкл на одну реакцию смесь обеспечивает специфическую амплификацию, фрагмент амплифицируемого участка V интронной и VI экзонной частей гена TMEM95 у крупного рогатого скота представлен ниже (рис 1), однако на электрофореграмме наблюдается слабый сигнал, который затрудняет диагностику носителей синдрома субфертильности у быков. Следовательно, во втором эксперимента нами были взяты для амплификации внешние и внутренние праймеры в количестве 1,0 мкл (рис 2), где успешно прошла амплификация во всех образцах. На электрофореграмме наблюдается небольшое избыточное количество праймеров, которые в принципе не затрудняют ПЦР диагностику. В 3 эксперименте, с целью улучшения процесса амплификации была использована более высокая концентрация внешних и внутренних праймеров, в объеме 1,25 мкл на одну реакцию смесь (рис 3). Анализ данной электрофореграммы свидетельствует, что и здесь прошла амплификация фрагмента гена TMEM95, однако хорошо видно избыточное количество прямого и обратного внешних и внутренних праймеров. В наших экспериментах варьировалась концентрация магния хлорида от 1,5 мМ до 2,5 мМ, однако не были выявлены существенные влияния данного фактора на результативность полимеразной цепной реакции.

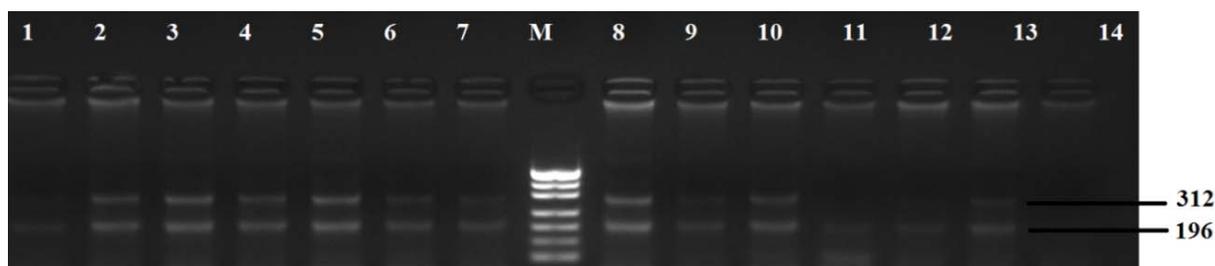


Рисунок 1. Электрофореграмма фрагмента гена TMEM95, амплифицированного методом Tetra-Primer ARMS-PCR реакции, 3% агароза, лунки 1-7, 8-14 гомозиготные здоровые быки производители, фрагменты 312 п.н., 196 п.н., М- ДНК маркер pUC19/MspI

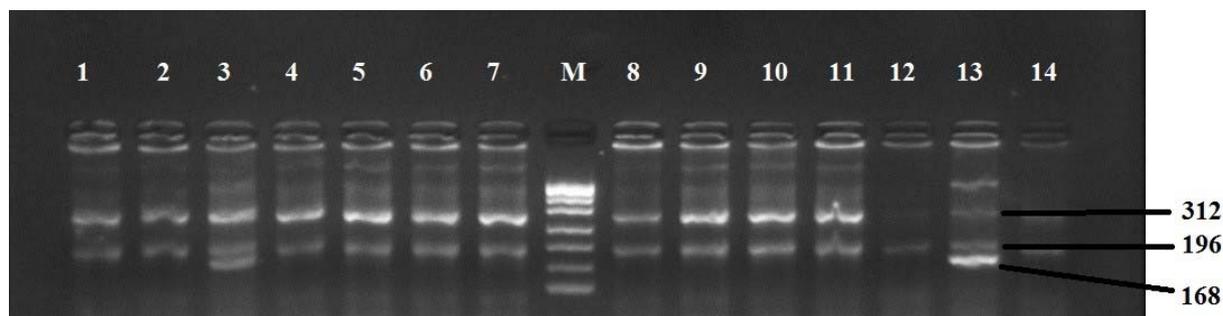


Рисунок 2. Электрофореграмма фрагмента гена TMEM95, амплифицированного методом Tetra-Primer ARMS-PCR реакции, 3% агароза, лунки 1-2, 4-12, 14 гомозиготные здоровые быки производители, фрагменты 312 п.н., 196 п.н., лунки 3,13 гетерозиготные носители, фрагменты 312 п.н., 196 п.н., 168 п.н., М- ДНК маркер pUC19/MspI

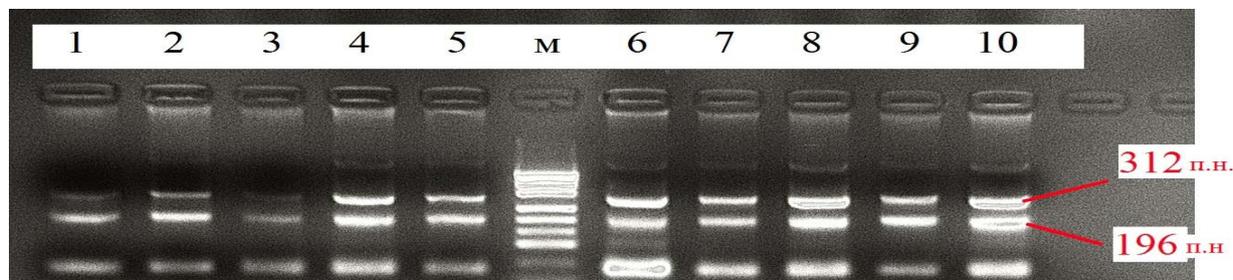


Рисунок 3. Электрофореграмма фрагмента гена TMEM95, амплифицированного методом Tetra-Primer ARMS-PCR реакции, 3% агароза, лунки 1-5, 6-10 гомозиготные здоровые быки производители, фрагменты 312 п.н., 196 п.н., лунки 4,6,8,10 неспецифические фрагменты, избыток праймеров, М – ДНК маркер pUC19/MspI

Нами были протестированы всего 223 быков-производителей из трех племенных центров, из них 64 быков голштинской породы (32,63%), 28 голов казахской белоголовой породы (12,5%), 19 голов Аулиекольской породы (8,52%), 83 животных зарубежной селекции и 138 быков производителей Казахстанской популяции (таблица 2). Согласно проведенного анализа специальной литературы генетический дефект, синдром субфертильности в 2014 году впервые был зарегистрирован у локальной породы Fleckvieh в Германии [1], в 2017 году для выявления носителей мутации в кодирующей части гена TMEM95 был использован способ Tetra-Primer ARMS-PCR реакции [4]. В 2020 году данный генетический дефект был выявлен у коров Сычевской породы в Смоленской области Российской Федерации [7]. По результатам наших исследований у исследуемой группы быков-производителей распространенность синдрома субфертильности составила 0,89%, SNP полиморфизм с.483C> A, локализованный в VI экзонной части гена TMEM95 был обнаружен у одного быка-производителя симментальской породы зарубежной селекции из племенного центра №1. Частота встречаемости данной вредной мутации в целом у исследуемой группы животных составила 0,44%, это очень низкий процент, однако на данный генетический дефект, синдрома субфертильности были протестированы всего 5 быков-производителей симментальской породы племенного центра №1 и из них один бык оказался гетерозиготным носителем данной мутации (20,0%). Быки производители, остальных 22 молочных, мясных и комбинированных пород зарубежной и отечественной селекции оказались свободными от носительства синдрома субфертильности. Видимо синдром субфертильности имеет у крупного рогатого скота минимальную распространенность, так по литературным сведениям в основном SNP полиморфизм (с.483 C> A) регистрируется у локальных пород.

Таблица 2. Породный состав исследуемой группы быков-производителей племенных центров №1, №2 и №3, протестированных способом Tetra-Primer ARMS-PCR реакции на синдром субфертильности.

№ п/п	Порода быков производителей	Зарубежная селекция		Отечественная селекция		Всего быков, число/%
		Племенной центр №1	Племенной центр №2	Племенной центр №1	Племенной центр №3	
1	Голштинская черно-пестрая	16	15	33	-	64/28,6
2	Голштинская красная	6	3	-	-	9/4,03
3	Симментальская	5	-	5	-	10/4,48
4	Геррефордская	5	4	-	1	10/4,48
5	Красная степная	-	-	9	-	9/4,03
6	Абердин-ангус	2	2	4	-	8/3,58
7	Англеская	4	-	-	-	4/1,79
8	Аулиеатинская	-	-	5	-	5/2,24
9	Казахская белоголовая	-	-	13	15	28/12,5
10	Аулиекольская	-	-	5	14	19/8,52
11	Шароле	2	-	-	-	2/0,89
12	Алатауская	-	-	5	-	5/2,24
13	Швицкая	2	3	4	-	9/4,03
14	Айрширская	-	2	5	-	7/3,13
15	Джерсейская	1	2	-	-	3/1,34
16	Черно-пестрая	-	-	10	-	10/4,48
17	Калмыцкая	-	-	2	-	2/0,89
18	Костромская	2	-	-	-	2/0,89
19	Обрак	-	-	2	-	2/0,89
20	Санта-гертруда	1	-	4	-	5/2,24
21	Лимузин	-	1	-	-	1/0,44
22	Зебу	-	1	-	-	1/0,44
23	Бельгийская голубая	-	4	-	-	4/1,79
	Всего животных	46	37	106	32	223

Заклучение. Согласно поставленной задачи в рамках настоящего исследования была проведена оптимизация способа Tetra-Primer ARMS-PCR реакции для детекции носителей мутации с.483 С>А в VI экзонной частей гена TMEM95 у крупного рогатого скота. Результаты экспериментов свидетельствуют, что снижение концентрации внешних и внутренних праймеров до 0,75 мкл на одну реакционную смесь сопровождается снижением эффективности амплификации, на электрофореграмме появляются слабо выраженные бэнды, которые плохо визуализируются. Наоборот, увеличение концентрации внешних и внутренних праймеров приводит к усилению амплификации, однако на электрофореграмме появляются остатки праймеров в виде неспецифической амплификации. Следует отметить, что оптимальным количеством для Tetra-Primer ARMS-PCR реакции оказалось 1,0 мкл прямого и обратного внешних и внутренних праймеров с конечным объемом реакционной смеси 25,0 мкл. В нашей работе был использован температурный режим, описанный в работе ученых Китайской Народной Республики (2019). Таким образом, изменение концентрации $MgCl_2$ в реакционной смеси не оказывало существенного влияния на результативность ПЦР диагностики. По результатам генетического мониторинга распространенность вредной мутации (с.483 С> А) в VI экзонной частей гена TMEM95 была минимальной, только один бык-производитель зарубежной селекции симментальской породы оказался гетерозиготным носителем синдрома субфертильности, что составляет 0,44%.

Финансирование. Работа была выполнена в рамках реализации проекта МНВО РК «Разработка молекулярно-генетических способов детекции скрытых мутации у крупного рогатого скота и управление процессом элиминации наследственных аномалии», АР09057988.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Pausch H. A nonsense mutation in TMEM95 encoding a nondescript transmembrane protein causes idiopathic male subfertility in cattle [Текст] / H.Pausch, H. Kölle, S. Wurmser, C. Schwarzenbacher, H. Emmerling, R. Jansen, S. Trottmann, M. Fuerst, C. Götz, K.U. Fries, R. Fries // PLoS Genet. – 2014, doi: 10, e1004044.
2. Zhang S. Identification of novel alternative splicing transcript and expression analysis of bovine TMEM95 gene [Текст] / S. Zhang, H. Cai, Q. Yang, T. Shi, C. Pan, C. Lei, R. Dang, H. Chen, X. Lan // Gene . – 2016. – Vol. 575. – P. 531-536. doi: 10.1016/j.gene.2015.09.026.
3. Beatriz Fernandez-Fuertes. Subfertility in bulls carrying a nonsense mutation in transmembrane protein 95 is due to failure to interact with the oocyte vestments [Текст] / B. Fernandez-Fuertes, R. Laguna-Barraza, R. Fernandez-Gonzalez, A. Gutierrez-Adan, A. Blanco-Fernandez, A. M O'Doherty, M. Di Fenza, A. K. Kelly, S. Kolle and P. Lonergan //Research Article. Biology of Reproduction. – 2017. – Vol.97(1). – P.50-60. doi:10.1093/biolre/iox065.
4. Sihuan Zhang. Detection of Bovine TMEM95 p.Cys161X Mutation in 13 Chinese Indigenous Cattle Breeds [Текст] / S.Zhang, K. Peng, G. Zhang , Y. Cao, M. Zhang, H. Chen, C.Lei, X. Lan and Y. Zhao // Animals. – 2019. – Vol.9. – P. 444. doi:10.3390/ani9070444.
5. Guo.X. Bovine TMEM95 gene: Polymorphisms detecting in five Chinese indigenous cattle breeds and their association with growth traits [Текст] / X. Guo, S. Zhang, H. Yang, J. Pei, X.Wu, P. Bao, C. Liang, L. Xiong, M. Chu, X. Lan, P. Y. Electronic // Journal of Biotechnology. – 2021. – Vol. 51. – P. 58-66.
6. Zimina A.A.Main genetic defects of improving breeds in the population of Sychevsky cattle of the Smolensk region [Текст] / A.A. Zimina and O.S. Romanenkova // E3S Web of Conferences 222. – 2020. – P. 03017. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202022203017>.
7. Pausch H. A frameshift mutation in ARMC3 is associated with a tail stump sperm defect in Swedish Red (Bos taurus) cattle [Текст] / H.Pausch, H. Venhoranta, C. Wurmser, K. Hakala, T. Iso-Touru, A. Sironen, R. K. Vingborg, H. Lohi, L. Söderquist, R. Fries and M. Andersson // BMC Genetics. – 2016. – Vol. 17. – P. 49. DOI 10.1186/s12863-016-0356-7.
8. Fonseca. P.A.S. A new tetra-primer ARMS-PCR for genotyping bovine kappa-casein polymorphisms [Текст] / 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 // Genetics and Molecular Research. – 2013. – Vol. 12 (4). – P. 6521-6526.
9. Tanha Mesrian H. Modified Tetra-Primer ARMS PCR as a Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping Tool [Текст] / H. Mesrian Tanha, M. Mojtabavi Naeini, S. Rahgozar, S. M.Rasa and S. Vallian // Genetic testing and molecular biomarkers. – 2015. – Vol.19. No 3. – P.156-161.
10. Medrano R. F. Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR Technique Development [Текст]/ R. F. Medrano, C.A.´a de Oliveira // Mol Biotechnol. – 2014. – Vol. 56. – P. 599-608. DOI 10.1007/s12033-014-9734-4.
11. Zabala A.S. Tetra Primer ARMS PCR Optimization to Detect Single Nucleotide Polymorphism of the KLF14 Gene [Текст] / A. S. Zabala, M. E. V. Gomez, M. F. Álvarez, S.Siewert // Open Access Library Journal. – 2017. – Vol. 4. – P. 4145.

12. Rafeeque R. Development of a fast and economical genotyping protocol for bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in cattle [Текст] / R. R. Alyethodi, U. Singh, S. Kumar, R. Deb, R. Alex, S. Sharma, S. G. Sengar and B. Prakash // Springer Plus. – 2016. – Vol. 5. – P. 1442. DOI 10.1186/s40064-016-3148-7.

13. Alyethodi R. R. Designing, optimization, and validation of whole blood direct T-ARMS PCR for precise and rapid genotyping of complex vertebral malformation in cattle [Текст] / R. R. Alyethodi, U. Singh, S. Kumar, R. Alex, G. S. Sengar, T. V. Raja, R. Deb and B. Prakash // BMC Biotechnology. – 2021. – Vol. 21. – P. 36. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00696-5>.

REFERENCES:

1. Pausch H. A nonsense mutation in TMEM95 encoding a nondescript transmembrane protein causes idiopathic male subfertility in cattle [Текст] / H. Pausch, H. Kölle, S. Wurmser, C. Schwarzenbacher, H. Emmerling, R. Jansen, S. Trottmann, M. Fuerst, C. Götz, K. U. Fries, R. Fries // PLoS Genet. – 2014, doi: 10, e1004044.

2. Zhang S. Identification of novel alternative splicing transcript and expression analysis of bovine TMEM95 gene [Текст] / S. Zhang, H. Cai, Q. Yang, T. Shi, C. Pan, C. Lei, R. Dang, H. Chen, X. Lan // Gene. – 2016. – Vol. 575. – P. 531-536. doi: 10.1016/j.gene.2015.09.026.

3. Beatriz Fernandez-Fuertes. Subfertility in bulls carrying a nonsense mutation in transmembrane protein 95 is due to failure to interact with the oocyte vestments [Текст] / B. Fernandez-Fuertes, R. Laguna-Barraza, R. Fernandez-Gonzalez, A. Gutierrez-Adan, A. Blanco-Fernandez, A. M. O'Doherty, M. Di Fenza, A. K. Kelly, S. Kolle and P. Lonergan // Research Article. Biology of Reproduction. – 2017. – Vol. 97(1). – P. 50-60. doi:10.1093/biolre/i0x065.

4. Sihuan Zhang. Detection of Bovine TMEM95 p.Cys161X Mutation in 13 Chinese Indigenous Cattle Breeds [Текст] / S. Zhang, K. Peng, G. Zhang, Y. Cao, M. Zhang, H. Chen, C. Lei, X. Lan and Y. Zhao // Animals. – 2019. – Vol. 9. – P. 444. doi:10.3390/ani9070444.

5. Guo.X. Bovine TMEM95 gene: Polymorphisms detecting in five Chinese indigenous cattle breeds and their association with growth traits [Текст] / X. Guo, S. Zhang, H. Yang, J. Pei, X. Wu, P. Bao, C. Liang, L. Xiong, M. Chu, X. Lan, P. Y. Electronic // Journal of Biotechnology. – 2021. – Vol. 51. – P. 58-66.

6. Zimina A.A. Main genetic defects of improving breeds in the population of Sychevsky cattle of the Smolensk region [Текст] / A.A. Zimina and O.S. Romanenkova // E3S Web of Conferences 222. – 2020. – P. 03017. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202022203017>.

7. Pausch H. A frameshift mutation in ARMC3 is associated with a tail stump sperm defect in Swedish Red (Bos taurus) cattle [Текст] / H. Pausch, H. Venhoranta, C. Wurmser, K. Hakala, T. Iso-Touru, A. Sironen, R. K. Vingborg, H. Lohi, L. Söderquist, R. Fries and M. Andersson // BMC Genetics. – 2016. – Vol. 17. – P. 49. DOI 10.1186/s12863-016-0356-7.

8. Fonseca. P.A.S. A new tetra-primer ARMS-PCR for genotyping bovine kappa-casein polymorphisms [Текст] / 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 // Genetics and Molecular Research. – 2013. – Vol. 12 (4). – P. 6521-6526.

9. Tanha Mesrian H. Modified Tetra-Primer ARMS PCR as a Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping Tool [Текст] / H. Mesrian Tanha, M. Mojtavavi Naeini, S. Rahgozar, S. M. Rasa and S. Vallian // Genetic testing and molecular biomarkers. – 2015. – Vol. 19. No 3. – P. 156-161.

10. Medrano R. F. Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR Technique Development [Текст] / R. F. Medrano, C.A. de Oliveira // Mol Biotechnol. – 2014. – Vol. 56. – P. 599-608. DOI 10.1007/s12033-014-9734-4.

11. Zabala A.S. Tetra Primer ARMS PCR Optimization to Detect Single Nucleotide Polymorphism of the KLF14 Gene [Текст] / A. S. Zabala, M. E. V. Gomez, M. F. Álvarez, S. Siewert // Open Access Library Journal. – 2017. – Vol. 4. – P. 4145.

12. Rafeeque R. Development of a fast and economical genotyping protocol for bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in cattle [Текст] / R. R. Alyethodi, U. Singh, S. Kumar, R. Deb, R. Alex, S. Sharma, S. G. Sengar and B. Prakash // Springer Plus. – 2016. – Vol. 5. – P. 1442. DOI 10.1186/s40064-016-3148-7.

13. Alyethodi R. R. Designing, optimization, and validation of whole blood direct T-ARMS PCR for precise and rapid genotyping of complex vertebral malformation in cattle [Текст] / R. R. Alyethodi, U. Singh, S. Kumar, R. Alex, G. S. Sengar, T. V. Raja, R. Deb and B. Prakash // BMC Biotechnology. – 2021. – Vol. 21. – P. 36. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00696-5>

Сведения об авторах:

Шорманова Маржан Муратовна* – магистр ветеринарных наук, докторант НАО «Казахского национального аграрного исследовательского университета», тел.:+77086533257; e-mail: aishok_mar@mail.ru; 050023, г Алматы, мкр. Жас-канат, дом-1/7, кв-30.

Нурпеисова Раушан Кадирбаевна – магистр ветеринарных наук, докторант НАО «Казахского национального аграрного исследовательского университета», тел.:+77007766250; e-mail: baby_05_88@mail.ru; 050038, РК, г. Алматы, мкр. Нуркент, дом-5/9, кв-23.

Махмұтов Абзал Касенович – кандидат ветеринарных наук, заведующий кафедрой «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства, НАО «Казахского национального аграрного исследовательского университета», тел.:+77072921550; e-mail: abzal.makhmutov@kaznaru.edu.kz; 040901, РК, Алматинская область, Карасайский район, г.Каскелен, ул. Балхаш, дом-18.

Усенбеков Есенгали Серикович – кандидат биологических наук, профессор кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства, НАО «Казахского национального аграрного исследовательского университета», тел.:+77059160272; e-mail: yessengali.ussembekov@kaznaru.edu.kz; 050006, г. Алматы, микрорайон Калкаман-2, ул.Абилова 21.

Шорманова Маржан Муратовна* – ветеринария ғылымдарының магистрі, КЕАҚ «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университетінің» докторанты, тел.:+77086533257; e-mail: aishok_mar@mail.ru; 050023, Алматы қаласы, Жас-канат ықшам ауданы, үй-1/7, пәтер-30.

Нурпеисова Раушан Кадирбаевна – ветеринария ғылымдарының магистрі, КЕАҚ «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университетінің» докторанты, тел.:+77007766250; e-mail: baby_05_88@mail.ru; 050038, Алматы қаласы, Нуркент ықшам ауданы, үй- 5/9 пәтер- 23.

Махмұтов Абзал Касенович – ветеринария ғылымдарының кандидаты, КЕАҚ «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университетінің «Акушерлік, хирургия және өсіп өну биотехнологиясы» кафедрасының меңгерушісі, тел.:+77072921550; e-mail: abzal.makhmutov@kaznaru.edu.kz; 040901, Алматы облысы, Қарасай ауданы, Қаскелең қаласы, Балхаш көшесі үй 38.

Усенбеков Есенгали Серикович – биология ғылымдарының кандидаты, КЕАҚ «Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университетінің «Акушерлік, хирургия және өсіп өну биотехнологиясы» кафедрасының профессоры, тел.:+77059160272; e-mail: yessengali.ussembekov@kaznaru.edu.kz; 050006, Алматы қ, Калкаман 2 ықшам ауданы, Абилов көшес, 21.

Shormanova Marzhan Muratovna* – master of Veterinary Sciences, Doctoral student of NJSC Kazakh National Agrarian Research University, tel.: +77086533257; e-mail: aishok_mar@mail.ru; 050023, Almaty, microdistrict Zhaskanat, house 1/7, flat 30.

Nurpeissova Raushan Kadirbaevna – Master of Veterinary Sciences, Doctoral student of NJSC Kazakh National Agrarian Research University, tel.: +77007766250; e-mail: baby_05_88@mail.ru; 050038, Republic of Kazakhstan, Almaty, microdistrict Nurkent, house 5/9, flat 23.

Makhmutov Abzal Kasenovich – Candidate of Veterinary Sciences, Head of the Department, Department of Obstetrics, Surgery and Biotechnology of Reproduction, NJSC Kazakh National Agrarian Research University, tel.: +77072921550; e-mail: abzal.makhmutov@kaznaru.edu.kz; 040901, Republic of Kazakhstan, Almaty region Karasai district Kaskelen city, 38 Balkhash street.

Ussenbekov Yessengali Serikovich – Candidate of Biological Sciences, Professor of the Department of Obstetrics, Surgery and Biotechnology of Reproduction, NJSC Kazakh National Agrarian Research University, tel.:+77059160272; e-mail: yessengali.ussembekov@kaznaru.edu.kz; 050026, Almaty, microdistrict Kalkaman 2, 21 Abilov street.