

Н. В. Ковалюк, В. Ф. Сацук

Разработка системы идентификации гаплотипа АН1 айрширского скота

Аннотация. В последнее время регулярно появляются сообщения об открытии мутаций, связанных с летальными наследственными заболеваниями. Нами проведен анализ базы OMIA и определена мутация, наиболее часто встречающаяся у крупного рогатого скота айрширской породы (OMIA 001934-9913 Ptois, intellectual disability, retarded growth and mortality (PIRM) syndrome in Bos taurus (cattle) Gene: UBE3B). Точечная мутация в гене UBE3B (G > A) приводит к нарушению процесса сплайсинга у носителей мутантного аллеля и синтезу дефектной убиквитин протеин лигазы E3B, что изменяет клеточный гомеостаз и сопровождается дефектами развития и увеличением эмбриональной смертности и смертности молодняка. По литературным данным мутация широко распространена в популяциях айрширского скота.

На основе аллель — специфической полимеразной цепной реакции разработана тест-система, позволяющая с минимальными затратами эффективно выявлять носителей мутации в локусе UBE3B. Апробация тест-системы показала результаты идентичные, полученным в ООО «Мой Ген» для тех же образцов, методом секвенирования ПЦР-продукта).

Разработанная тест — система позволила генотипировать быков — производителей (n = 30), интенсивно используемых или планируемых к использованию в системе искусственного осеменения Краснодарского края и коров, принадлежащих двум племенным хозяйствам края. Установлено, что среди 30 айрширских быков — 5 (17%) оказались носителями гаплотипа АН1; среди коров (n = 55), принадлежащих двум племенным заводам по разведению айрширского скота, в среднем, 6% животных — носители гаплотипа АН1. Поскольку частота встречаемости этой аномалии практически в три раза выше у быков — производителей, определяющих завтрашний день субпопуляции, следует ожидать увеличение ее частоты встречаемости у коров в ближайшее время.

Учитывая довольно высокую частоту встречаемости гаплотипа АН1 целесообразно вести контроль за его распространением в региональной субпопуляции скота.

Ключевые слова: айрширский скот, ген UBE3B, гаплотип АН1, PIRM-синдром, аллель — специфическая ПЦР, тест-система

Авторы:

Ковалюк Наталья Викторовна — доктор биологических наук, заведующая лабораторией биотехнологии Федерального государственного научного учреждения «Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства», Россия, 350055, г. Краснодар, п. Знаменский, ул. Первомайская, 4, e-mail: NVK1972@yandex.ru;

Сацук Владимир Фёдорович — кандидат биологических наук, генеральный директор ООО Научно-производственное объединение «Юг-Плем», Россия, 350055, г. Краснодар, п. Знаменский, ул. Первомайская, 1А, e-mail: yug-plem@yandex.ru.

Снижение репродуктивной способности коров является одной из главных проблем, лимитирующих развитие современного молочного животноводства, как в России, так и в мире [1]. Многочисленные исследования, выполненные на молочном и мясном скоте, позволили идентифицировать генетические и негенетические причины репродуктивных потерь на всех этапах: от эмбриональной смертности до послеродовой смертности теленка от рождения до отъема. Выяснилось, что в настоящее время ухудшение воспроизводительных качеств все чаще связано с увеличением генетиче-

ского груза в популяции крупного рогатого скота. Наиболее крупная на сегодня база данных, содержащая информацию о наследственных дефектах 186 видов животных, — OMIA Университета Сиднея. На 13.07.2017 она содержит фенотипическое описание 512 наследственных аномалий крупного рогатого скота, из которых 138 наследственных дефектов описано на молекулярном уровне.

Нами проведен анализ базы OMIA и определена мутация, наиболее часто встречающаяся у крупного рогатого скота айрширской породы (OMIA

001934-9913 Ptois, intellectual disability, retarded growth and mortality (PIRM) syndrome in *Bos taurus* (cattle) Gene: UBE3B).

Фенотипически мутация в гомозиготном состоянии проявляется дефектами развития (птоз, задержка роста, умственная отсталость, мышечная гипотония) и увеличением смертности молодняка в айрширских стадах. Наблюдаемый спектр нарушений получил название PIRM-синдрома.

Установлено, что причина PIRM-синдрома нуклеотидная замена G > A в гене UBE3B в позиции 65,921,497 (Chromosomal position (bp), rs475678587 (NCBI assay ID)), расположенном на 17 хромосоме крупного рогатого скота. Продукт гена UBE3B — убиквитин протеин лигаза E3B — белок, способный специфически связываться с подлежащими деградации белковыми субстратами и запускать сам процесс деградации. Полиморфизм rs475678587 находится на стыке 23 экзона и 23 интрона гена UBE3B и, вероятно, приводит к нарушению процесса сплайсинга у носителей мутантного аллеля и синтезу дефектной убиквитин протеин лигазы E3B, что изменяет клеточный гомеостаз [2].

В гомозиготном состоянии мутация приводит к возникновению PIRM-синдрома, в гетерозиготном — является причиной дефектного гаплотипа фертильности AH1.

Сообщается о высокой частоте встречаемости гаплотипа AH1 среди генотипированных айрширов (до 26.1%) и о значительном снижении фертильности, связанной с широким распространением данного гаплотипа [3].

Выяснилось, что носителем мутации в рецессивном состоянии оказался бык Selwood Betty Commander (000000117936), 1953 года рождения, от которого получено 4747 дочерей, 23964 внуков, 30 сыновей и 125 внуков, использовавшихся в системе искусственного осеменения [4].

Цель наших исследований — разработать тест-систему выявления гаплотипа AH1, доступную для большинства исследовательских лабораторий животноводческого профиля, и определить актуальность подобного тестирования для региональной популяции айрширов.

H. Venhoranta, H. Pausch, K. Flisikowski, et al. (2014) с использованием подхода, связанного с идентификацией регионов, характеризующихся отсутствием одного из гомозиготных вариантов, был определен регион 17 хромосомы (65,921,200-65,921,600), а затем и выявлен SNP, связанный с появлением PIRM-синдрома.

В качестве метода для моделирования тест-системы нами был выбран метод аллелеспецифической ПЦР (АС-ПЦР).

Для выделения ДНК из спермы и крови использовали наборы реагентов Diatom™ DNA Prep 100 ООО Лаборатория «Изоген» г. Москва.

Последовательность праймеров была подобрана с использованием программы Primer Premier.

АС-ПЦР проводили со следующими праймерами:

AH 1.3 (5' TCAGCGACAAGCTCCTCACC3')

AH 1.4 (5' TCAGCGACAAGCTCCTCACT3')

AH 1.5 (5' GGCCTCTCCCACGCTTAAC3')

Использовали следующие условия амплификации:

94°C — 4 минуты;

(94°C — 30 секунд, 67°C — 30 секунд, 72°C — 30 секунд) — 28 циклов;

72°C — 3 минуты

Результативность амплификации оценивали в 2% агарозном геле.

Праймер AH1.5 в паре со специфическим для аллеля G праймером AH1.3 позволил амплифицировать фрагмент аллеля G длиной 238 п.о.. Праймер AH1.5 в паре с аллелеспецифическим для аллеля A праймером AH1.4 позволил амплифицировать фрагмент аллеля A, также длиной 238 п.о.

Генотипирование одного животного, таким образом, проводили в двух пробирках. Гомозиготных GG животных выявляли по результативной амплификации в пробирке с праймерами AH1.3 и AH1.5; гетерозиготных GA — по результативной амплификации в обеих пробирках (с праймерами AH1.3 и AH1.5; AH1.4 и AH1.5); гомозиготных по мутации (генотип AA) возможно выявлять по результативной амплификации в пробирке с праймерами AH1.4 и AH1.5.

Апробация тест-системы была проведена с использованием ДНК двух айрширских быков — производителей, один из которых, являлся гетерозиготным носителем мутации, а второй — нормальной гомозиготой (сравнительное генотипирование проведено в ООО «Мой Ген» методом секвенирования ПЦР — продукта).

Нами также было проведено генотипирование быков — производителей (n = 30), интенсивно используемых в настоящее время в системе искусственного осеменения Краснодарского края (сравнительное генотипирование 15 из них проведено в ООО «Мой Ген») и коров, принадлежащих двум племенным заводам по разведению айрширского скота (n = 55). Результаты генотипирования представлены в таблице 1.

Таблица 1. Частоты встречаемости генотипов UBE3B в различных группах животных айрширской породы

Генотип UBE3B	Частота встречаемости			
	в субпопуляции коров (n = 55)	в ЗАО АФП «Нива» (n = 22)	в ОАО «ПЗ «Дружба» (n = 33)	в группе быков — производителей (n = 30)
GG	0,93	0,91	0,94	0,83
GA	0,07	0,09	0,06	0,17
AA	—	—	—	—

Как следует из данных таблицы 1, частота встречаемости гетерозиготного генотипа GA в субпопуляции айрширских коров Краснодарского края в среднем составила 0,07, а у быков — производителей, соответственно, — 0,17. Полученные результаты свидетельствуют о том, что проблема наличия аномалии, а, следовательно, и связанных с ней экономических потерь существует и в субпопуляции Краснодарского края. Поскольку частота встречаемости этой аномалии практически

в три раза выше у быков — производителей, определяющих завтрашний день субпопуляции, следует ожидать увеличение ее частоты встречаемости у коров в ближайшее время.

Таким образом, разработанная тест-система позволяет с минимальными затратами эффективно выявлять носителей мутации в локусе UBE3B и может успешно использоваться для мониторинга данной аномалии у айрширского скота.

Литература

1. Barbat, A. Female Fertility in French Dairy Breeds: Current Situation and Strategies for Improvement / A. Barbat, P. Le Mezec, V. Ducrocq, S. Mattalia, S. Fritz, D. Boichard, C. Ponsart, P. Humblot // J. Reprod. Dev. — 2010. — V. 56. — p. 15–21.
2. Venhoranta, H. In frame exon skipping in UBE3B is associated with developmental disorders and increased mortality in cattle / H. Venhoranta, H. Pausch, K. Flisikowski, et al. // BMC Genomics. — 2014, 15:890, DOI: 10.1186/1471-2164-15-890 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/890>).
3. Cooper, T.A. Genomic evaluation, breed identification, and discovery of a haplotype affecting fertility for Ayrshire dairy cattle / T. A Cooper, G. R. Wiggans, D. J. Null, J. L. Hutchison, J.B. Cole // J Dairy Sci. — 2014, — 97(6):3878-82. DOI: 10.3168 / jds.2013-7427
4. Cole, J. B. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility / Cole, D. J. Null, and P. M. VanRaden // J. Dairy Sci. — 2016. — V. 99. — p. 7274–7288 (<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10777>)

Kovalyuk N. V., Satsuk V. F.

Development of the identification system of Ah1 haplotype of ayrshire cattle

Abstract. Recently, reports on the discovery of mutations associated with lethal hereditary diseases have appeared regularly. We analyzed the OMIA database and identified a mutation most common in the cattle of the Ayrshire breed (OMIA 001934-9913 Ptois, intellectual disability, retarded growth and mortality (PIRM) syndrome in *Bos taurus* (cattle) Gene: UBE3B). A point mutation in the gene UBE3B (G > A) leads to disruption of the splicing process in the carriers of the mutant allele and the synthesis of defective E3B ubiquitin protein ligase, which changes cellular homeostasis and is accompanied by developmental defects and increased embryonic mortality and mortality of young animals. According to the published data, the mutation is widespread in the populations of the Ayrshire cattle.

Based on the allele-specific polymerase chain reaction, a test system has been developed that allows the detection of mutation carriers in the UBE3B locus at a minimal cost. Approbation of the test system showed identical results obtained in the «My Gene» LLC for the same samples, by sequencing the PCR product.

The developed test system allowed the genotyping of servicing bulls ($n = 30$), intensively used or planned for use in the artificial insemination system of the Krasnodar Territory and the cows belonging to two breeding farms of the region. It has been found that among the 30 Ayrshire bulls — 5 (17%) were carriers of the AH1 haplotype; among cows ($n = 55$) belonging to two breeding plants for breeding Ayrshire livestock, on average, 6% of animals are carriers of the AH1 haplotype. Since the frequency of occurrence of this anomaly is almost three times higher in servicing bulls, which determine the future of the subpopulation, one should expect an increase in its frequency in cows in the near future.

Given the relatively high incidence of AH1 haplotype, it is advisable to monitor its distribution in regional livestock sub-populations.

Key words: Ayrshire cattle, UBE3B gene, AH1 haplotype, PIRM syndrome, allele — specific PCR, test system.

Authors:

Kovalyuk Natalia Vitorovna — Dr. Habil. (Biol. Sci.), Head of the Laboratory of Biotechnology of the «North-Caucasus Research Institute of Animal Husbandry», 4, Pervomaiskaya Str., Znamensky, 350055, Krasnodar, Russia, e-mail: NVK1972@yandex.ru;

Satsuk Vladimir Phedorovich — PhD (Biol. Sci.), General Director, Research and Production Association «Yug-Plem» Ltd, 1A, Pervomaiskaya Str., Znamensky, 350055, Krasnodar, Russia, e-mail: yug-plem@yandex.ru.

References

1. Barbat, A. Female Fertility in French Dairy Breeds: Current Situation and Strategies for Improvement / A. Barbat, P. Le Mezec, V. Ducrocq, S. Mattalia, S. Fritz, D. Boichard, C. Ponsart, P. Humblot // J. Reprod. Dev. — 2010. — V. 56. — p. 15–21.
2. Venhoranta, H. In frame exon skipping in UBE3B is associated with developmental disorders and increased mortality in cattle / H. Venhoranta, H. Pausch, K. Flisikowski, et al. // BMC Genomics. - 2014, 15:890, DOI: 10.1186/1471-2164-15-890 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/890>).
3. Cooper, T.A. Genomic evaluation, breed identification, and discovery of a haplotype affecting fertility for Ayrshire dairy cattle / T. A Cooper, G. R. Wiggans, D. J. Null, J. L. Hutchison, J.B. Cole // J Dairy Sci. - 2014, — 97(6):3878-82. DOI: 10.3168 / jds.2013-7427
4. Cole, J. B. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility / Cole, D. J. Null, and P. M. VanRaden // J. Dairy Sci. — 2016. — V. 99. — p. 7274–7288 (<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10777>)