

Краткие сообщения

Рубрика

doi: 10.31043/2410-2733-2018-2-142-146
УДК 636.2+636.082.2Н. В. Ковалюк¹, В. Ф. Сацук², Е. В. Мачульская¹**Изучение влияния полиморфизма гена *MLN* быков-производителей голштинской породы на частоту возникновения смещения сычуга в потомстве**

Аннотация. Смещение сычуга — остропротекающая болезнь, характеризующаяся изменением положения органа и нарушением его функциональности. Исследования, связывающие определенные зоны генома крупного рогатого скота с проявлением данной патологии, продолжают проводиться, пока полученные результаты довольно противоречивы.

Цель проведенного исследования — изучить влияние полиморфизма *FN298674: g. 90 T → C* гена *MLN* (ген мотилина) быков-производителей голштинской породы на частоту возникновения смещения сычуга в их потомстве.

Нами сконструирована тест-система для ДНК-тестирования наличия мутации. Тест-система разработана на основе АС-ПЦР (аллель специфичной полимеразной цепной реакции). Проведено генотипирование по локусу *MLN* (ген гормона мотилина) выборки быков-производителей ($n=34$) голштинской породы (*World Wide Sires*). Достоверных отличий между наблюдаемым и ожидаемым распределением генотипов выявлено не было. Каждый из 34 генотипированных быков-производителей был оценен по качеству потомства (оценка декабрь 2017 года, количество дочерей — 17718, количество стад — 6048), с определением индекса риска возникновения смещения сычуга у дочерей. Диапазон значений индекса у генотипированных быков варьировал в интервале значений от 96 до 109. В проведенном исследовании не выявлено достоверной связи между индексом риска возникновения смещения сычуга у дочерей и *MLN* генотипом отца, что, возможно, указывает на отсутствие подобной связи. Полученные данные нуждаются в уточняющих исследованиях.

Ключевые слова: голштинский скот, ген *MLN*, аллель-специфическая ПЦР, тест-система.

Авторы:

Ковалюк Наталья Викторовна — доктор биологических наук, заведующая лабораторией биотехнологии; e-mail: NVK1972@yandex.ru;

Сацук Владимир Фёдорович — кандидат биологических наук, генеральный директор ООО Научно-производственное объединение «Юг-Плем»; e-mail: yug-plem@yandex.ru;

Мачульская Елена Витальевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии; e-mail: mellen14@yandex.ru.

¹ ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», 350055, Россия, г. Краснодар, п. Знаменский, ул. Первомайская 4;

² ООО Научно-производственное объединение «Юг-Плем», 350055, Россия, г. Краснодар, п. Знаменский, ул. Первомайская 1А.

Смещение сычуга — остропротекающая болезнь, характеризующаяся изменением положения органа и нарушением его функциональности.

В голштинской популяции Германии около 2% скота нуждаются в оперативном вмешательстве по причине смещения сычуга [1]. В популяции голштинов США — от 3 до 5% животных. Каждое

такое вмешательство приводит в США к потере порядка 500 \$ (wwsrussia.ru). В российской популяции голштинизированного скота проблема смещения сычуга затрагивает до 10% животных [2].

В отечественной и зарубежной литературе до сих пор нет единой точки зрения по вопросу о природе этого заболевания. Болезнь рассматривается

как результат нарушения технологии кормления и содержания животных, генетической предрасположенности коров, метаболических болезней [2].

Исследования, связывающие определенные зоны генома крупного рогатого скота с проявлением данной патологии, продолжают проводиться, пока полученные результаты довольно противоречивы.

Так, немецкими учеными в 2012 году было показано, что нуклеотидная замена (FN298674: g. 90 T → C) расположенная в первом не кодирующем экзоне гена мотилина (ген мотилина (*MLN*) отвечает за синтез одного из гормонов, регулирующих перистальтику пищеварительного тракта) приводит к значительному увеличению частоты встречаемости смещения сычуга в выборке животных, носителей генотипа CC по данному локусу [1].

Более поздние исследования отмечают значимые ассоциации между участками генома, расположенными на 1, 2, 3, 11, 13, 20, 23, 27 хромосомах крупного рогатого скота, и проявлением патологии [3,4].

В базе данных OMIA (ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS) данная патология (Abomasum displacement in *Bos taurus*) фигурирует только в разделе Total traits/disorders (OMIA: 001119-9913), что говорит о том, что конкретные полиморфные варианты локуса/локусов, отвечающие за смещение сычуга, пока не установлены, но есть все предпосылки считать, что таковые имеются. Также показатель «Disp. Abomasum» (смещение сычуга) с 2016 года включен в индекс здоровья (WT\$) голштинского скота и с определенной долей вероятности позволяет предполагать увеличение/снижение частоты встречаемости патологии у дочерей оцененных по этому показателю быков-производителей.

Из всех предлагаемых как маркерные точки генома нас заинтересовала в плане проверки соответствия конкретного полиморфизма (причины) и функционального нарушения (смещения сычуга) — нуклеотидная замена (FN298674: g. 90 T → C) в гене мотилина.

В данном случае возможно физиологическое объяснение такого проявления полиморфизма, поскольку мотилин — полипептидный гормон, который является регулятором моторики пищеварительного тракта.

Цель проведенного исследования — изучить влияние полиморфизма FN298674: g. 90 T → C гена *MLN* быков-производителей голштинской породы на частоту возникновения смещения сычуга в их потомстве.

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

Используя возможности GenBank и программы Primer Premier? нами была сконструирована тест-система для ДНК — тестирования наличия мутации. Тест-система разработана на основе АС-ПЦР (аллель специфичной полимеразной цепной реакции).

Ниже представлена нуклеотидная последовательность получаемых ПЦР-продуктов (198 пар нуклеотидов) и праймеров, используемых для генотипирования.

Sequence ID: NKLS 02000023.1, 7928799-7928998, хромосома 23,

GCCCAGGAAGGTGCTGAAAGGTGACA-GAGCACCGCAGGAACAGTGGGCTCACCCA-GAGAGCTCTGGGCTCAGCGGGCTCACTCACACCATCTCTGGGCTCAGGCTGACCACCCACACCCACTTCTCGGGCTACTCACAGTGCACTTGCGGTCTGAGTGGGCGGGGTGCAGCTCTCTCC[A/G]CTTGTCTTCTGGGGTC-CGG

Последовательность праймеров:

MLN1: 5' GCCCAGGAAGGTGCTGAAAG 3'

MLN2 (ДИКИЙ ТИП): 5' CCGGACCCAG-AAGACAAGT 3'

MLN3: 5' CGGACCCAGGAAGACAAGC 3'

Результативность амплификации оценивали в 2% агарозном геле.

Праймер MLN1 в паре со специфическим для аллеля Т праймером MLN2 позволял амплифицировать фрагмент аллеля Т длиной 198 п.н. Праймер MLN1 в паре с аллелеспецифическим для аллеля С праймером MLN3 позволял амплифицировать фрагмент аллеля С, также длиной 198 п.н.

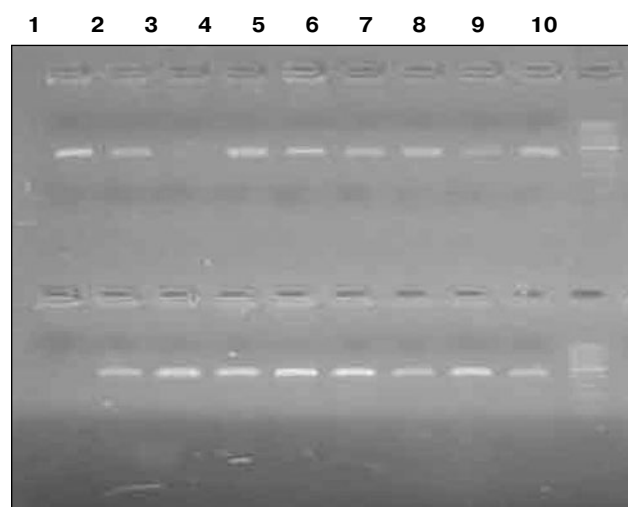


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *MLN*.

1 — животное с генотипом ТТ; 2, 4–9 — животные с генотипом ТС; 3 — животное с генотипом СС; 10 — маркер молекулярных весов (шаг 50 пар нуклеотидов)

Генотипирование одного животного, таким образом, проводили в двух пробирках. Гомозиготных ТТ животных выявляли по результирующей амплификации в пробирке с праймерами MNL1 и MNL2; гетерозиготных ТС — по результирующей амплификации в обеих пробирках; гомозиготных по мутации (генотип СС) — по результирующей амплификации в пробирке с праймерами MNL1 и MNL3.

Проведено генотипирование по локусу *MLN* (ген гормона мотилина) выборки быков — производителей голштинской породы (World Wide Sires), $n=34$. Результаты генотипирования представлены в таблице 1.

Достоверных отличий между наблюдаемым и ожидаемым распределением генотипов выявлено не было (ожидаемые результаты частот генотипов в исследуемых популяциях рассчитывали по закону Харди-Вайнберга, соответствие наблюдаемого и ожидаемого распределения генотипов проверяли методом хи-квадрат).

Каждый из 34 генотипированных быков-производителей был оценен по качеству потомства (оценка декабрь 2017 года, количество дочерей —

17718, количество стад — 6048), с определением индекса риска возникновения смещения сычуга у дочерей, выводимого из данных ветеринарных отчетов о состоянии здоровья животных коммерческих стад США. Диапазон значений индекса у генотипированных быков варьировал в интервале значений от 96 до 109.

Достоверность различий сравниваемых показателей оценивали по критерию Стьюдента:

$$t_d = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 + S_{\bar{x}_2}^2}},$$

где t_d — критерий достоверности разности, X_1 и X_2 — средние значения двух сравниваемых групп, $S_{\bar{x}_1}$ и $S_{\bar{x}_2}$ — ошибки репрезентативности средних значений.

В проведенном исследовании не выявлено достоверной связи между индексом риска возникновения смещения сычуга у дочерей и *MLN* генотипом отца, что, возможно, указывает на отсутствие подобной связи. Полученные данные нуждаются в уточняющих исследованиях.

Таблица 1. Частоты встречаемости генотипов *MLN* у быков-производителей голштинской породы

Генотип <i>MLN</i>	Частота встречаемости в группе быков-производителей ($n=34$)
ТТ	0.15
ТС	0.79
СС	0.06

Литература

1. Mömke S. Transcription factor binding site polymorphism in the motilin gene associated with left-sided displacement of the abomasum in German Holstein cattle / S. Mömke, M. Sickinger, J. Rehage, K. Doll, O. Distl // PLoS One. — 2012. — № 7(4). doi: 10.1371.
2. Калужный И. Продуктивность и смещения сычуга / И. Калужный, Н. Баринев, А. Гертман // Животноводство России. — 2013. — № 4. — С. 63–65.
3. Zerbin I. Genetics of bovine abomasum displacement / I. Zerbin, S. Lehner, O. Distl // Veterinary Journal. — 2015. — V. 204. — P. 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.02.013>.
4. Lehner S. A genome-wide association study for left-sided displacement of the abomasum using a high-density single nucleotide polymorphism array / S. Lehner, I. Zerbin, K. Doll, J. Rehage, O. Distl // J. Dairy Sci. — 2017. Pubmed reference: 29224884. DOI: 10.3168/jds.2017-13216.

Kovalyuk N. V.¹, Satsuk V. F.², Machulskaya E. V.¹

To study the effect of gene polymorphism *MLN* bulls of Holstein breed on the frequency of occurrence of displacement of abomasum in the offspring

Abstract. *The displacement of abomasum is disease characterized by a change in the position of authority and a breach of its functionality. Studies linking certain areas of the genome of cattle with the manifestation of this pathology continue to be carried out until the results are quite contradictory.*

*The goal of this research was to study the effect of polymorphism FN298674: g. 90 T → C the *MLN* gene (gene motilin) bulls of Holstein breed on the frequency of occurrence of displacement of abomasum in their offspring.*

*We have designed a test system for DNA testing of mutation. The test system is based on AC-PCR (allele specific polymerase chain reaction). Genotyping by *MLN* locus (the gene of the hormone motilin) of a sample of bulls (n=34) of Holstein breed (World Wide Sires) was carried out. There were no significant differences between the observed and expected distribution of genotypes. Each of the 34 genotyped bulls was evaluated by the quality of the offspring (estimated December 2017, the number of daughters — 17718, the number of herds — 6048), with the definition of the risk index of displacement of the stench in daughters. The range of index values in genotyped bulls varied in the range of values from 96 to 109. The study did not reveal a reliable relationship between the risk index of displacement of the stench in daughters and the father's *MLN* genotype, which may indicate the absence of such a relationship. The obtained data require follow-up studies.*

Key words: Holstein cattle, the *MLN* gene, allele — specific PCR test-system.

Authors:

Kovalyuk N. — Doctor Habil. (Biol. Sci.), Head of the Laboratory of Biotechnology of the, e-mail: NVK1972@yandex.ru;

Satsuk V. — PhD (Biol. Sci.), General Director, Research and Production Association «Yug-Plem» Ltd; e-mail: yug-plem@yandex.ru;

Machulskaya E. — PhD (Biol. Sci.), leading researcher of the «Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine», 4 Pervomaiskaya Str., Znamensky, 350055, Krasnodar, Russia, e-mail: mellen14@yandex.ru.

¹ «Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary Medicine», 4 Pervomaiskaya Str., Znamensky, 350055, Krasnodar, Russia;

² Research and Production Association «Yug-Plem» Ltd, 1A Pervomaiskaya Str., Znamensky, 350055, Krasnodar, Russia.

References

1. Mömke S. Transcription factor binding site polymorphism in the motilin gene associated with left-sided displacement of the abomasum in German Holstein cattle / S. Mömke, M. Sickinger, J. Rehage, K. Doll, O. Distl // PLoS One. — 2012. — № 7(4). doi: 10.1371.
2. Kaljuzhnyj I. Produktivnost' i smeshheniya sychuga / I. Kaljuzhnyj, N. Barinov, A. Gertman // Zhivotnovodstvo Rossii. — 2013. — № 4. — P. 63–65.
3. Zerbin I. Genetics of bovine abomasum displacement / I. Zerbin, S. Lehner, O. Distl // Veterinary Journal. — 2015. — V. 204. — P. 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.02.013>.
4. Lehner S. A genome-wide association study for left-sided displacement of the abomasum using a high-density single nucleotide polymorphism array / S. Lehner, I. Zerbin, K. Doll, J. Rehage, O. Distl // J. Dairy Sci. — 2017. Pubmed reference: 29224884. DOI: 10.3168/jds.2017-13216.