

А. С. Абдельманова, М. С. Форнара, Н. А. Чурбакова

Разработка системы идентификации аллелей локуса BoLA-DRB3.2 в образцах крупного рогатого скота, содержащих деградированную ДНК

Аннотация.

Цель: разработать систему идентификации аллелей локуса BoLA-DRB3.2, направленных на амплификацию коротких целевых фрагментов с последующим секвенированием по Сэнгеру, пригодную для исследования образцов, содержащих поврежденную ДНК.

Материалы и методы. Впервые разработана тест-система для секвенирования полиморфного участка гена BoLA-DRB3 по Сэнгеру, пригодная для анализа деградированной ДНК. Апробацию системы проводили на 10 современных и 4 древних образцах КРС. Выравнивание последовательностей и типирование аллелей проводилось с помощью программы UGENE v1.32.0 и онлайн ресурса BLAST.

Результаты. Разработана тест-система, позволяющая амплифицировать фрагмент локуса BoLA-DRB3.2, пригодный для дальнейшего анализа посредством секвенирования по Сэнгеру и типирования аллелей. Проанализировано 4 образца ДНК, полученной из древних образцов, предоставленных институтом археологии РАН. В качестве группы сравнения использовались 13 образцов разных пород современных представителей крупного рогатого скота. Для всех исследованных образцов удалось получить последовательности высоко-полиморфного фрагмента второго экзона локуса BoLA-DRB3.2 длиной 114 п.о., расположенного на BTA23:25 730 221-25 730 334 (сборка ARS-UCD2.0, GenBank: GCF_002263795.3). Однако при прочтении последовательностей части образцов некоторые нуклеотиды были определены неоднозначно. Удалось достаточно уверенно типировать аллели для 10 из 13 образцов: идентичность анализируемых последовательностей с референсными последовательностями аллелей составляла более 99 %. Три современных образца были идентифицированы с меньшим уровнем идентичности (95,536, 96,429 и 98,214 % соответственно для MOD1, MOD9 и MOD8), что может быть связано с неточным прочтением нуклеотида в процессе секвенирования.

Ключевые слова: КРС; древние образцы; деградированная ДНК; устойчивость к лейкозу; аллели BoLA-DRB3; секвенирование по Сэнгеру

Авторы:

Абдельманова А. С. — доктор биологических наук; e-mail: abdelmanova@vij.ru;

Форнара М. С. — кандидат биологических наук, e-mail: margaretforanara@gmail.com;

Чурбакова Н. А. — аспирант, e-mail: nadushik95@mail.ru.

ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста; 142132, Российская Федерация, Московская область, Городской округ Подольск, п. Дубровицы, д. 60.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Министерства науки и высшего образования РФ (тема FGGN-2024-0015).*

Введение. Главный комплекс гистосовместимости (ГКГ) представляет собой группу тесно связанных генов, формирующих генетический компонент иммунной системы млекопитающих [1]. У крупного рогатого скота ГКГ состоит из трех копий DRB класса II, причем ген BoLA-DRB3 является наиболее высокоэкспрессируемым, функциональным и полиморфным. Полиморфизм DRB3 в основном сосредоточен во втором экзоне. [2]. На настоящий момент в базе данных иммунополиморфизма (IPD)-МНС (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA/>) зарегистрировано более 300 аллелей

DRB3. Показано, что ген BoLA-DRB3 связан с формированием иммунной реакции на некоторые инфекционные заболевания, такие как мастит [3], папилломавирусная инфекция [4], инфекция вируса герпеса 1 типа [5], ящур [6].

Значительное количество работ было направлено на исследование связи аллелей BoLA-DRB3 с устойчивостью или чувствительностью к лейкозу КРС [7–9]. Выявлено, что некоторые BoLA-DRB3 связаны с устойчивостью или чувствительностью к лейкозу крупного рогатого скота. Ху А. с соавт. показали, что присутствие глутаминовой кислоты и аргинина в позициях

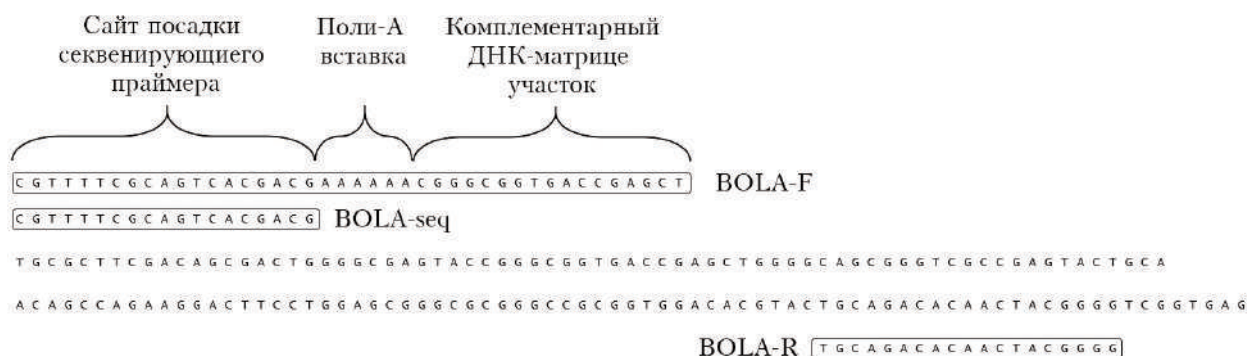


Рис. 1. Схема подбора праймеров к участку референсной последовательности. Праймер BOLA-R дан в форме комплементарной последовательности.

70–71 аминокислотной последовательности способствует устойчивости к развитию персистентного лимфоцитоза [10]. Позже Carignano Н. А. с соавт. [11] подтвердил эти данные и предложил расширенный список аминокислот в заданных позициях (Ser¹³ -Glu⁷⁰ -Arg⁷¹ -Glu⁷⁴ (pocket 4), Ser¹¹ -Ser³⁰ (pocket 6), Glu²⁸ -Trp⁶¹ -Arg⁷¹ (pocket 7) and Asn³⁷ -Asp⁵⁷ (pocket 9)), для которых выявлена значимая связь со снижением уровня инфекции (<1% циркулирующих инфицированных В-клеток).

Тенденция к снижению генетического разнообразия пород скота во всем мире ставит под угрозу устойчивое развитие сельского хозяйства. В большей степени это касается коммерческих пород с высоким уровнем селекционного давления, в которых отбор часто направлен на повышение продуктивных качеств без учета устойчивости к заболеваниям. Однако локальные породы также могут терять генетическое разнообразие в результате улучшения их высокопродуктивными транграничными породами. В этом случае анализ частот аллелей, связанных с резистентностью к заболеваниям, не будет отражать разнообразие локальных пород по данному локусу, что не позволит в полной мере оценить их генетическую устойчивость к инфекционным заболеваниям и вести селекционную работу, направленную на сохранение в популяциях желательных аллелей.

Включение в анализ образцов разных временных периодов позволяет рассматривать генофонд локальных пород до начала массового улучшения коммерческими породами. Однако существующие на сегодняшний день и активно используемые методы генотипирования аллелей локуса *BoLA-DRB3* – аллель-специфическая ПЦР, ПЦР-ПДРФ – не могут быть применены для анализа деградированной ДНК, содержащейся в древних образцах. Проведение полногеномного секвенирования для определения нуклеотидных последовательностей разных аллелей *BoLA-DRB3.2* экономически нецелесообразно ввиду высокой стоимости этого вида анализа.

Цель наших исследований состояла в том, чтобы разработать систему идентификации аллелей локуса *BoLA-DRB3.2*, направленных на амплификацию коротких целевых фрагментов с последующим секвенированием по Сэнгеру, пригодную для исследования образцов, содержащих поврежденную ДНК.

Материалы и методы. В качестве биологического материала для разработки тест-системы были использованы образцы современной породы (MOD, n=13) и ДНК из древних образцов крупного рогатого скота (ANC, n=4).

Древние образцы были получены из биобанка Института археологии РАН. Все работы, связанные с выделением ДНК из древних образцов, проводились в лаборатории, специально оборудованной для этих целей. Современные образцы получены из банка генетического материала ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста. Исследование проводили на базе оборудования Центра коллективного пользования «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста.

Последовательности, полученные в результате секвенирования по Сэнгеру, были выравнены и проанализированы с использованием программ MEGA v11.0.11 [12] и UGENE v1.32.0 [13]. Типирование аллелей локуса *BoLA-DRB3.2* для полученных последовательностей проводилось с



Рис. 2. Электрофореграмма результатов амплификации фрагмента локуса *BoLA-DRB3.2* современных и древних образцов крупного рогатого скота. MOD – современные образцы, ANC – древние образцы, M-100+bp – маркер молекулярного веса.

помощью ресурса BLAST [14].

Тест-система для секвенирования полиморфного участка гена *BoLA-DRB3* включала набор из трёх праймеров: прямого (BOLA-F, 5'-C G T T T T C G C A G T C A C G A C -GAAAAACGGGCGGTGACCGAGCT -3'), обратного (BOLA-R, 5'-CCCCGTAGTTGTGTCTG-CA-3') и секвенирующего (BOLA-seq, 5'-CGTTTTCGACGTCACGACG -3'). Прямой и обратный праймеры были подобраны к консервативным участкам ДНК, между которыми был расположен исследуемый полиморфный локус. Поскольку одним из основных требований при создании тест-системы было обеспечение возможности работы с деградированной ДНК-матрицей, сайты посадки прямого и обратного праймера расположили максимально близко друг к другу. Учитывая, что секвенирование методом Сэнгера коротких ПЦР-фрагментов затруднено ввиду наличия избыточного количества артефактных сигналов, прямой праймер был искусственно удлинен и состоял из трех условных частей: 3'-специфичного участка, комплементарного ДНК-матрице, небольшой поли-А вставки, находящейся в центральной части, и сайта посадки секвенирующего праймера, локализованного на 5'-конце олигонуклеотида. Последовательность секвенирующего праймера не имеет сайтов посадки в геноме *Bos taurus* (рис. 1).

Общая длина амплифицируемого фрагмента составляла 137 пар нуклеотидов, целевого участка, расположенного между сайтами посадки прямого и обратного праймеров – 75. Для этапа ПЦР использовали пару праймеров BOLA-F и BOLA-R, для секвенирования – только BOLA-seq.

Результаты и обсуждение. Амплификацию проводили на термоциклере Applied Biosystems SimpliAmp («Thermo-Fisher Scientific, Inc.», США) в конечном объеме 25 мкл, в том числе 2,5 мкл реакционного буфера (10X Taq Turbo буфер) («Евроген» Россия), 16,8 мкл H₂O, 2,5 мкл dNTPs, 1 мкл смеси праймеров 10пмоль, 0,2 мкл SmartTaq ДНК полимеразы («Диалат Лтд.», Россия), 1 мкл ДНК. Условия температурно-временного режима ПЦР были следующими: начальная денатурация (94 °C в течение 3 мин); 94 °C в течение 10 сек, 62 °C в течение 15 сек, 72 °C в течение 45 сек (40 циклов); заключительная элонгация (72 °C в течение 7 мин). Детекцию результатов ПЦР выполняли в 2 %-ном агарозном геле с использованием колориметрической системы документации на геле Uvitec FireReader V10 imaging System (Cleaver scientific, Великобритания) (рис. 2).

Очистку ампликонов проводили с использованием набора для очистки ДНК из реакционной

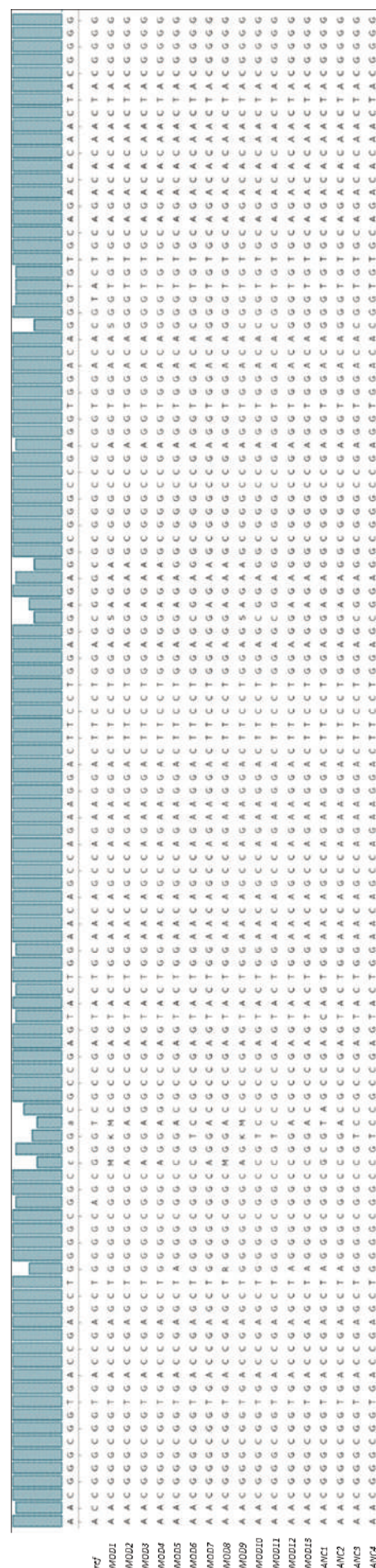


Рис. 3. Последовательности фрагмента локуса *BoLA-DRB3.2* современных и древних образцов, полученные с помощью секвенирования по Сэнгеру. MOD – современные образцы, ANC – древние образцы.

смеси и агарозного геля Cleanup-Mini («Евроген» Россия). Услуги секвенирования методом Сэнгера предоставляла компания «Евроген» (Россия). В качестве референса для выравнивания последовательностей, полученных в результате секвенирования, использовали последовательность аллеля BoLA-DRB3*010:02 (GenBank: AB610121.1) главного комплекса гистосовместимости.

В результате исследований была разработана тест-система, позволяющая амплифицировать фрагмент локуса BoLA-DRB3.2, пригодный для дальнейшего анализа посредством секвенирования по Сэнгеру и типирования аллелей.

С использованием разработанной тест-системы было проанализировано 4 образца ДНК, полученной из древних образцов, предоставленных институтом археологии РАН. В качестве группы сравнения использовались 13 образцов разных пород современных представителей крупного рогатого скота (рис. 3).

Как видно на рисунке 3, для всех исследованных образцов удалось получить последовательно-

сти высокополиморфного фрагмента второго экзона локуса BoLA-DRB3.2 длиной 114 п.о., расположенного на BTA23:25 730 221-25 730 334 (сборка ARS-UCD2.0, GenBank: GCF_002263795.3). Однако при прочтении последовательностей образцов MOD1, MOD8 и MOD9 некоторые нуклеотиды были определены неоднозначно (R — гуанин/аденин, S — гуанин/цитозин, K — гуанин/тимин, M — аденин/цитозин).

Тем не менее секвенированные последовательности фрагмента второго экзона позволили определить аллели локуса BoLA-DRB3.2 в исследованных образцах и идентифицировать их статус по отношению к лейкозу крупного рогатого скота (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, для большинства образцов удалось достаточно уверенно типировать аллели: идентичность анализируемых последовательностей с референсными последовательностями аллелей, представленными в базе данных иммунополиморфизма (IPD)-MHC, составляла более 99 %. Три современных образца были

Таблица 1. Идентификация аллелей локуса BoLA-DRB3.2 в современных и древних образцах на основании последовательностей фрагмента 2 экзона

Номер образца	Название аллеля	Идентичность, %	Статус по отношению к лейкозу
ref	BOLA03115 BoLA-DRB3*010:02	100	Н
MOD1	BOLA03100 BoLA-DRB3*001:01	95,536	Ч
	BOLA03246 BoLA-DRB3*064:02		Н
MOD2	BOLA03100 BoLA-DRB3*001:01	99,107	Ч
MOD3	BOLA03100 BoLA-DRB3*001:01	99,107	Ч
MOD4	BOLA03100 BoLA-DRB3*001:01	99,107	Ч
MOD5	BOLA03289 BoLA-DRB3*027:10	100	Н
MOD6	BOLA03116 BoLA-DRB3*011:01	100	Ч
MOD7	BOLA03100 BoLA-DRB3*001:01	100	Ч
MOD8	BOLA03100 BoLA-DRB3*001:01	98,214	Ч
MOD9	BOLA03100 BoLA-DRB3*001:01	96,429	Ч
MOD10	BOLA03116 BoLA-DRB3*011:01	100	Ч
MOD11	BOLA03116 BoLA-DRB3*011:01	100	Ч
MOD12	BOLA03289 BoLA-DRB3*027:10	100	Н
MOD13	BOLA03289 BoLA-DRB3*027:10	100	Н
ANC1	BOLA09800 BoLA-DRB3*007:05	99,107	Н
ANC2	BOLA03289 BoLA-DRB3*027:10	100	Н
ANC3	BOLA03116 BoLA-DRB3*011:01	100	Ч
ANC4	BOLA03116 BoLA-DRB3*011:01	100	Ч

Примечание: ref – референсная последовательность, MOD – современные образцы, ANC – древние образцы; Ч – аллели, способствующие чувствительности к лейкозу, У – аллели, способствующие устойчивости к лейкозу, Н – нейтральные аллели или аллели с неизвестным пока статусом. Значения идентичности рассчитаны с использованием ресурса BLAST.

идентифицированы с меньшим уровнем идентичности (95,536, 96,429 и 98,214 %, соответственно для MOD1, MOD9 и MOD8). Это может быть связано с неточным прочтением нуклеотида в процессе секвенирования.

В выборке современных образцов было выявлено 9 животных, несущих чувствительный аллель, 3 животных с нейтральными аллелями. У одной особи не удалось четко дифференцировать чувствительный или нейтральный аллель. Животных-носителей аллелей устойчивости к лейкозу выявлено не было. В выборке древних образцов 2 животных несли чувствительные аллели и 2 — нейтральные. Отсутствие аллелей, связанных с устойчивостью к лейкозу, по всей видимости связано с малым размером выборок.

Заключение. Разработанный нами метод анализа последовательностей фрагмента второго экзона локуса BoLA-DRB3.2 позволил провести типирование аллелей, связанных с устойчивостью или чувствительностью к лейкозу крупного рогатого скота. Баланс между стоимостью,

трудоемкостью и количеством получаемой генетической информации выгодно отличает представленную тест-систему от других методов анализа, таких как полногеномное секвенирование, ПЦР-ПДРФ или аллель-специфическая ПЦР. Разработанная тест-система пригодна для анализа как современных, так и древних образцов. Это позволяет проводить массовый скрининг ныне существующих популяций, получая расширенную (по сравнению с ПЦР-ПДРФ или аллель-специфической ПЦР) информацию о последовательностях аллелей, потенциально связанных с устойчивостью или чувствительностью не только к лейкозу, но и к другим инфекционным заболеваниям.

Привлечение в анализ древних образцов может быть полезно для мониторинга изменения разнообразия аллелей, связанных с иммунным ответом на заболевания, и уточнения направления селекционной работы с породами с учетом сохранения наиболее желательных аллельных вариантов.

Благодарности.

Костные остатки крупного рогатого скота из археологических раскопок предоставлены сотрудниками Лаборатории естественнонаучных методов ИА РАН к.б.н. с.н.с. Е. Е. Антипиной и к.и.н. с.н.с. Л. В. Яворской в рамках Договора о сотрудничестве между ФГБУН ИА РАН и ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста.

Литература

1. Mandefro A. Genetic assessment of *BoLA-DRB3* polymorphisms by comparing Bangladesh, Ethiopian, and Korean cattle / A. Mandefro, T. Sisay, Z. Edea, M. R. Uzzaman, K. S. Kim, H. Dadi // J. Anim Sci Technol. — 2021. — Vol. 2. — P. 248–261. doi: 10.5187/jast.2021.e37.
2. Ilie D. E. Kompetitive Allele Specific PCR Genotyping of 89 SNPs in Romanian Spotted and Romanian Brown Cattle Breeds and Their Association with Clinical Mastitis / D. E. Ilie, D. Gavojdian et al. // Animals. — 2023. — Vol. 9. — P. 1484. doi:10.3390/ani13091484.
3. Welderufael B. G. Genome-Wide Association Study for Susceptibility to and Recoverability From Mastitis in Danish Holstein Cows / B. G. Welderufael, P. Lovendahl, D. J. de Koning, L. L. G. Janss, W. F. Fikse // Front Genet. — 2018. — P. 141. doi: 10.3389/fgene.2018.00141.
4. Longeri M. Association Between BoLA-DRB3.2 Polymorphism and Bovine Papillomavirus Infection for Bladder Tumor Risk in Podolica Cattle / M. Longeri, Russo V., M. G. Strillacci et al. // Front Vet Sci. — 2021. — Vol. 8. — P. 630089. doi: 10.3389/fvets.2021.630089.
5. Morales J. P. A. Association of *BoLA DRB3* gene polymorphisms with BoHV-1 infection and zootechnical traits / J. P. A. Morales, A. Lopez-Herrera, J. E. Zuluaga // Open Vet. J. — 2020. — Vol. 10. — P. 331–339. doi: 10.4314/ovj.v10i3.12.
6. Othman O. E. Five *BoLA-DRB3* genotypes detected in Egyptian buffalo infected with Foot and Mouth disease virus serotype O / O. E. Othman, M. G. Khodary, A. H. El-Deeb, H. A. Hussein // J. Genet. Eng. Biotechnol. — 2018. — Vol. 2. — P. 513–518. doi:10.1016/j.jgeb.2018.02.009.
7. LaHuis C. H. Identification of BoLA Alleles Associated with BLV Proviral Load in US Beef Cows / C. H. LaHuis, O. J. Benitez et al. // Pathogens. — 2022. — Vol. 10. — P. 1093. doi: 10.3390/pathogens11101093.
8. Lo C. Bovine major histocompatibility complex (BoLA) heterozygote advantage against the outcome of bovine leukemia virus infection / C. Lo, S. Takeshima, S. Wada, Y. Matsumoto, Y. Aida // HLA. — 2021. — Vol. 2. — P. 132–139. doi: 10.1111/tan.14285.

9. Lo C.-W. *BoLA-DRB3* Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load / C.-W. Lo, L. Borjigin et al. // *Viruses*. — 2020. — Vol. 3. — P. 352. doi: 10.3390/v12030352.
10. Xu A. Polymorphism in *BoLA-DRB3* exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus / A. Xu, M. J. van Eijk, C. Park, H. A. Lewin // *J. Immunol.* — 1993. — Vol. 12. — P. 6977–6985.
11. Carignano H. A. *BOLA-DRB3* gene polymorphisms influence bovine leukaemia virus infection levels in Holstein and Holstein Friesian Jersey crossbreed dairy cattle / H. A. Carignano, M. J. Beribe et al. // *Anim Genet.* — 2017. — Vol. 4. — P. 420–430. doi: 10.1111/age.12566.
12. Tamura K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 / K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution*. — 2021. — Vol. 38. — P. 3022–3027.
13. Rose R. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE / R. Rose, O. Golosova, D. Sukhomlinov, A. Tiunov, M. Prosperi // *Bioinformatics*. — 2019. — Vol. 11. — P. 1963–1965. doi:10.1093/bioinformatics/bty901.
14. Camacho C. ElasticBLAST: accelerating sequence search via cloud computing / C. Camacho, G. M. Boratyn, V. Joukov, R. Vera Alvarez, T. L. Madden // *BMC Bioinformatics*. — 2023. — Vol. 1. — P. 117. doi: 10.1186/s12859-023-05245-9.

Abdelmanova A., Fornara M., Churbakova N.

Development of a system for identifying alleles of the *BoLA-DRB3.2* locus in cattle samples containing degraded DNA

Abstract.

Purpose: Development a system for identifying alleles of the *BoLA-DRB3.2* locus aimed at amplifying short target fragments with subsequent Sanger sequencing, suitable for studying samples containing damaged DNA.

Materials and methods. For the first time, a test system for sequencing the polymorphic region of the *BoLA-DRB3* gene according to Sanger was developed, suitable for analyzing degraded DNA. The system was tested on 10 modern and 4 ancient cattle samples. Sequence alignment and allele typing were performed using the UGENE v1.32.0 program and the BLAST online resource.

Results. A test system was developed that allows amplifying a fragment of the *BoLA-DRB3.2* locus suitable for further analysis using Sanger sequencing and allele typing. Four DNA samples obtained from ancient samples provided by the Institute of Archaeology of the Russian Academy of Sciences were analyzed. A total of 13 samples of modern cattle of different breeds were used as a comparison group. For all studied samples, it was possible to obtain sequences of a highly polymorphic fragment of the second exon of the *BoLA-DRB3.2* locus, 114 bp long, located at BTA23:25730221-25730334 (ARS-UCD2.0 assembly, GenBank: GCF_002263795.3). However, some nucleotides were identified ambiguously during sequencing for some samples. It was possible to confidently type alleles for 10 out of 13 samples: the identity of the analyzed sequences with the reference allele

sequences was more than 99 %. Three modern samples were identified with a lower identity level (95,536, 96,429 and 98,214 %, respectively, for MOD1, MOD9 and MOD8), which may be due to inaccurate reading of the nucleotide during sequencing.

Key words: cattle; ancient samples; degraded DNA; resistance to leukemia; BoLA-DRB3 alleles; Sanger sequencing

Authors:

Abdelmanova A. — PhD (Biol.Sci.), e-mail: abdelmanova@vij.ru

Fornara M. — PhD (Biol.Sci.), e-mail: margaretfornara@gmail.com

Churbakova N. — post-graduate student; e-mail: nadushik95@mail.ru

L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry; 142132, Russian Federation, Moscow region, Podolsk city district, Dubrovitsy settlement, 60.

References

1. Mandefro A. Genetic assessment of *BoLA-DRB3* polymorphisms by comparing Bangladesh, Ethiopian, and Korean cattle / A. Mandefro, T. Sisay, Z. Edea, M. R. Uzzaman, K. S. Kim, H. Dadi // J. Anim Sci Technol. — 2021. — Vol.2. — P. 248–261. doi: 10.5187/jast.2021.e37.
2. Ilie D. E. Kompetitive Allele Specific PCR Genotyping of 89 SNPs in Romanian Spotted and Romanian Brown Cattle Breeds and Their Association with Clinical Mastitis / D. E. Ilie, D. Gavojdian et al. // Animals. — 2023. — Vol. 9. — P. 1484. doi:10.3390/ani13091484.
3. Welderufael B. G. Genome-Wide Association Study for Susceptibility to and Recoverability From Mastitis in Danish Holstein Cows / B. G. Welderufael, P. Lovendahl, D. J. de Koning, L. L. G. Janss, W. F. Fikse // Front Genet. — 2018. — P. 141. doi: 10.3389/fgene.2018.00141.
4. Longeri M. Association Between BoLA-DRB3.2 Polymorphism and Bovine Papillomavirus Infection for Bladder Tumor Risk in Podolica Cattle / M. Longeri, Russo V., M. G. Strillacci et al. // Front Vet Sci. — 2021. — Vol. 8. — P. 630089. doi: 10.3389/fvets.2021.630089.
5. Morales J. P. A. Association of *BoLA DRB3* gene polymorphisms with BoHV-1 infection and zootechnical traits / J. P. A. Morales, A. Lopez-Herrera, J. E. Zuluaga // Open Vet. J. — 2020. — Vol. 10. — P.331–339. doi: 10.4314/ovj.v10i3.12.
6. Othman O. E. Five *BoLA-DRB3* genotypes detected in Egyptian buffalo infected with Foot and Mouth disease virus serotype O / O. E. Othman, M. G. Khodary et al. // J. Genet. Eng. Biotechnol. — 2018. — Vol. 2. — P. 513–518. doi:10.1016/j.jgeb.2018.02.009.
7. LaHuis C. H. Identification of BoLA Alleles Associated with BLV Proviral Load in US Beef Cows / C. H. LaHuis, O. J. Benitez et al. // Pathogens. — 2022. — Vol. 10. — P. 1093.
8. Lo C. Bovine major histocompatibility complex (BoLA) heterozygote advantage against the outcome of bovine leukemia virus infection / C. Lo, S. Takeshima, S.Wada, Y. Matsumoto, Y. Aida // HLA. — 2021. — Vol. 2. — P. 132–139. doi: 10.1111/tan.14285.
9. Lo C.-W. *BoLA-DRB3* Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load / C.-W. Lo, L. Borjigin et al. // Viruses. — 2020. — Vol. 3. — P. 352.
10. Xu A. Polymorphism in *BoLA-DRB3* exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus / A. Xu, M. J. van Eijk, C. Park, H. A. Lewin // J. Immunol. — 1993. — Vol.12. — P. 6977–6985.
11. Carignano H. A. *BOLA-DRB3* gene polymorphisms influence bovine leukaemia virus infection levels in Holstein and Holstein × Jersey crossbreed dairy cattle / H. A. Carignano, M. J. Beribe et al. // Anim Genet. — 2017. — Vol. 4. — P. 420–430. doi: 10.1111/age.12566.
12. Tamura K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 / K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar // Molecular Biology and Evolution. — 2021. — Vol. 38. — P. 3022–3027.
13. Rose R. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE / R. Rose, O. Golosova, D. Sukhomlinov, A. Tiunov, M. Prosperi // Bioinformatics. — 2019. — Vol. 11. — P. 1963–1965. doi:10.1093/bioinformatics/bty901.
14. Camacho C. ElasticBLAST: accelerating sequence search via cloud computing / C. Camacho, G. M. Boratyn, V. Joukov, R. Vera Alvarez, T. L. Madden // BMC Bioinformatics. — 2023. — Vol. 1. — P. 117.