

# Применение ПЦР в выявлении животных-носителей вредных рецессивных мутаций

# Генные болезни

Генные болезни - это группа заболеваний, обусловленных мутациями на генном уровне.

Общая частота генных болезней в популяциях людей – **2 - 4%**.

В настоящее время описано более 5 тысяч таких наследственных болезней.

РЕГИСТРИРУЕМЫЕ В КАТАЛОГАХ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕФЕКТЫ КРУПНОГО РОГАТГО СКОТА.

Сокращенное обозначение	Английская транскрипция	Фенотипическое выражение
TV	<b>Tested free of Complex Vertebral Malformation</b>	Свободен от дефекта <b>Complex Vertebral Malformation (CVM)</b> . Уродства, аборт.
<b>CV</b>	<b>Complex Vertebral Malformation (CVM).</b>	Носитель <b>Complex Vertebral Malformation (CVM)</b>
BD	<b>Bulldog</b>	Бульдогообразие.
HL	<b>Hairless.</b>	Облысение
MF	<b>Mule-Foot (Syndactelism).</b>	Сросшиеся мулоподобные копыта.
PG	<b>Prolonged Gestation.</b>	Удлиненная стельность.
DF	<b>Dwarfism.</b>	Карликовость.
IS	<b>Imperfect Skin.</b>	Складчатость кожи.
<b>BL</b>	<b>Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency – BLAD.</b>	Лейкоцитарная адгезия, пониженная резистентность к бактериальным инфекциям.
PT	<b>Pink Tooth (Porphyria)</b>	Розовые зубы.
<b>DP</b>	<b>Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase (DUMPS).</b>	Дефицит монофосфатсинтетазы. Эмбриональная гибель.
TM	<b>Recessive Tested for Mulefoot.</b>	Тестирование по потомкам на носительство <b>Mulefoot</b> .
TD	<b>Tested free of DUMS</b>	Проверено и свободен от <b>DUMPS</b> .
TL	<b>Tested free of BLAD.</b>	Проверено и свободен от <b>BLAD</b> .
RC	<b>carrier of Red Hair Color.</b>	Носитель рецессивной красной масти.

1. **VLAD** (синдром врожденного иммунодефицита, ген *ITGB2*)
2. **CVM** (комплексный порок позвоночника, ген *SLC35A3*)
3. **DUMS** (синдром недостаточности энзим- системы уридин- монофосфатазы, ген *UMPS*)
4. **BC** (цитрулинемия, ген *ASS*)
5. **FXID** (дефицит фактора XI, ген *FXI*)
6. **BY** (брахиспина, ген *FANCI*)
7. **HCD** (синдром недостатка холестерина, 2015)
8. **ECR F18** (гена рецептора E. coli F18)
9. Гаплотипы **НН1**( ген *APAF1*, 5 хромосома), **НН2** (ген не найден, 1 хромосома), **НН3** (ген *SMC2*, 8 хромосома), **НН4** (ген *GART*, 1 хромосома), **НН5** (ген не найден, 9 хромосома)

**VLAD** – Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency  
(дефицит адгезивности лейкоцитов).

Заболевание у крупного рогатого скота было впервые описано в 1983 году под названием "гранулоцитарный синдром"

- Причина - точечная мутация в кодирующей части аутосомного гена CD18. Этот ген контролирует синтез гликопротеида В-интегрина, играющего ключевую роль в миграции нейтрофилов к очагу воспаления.

Точечная замена аденин-гуанин в 383 положении гена CD18 приводит к аминокислотной замене последовательности соответствующей белковой молекулы (аспарагиновая кислота - глицин). Эта мутация ведет к исчезновению сайта рестрикции для рестриктазы TaqI. Фенотипически мутация проявляется только у гомозиготных животных, которые гибнут в первые месяцы развития.

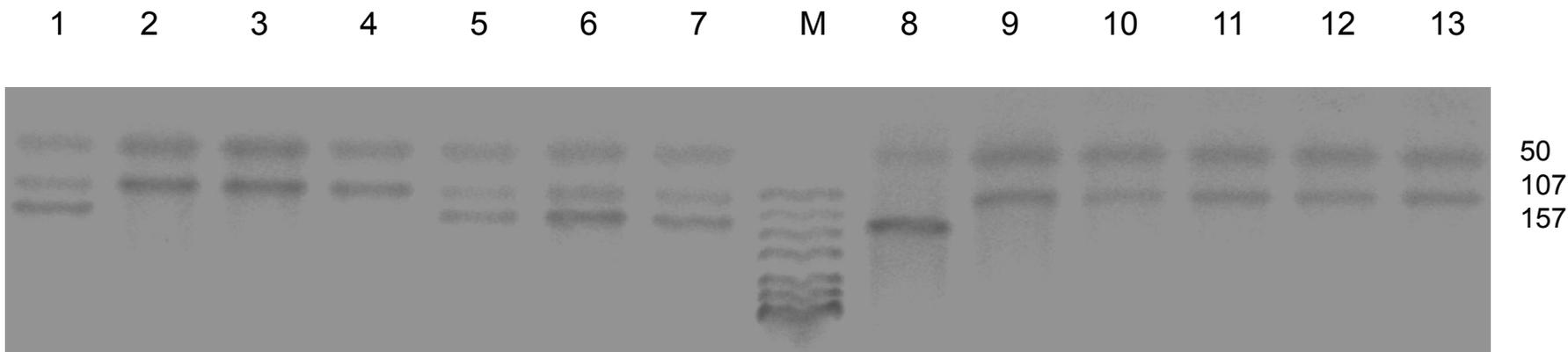
В Россию VLAD был завезен вместе с потомками Айвенго Белла.

По нашим данным частота встречаемости мутации сейчас в племенных хозяйствах России 1-2%

Заболевание характеризуется пониженной резистентностью к бактериальным инфекциям с последующим развитием язвенного стоматита, пневмонии, бактериальных энтеритов, сопровождающихся нейтрофилией и ранним летальным исходом.

прямой - AGGCAGTTGCGTTCAACGTGA  
обратный - CCGACTCGGTGATGCCATTGA

ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл, содержащем 1-2 ед. Taq - полимеразы (Силекс М), по 0,25 mM каждого dNTP, 67 mM трис -HCl pH 8,6, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16,6 mM NH<sub>4</sub>OH . по 0,5 мкм каждого праймера и 100-150 нг ДНК. Программа включала в себя первоначальную денатурацию (95 С, 1 мин), 40 циклов, состоящих из следующих повторяющихся друг за другом этапов - денатурация - 95 С, 1 мин, отжиг праймеров - 62 С, 1 мин, синтез - 72 С, 1 мин; финальный синтез - 72 С, 5 мин. Полученный амплификат для определения VLAD резали при помощи 3-4 ед. рестриктазы TaqI (Fermentas) при температуре 56 С в течении 2 часов. Полученную и обработанную рестриктазы ДНК подвергали электрофорезу 2% агарозном геле, и анализировали на трансиллюминаторе при УФ-свете.



Результаты ПЦР при аттестации быков на носительство генетического дефекта BLAD.

*2, 3, 4, 9-13 - норма;*

*1, 5, 6, 7 - носители мутации BLAD;*

*8 – гомозиготный носитель мутации BLAD;*

*M – маркер pUC19 DNA/MspI;*

*справа показана длина рестрикционных фрагментов.*

<b>Хозяйство</b>	<b>исследовано голов</b>	<b>Носители BLAD, %</b>	<b>Носители CVM, %</b>
<b>ЗАО ПЗ «Рабитицы» (высокопродуктивные коровы)</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>ЗАО ПЗ «Лесное» (коровы)</b>	<b>80</b>	<b>2,50</b>	<b>10</b>
<b>ЗАО ПЗ «Петровский» (коровы)</b>	<b>125</b>	<b>0</b>	<b>1,6</b>
<b>ЗАО ПЗ «Гражданский» (коровы)</b>	<b>125</b>	<b>1,6</b>	<b>0,8</b>
<b>Рабитицы</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Ленинский путь (ремонтные бычки)</b>	<b>14</b>	<b>0</b>	<b>7,14</b>
<b>Петровский (ремонтные бычки)</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>5,88</b>
<b>Итого</b>	<b>415</b>	<b>0,96</b>	<b>3,13</b>

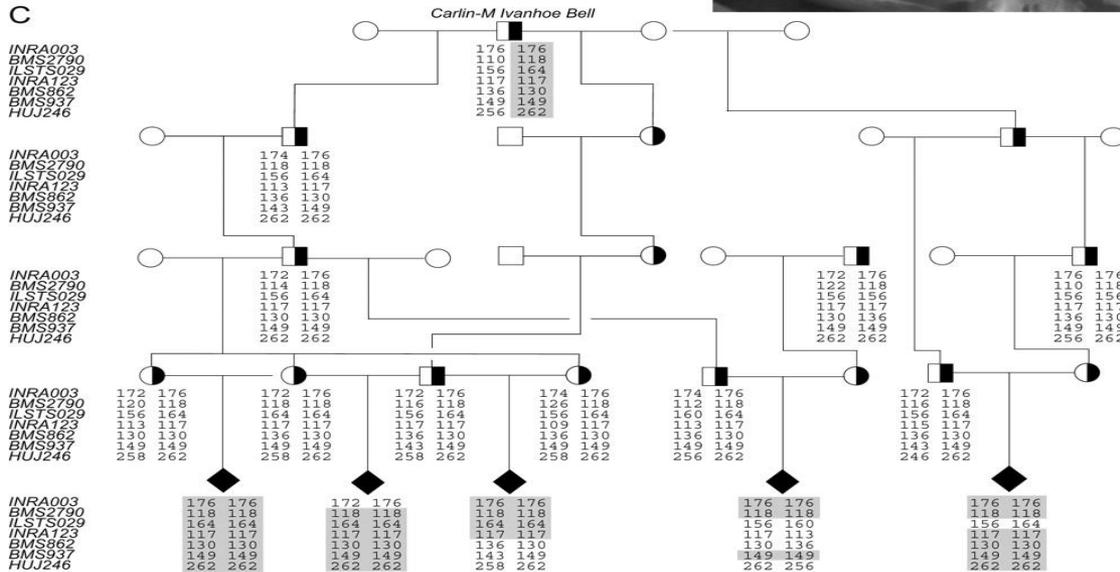
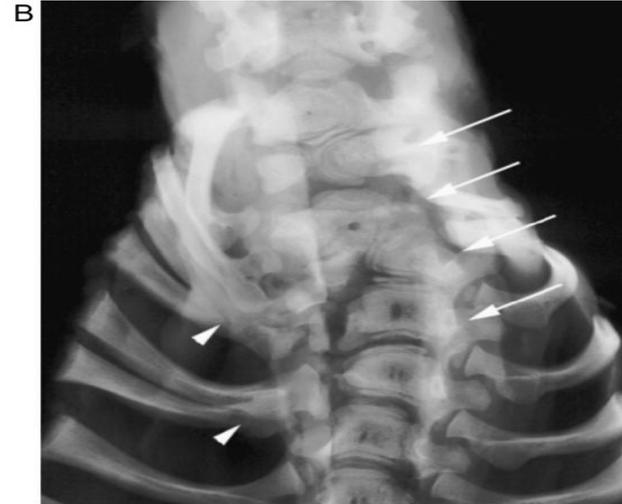
CVM - Complex Vertebral Malformation (нарушение развития позвоночного столба).

Наследственный дефект (мутация) был обнаружен у голштинского скота в Дании и описан в 2001г.

Мутация получила распространение в России через выдающихся потомков Айвенго Белла.

Причина - G/T мутация гена SLC35A3 в позиции 559.

# CVM



Мутация в гомозиготном состоянии приводит к нарушению развития позвоночного столба, что выражается в появлении абортос, мертворожденных плодов, уродств, укороченной шейной и грудной части позвоночного столба. SVM - летальная рецессивная мутация, распространенная у голштинского скота.

Является серьезной проблемой воспроизводства, особенно у высокопродуктивных животных.

Наносит существенный экономический урон, в некоторых хозяйствах частота встречаемости достигает 10%.

Database: GenBank

Entry: AY160683

LOCUS [AY160683](#) 22404 bp DNA linear MAM 09-JAN-2006 DEFINITION Bos taurus solute carrier family 35 member 3 (slc35a3) gene, complete cds. ACCESSION [AY160683](#) VERSION AY160683.1 GI:37725000 KEYWORDS . SOURCE Bos taurus (cattle) ORGANISM Bos taurus Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.

REFERENCE 1 (bases 1 to 22404) AUTHORS Thomsen,B., Horn,P., Panitz,F., Bendixen,E., Petersen,A.H., Holm,L.E., Nielsen,V.H., Agerholm,J.S., Arnbjerg,J. and Bendixen,C. TITLE A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation JOURNAL Genome Res. 16 (1), 97-105 (2006) PUBMED [16344554](#) REFERENCE 2 (bases 1 to 22404) AUTHORS Thomsen,B., Horn,P., Panitz,F., Bendixen,E., Petersen,A.H., Holm,L.E., Nielsen,V.H., Agerholm,J.S. and Bendixen,C. TITLE Direct Submission JOURNAL Submitted (09-OCT-2002) Animal Breeding and Genetics, Danish Institute of Agricultural Sciences, Blichers Alle 2, Tjele 8830, Denmark FEATURES

Location/Qualifiers source 1..22404 /organism="Bos taurus" /mol\_type="genomic DNA" /db\_xref="taxon:[9913](#)" /clone="slc35a3" gene <3384..>18276 /gene="slc35a3" mRNA join(<3384..3570,7472..7626,7700..7822,9799..9970, 10906..11024,12667..12800,18186..>18276) /gene="slc35a3" /product="solute carrier family 35 member 3" CDS join(3384..3570,7472..7626,7700..7822,9799..9970, 10906..11024,12667..12800,18186..18276) /gene="slc35a3" /note="SLC35A3; UDP-N-acetylglucosamine transporter" /codon\_start=1 /product="solute carrier family 35 member 3" /protein\_id="AAO22138.1" /db\_xref="GI:37725001" /translation="MSANLKYLSLGLVFTTSLVLTMRYSRTLKEEGPRYLSSTAVV

VAELLKIMACILLVYKDKCSLRALNRILHDEILNKPMETLKLAIPSGIYTLQNNLLY  
VALSNLDAATYQVTYQLKILTALFSVSMLSKKLG VYQWLSLVILMTGVAFVQWPSDS  
QELNSKELSAGSQFVGLMAVLTA CFSSGFAGVYFEKILKETKQSVWIRNIQLGFFGSI  
FGLMGVYVYD GELVSKNGFFQGYNRLTWIVVVLQALGGLVIAAVIKYADN ILKGFATS  
LSIILSTLISYFWLQDFVPTSVFFLGAILVITATFLYGYDPK PAGNPTKA"

[ORIGIN](#) 1 tgttttcga taatccagcg gatgttgcca attgatctc tggctcctc gccctttcta 61 aaactagctt gaacatctgg aagttcactg ttcacgtact gctgaagcct ggcattggaga 121 atttgagca  
ttacattact agcctgtgct gctgctgctg ctaagtcgct tcagtcgtgt 181 ccaactctgt gcaaccccat agatggcagc ccaccaggct cccccgtccc tgggattctc 241 caggcaagaa cactggagtg  
ggttgccatt tcctctcca atgcatgaaa gtaaaaagt 301 aaagtgaagt cactcagtc tgcgcgactc ttagcgacc catggactgc agcctaccag 361 gctcctccat ccattgggatt tccaggcaa  
gagtactgga gtgggggtgcc attgcctct 421 gcgtactggc tgtgagatga gtgcagtgt gcgtaattg agcattcttt ggcattgctt 481 ttcttagga ttggaatgaa aactgacct tccagtcct  
gtggccctg cagagtttta 541 gttgtacaga ataaacaaa gattttcta accagattg aaataattt gtaacattt 601 ccgggaaat caaatgcctt tgccaaatgt agattgctgg caactattc tcctttata  
661 cagagataaa aggccaccag gaagtcttt gaaattttac agtagcatgt aatgggatct 721 agagaacttg atactgact tcataactgc tatttccaat tagtagttat aaggccttga 781 agaagtcate  
taactctct gttcactgtt ttctttatg taagaggaat agattgtact 841 ggatgattc taaaacatt tccaccteta aaatgctaca gttttattc acattagat 901 tctttgctc acacagatct ataagatga  
gatagatggg tgataaagt gttgtaccac 961 ttaattccc actagcaaaa ttgagagttc tttcacttt aaacctctt caacactgg 1021 tagcatcagt ttttaagatt tcatctgttc tcgtaggtat ataattgtat  
ctcattgtgg 1081 atttaattg tatttcteta atgactgtga tattgaacat ttttctggg gcatattagc 1141 cattttatct tttgttggg aaatgtttat caaatcttt gccatttc atttgggtaa 1201 ttttttcta  
ctcattgtgt tataagagtt ctatatacat ttagatata aggccatgg 1261 cagattttg tattgagaat attttcccc atgatgtgt ttgcctttca ttattttac 1321 agtatctca gaagagcaga tttaacttt  
gacaatgtcc actttttca tatttctctt 1381 ttgtggttg tgcgtttgt aagaaatgt gatagattt tctctatgt tttaccctg 1441 aatatttata ttttagctt ttataacage tctatttcta gtaaatatt  
ggcagcagc 1501 agataaatag tggctcgtt aaaaaattac agatagctca ttgttcaga atatttgtt 1561 aaaaagacta tgctttctt ttgttacctt tgcaaaaatt attgaccaa atagtatag 1621  
gtcttgtct ggaattcatt ctgtccatt gatctattct tctgtccta tgtaataac 1681 agtctattc tagagctta tagtgactg ggaattcag tagtttaacc ccttcagtt 1741 tattttctc ttcaaaatc  
cttttgggtg tccagtcct ttgattttc ctataaatt 1801 tcaaatcagt ttgttagtt ctacacaaaa aaaaacctt cagggatct tttttttt 1861 tttttttga gattgaatct ttagatgaat tgaagcaaa  
gatgtggctt ggggcagaga 1921 ggcagttgac tgaccatgca cactacatta agtcttctc tgaaggagga tcttagtggg

Для выявления SVM-мутации можно использовать два метода.

I. Метод ПДРФ анализа ПЦР продуктов. Замена G (дикий тип аллели) на T (SVM-аллель) приводит при использовании праймеров  
F 5'- CACAAT TTGTAGGTCTCACTGGA,  
R5'- CGATGA AAAAGGAACCAA AAGGG  
к исчезновению сайта для рестриктазы PstI и появлению сайта для рестриктазы EcoT22.

II. Для ускорения анализа на большом поголовье животных, нами были использованы аллель-специфичные праймеры для выявления точечной мутации SVM:  
F1 5'- CACAATTTGTAGGTCTCACTGGAT  
F2 5'- CACAATTTGTAGGTCTCACTGGAG  
R 5'- CGATGAAAAAGGAACCAAAAAGGG

DUMS – дефицит уридинмонофосфатсинтетазы.

Заболевание впервые описано в 1983 г. Как моногенный аутосомно-рецессивный признак. Проявляется только в гомозиготном состоянии.

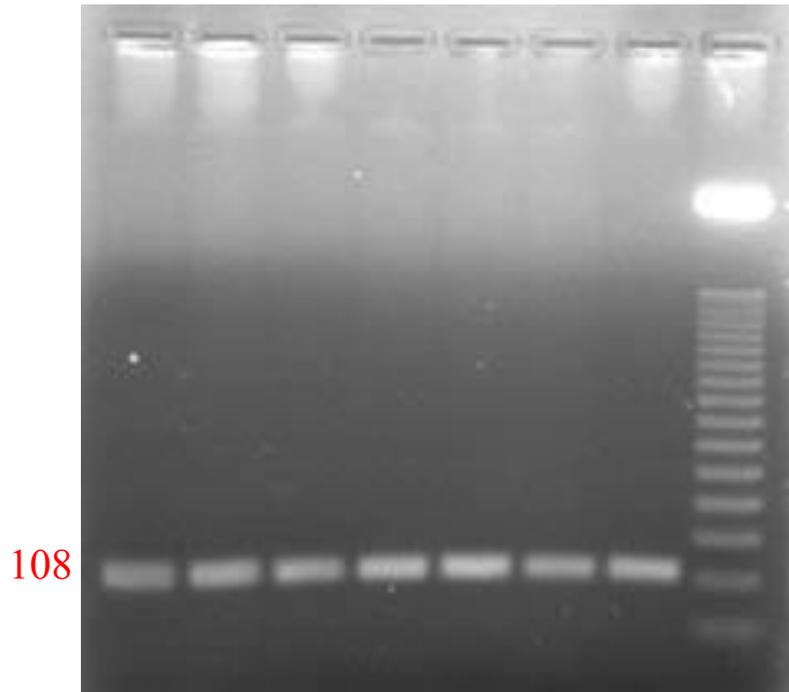
Причина - точечная мутация в кодирующей части этого гена уридинмонофосфатсинтетазы, а точка мутации обозначена как R405Stop. Эта мутация ведет к исчезновению одного сайта рестрикции для рестриктазы *AvaI*.

Проявляется в виде гибели эмбрионов после 40 дней эмбрионального развития.

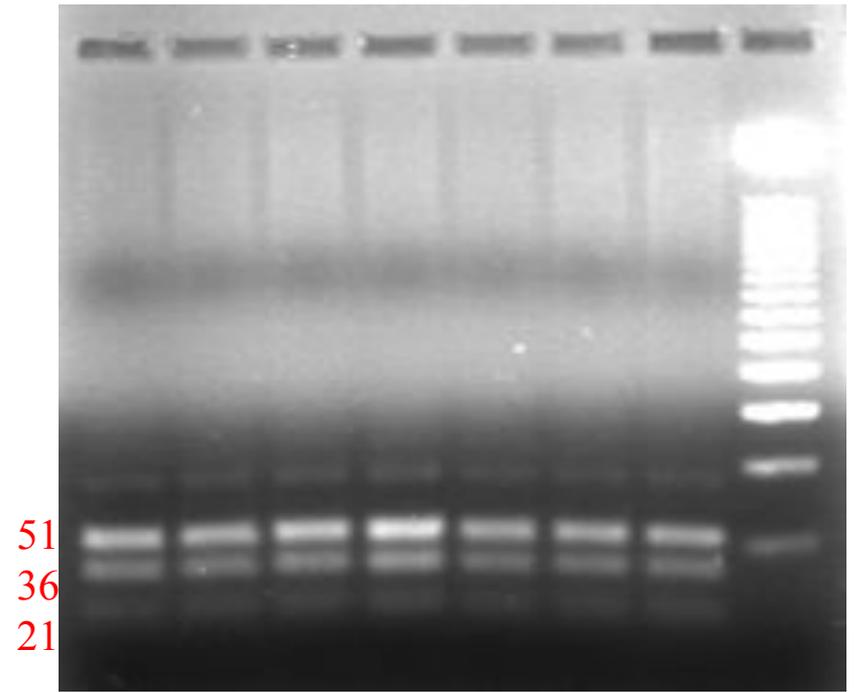
прямой – GAACATTCTGAATTTGTGATTGGT  
обратный - GCTTCTAACTGAACTCCTCGAGT

ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл, содержащем 1-2 ед. Taq - полимеразы (Силекс М), по 0,25 mM каждого dNTP, 67 mM трис -HCl pH 8,6, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16,6 mM NH<sub>4</sub>OH . по 0,5 мкм каждого праймера и 100-150 нг ДНК. Программа включала в себя первоначальную денатурацию (95 С, 1 мин), 40 циклов, состоящих из следующих повторяющихся друг за другом этапов - денатурация - 95 С, 1 мин, отжиг праймеров - 62 С, 1 мин, синтез - 72 С, 1 мин; финальный синтез - 72 С, 5 мин. Полученный амплификат для определения VLAD резали при помощи 3-4 ед. рестриктазы TaqI (Fermentas) при температуре 56 С в течении 2 часов. Полученную и обработанную рестриктазой ДНК подвергали электрофорезу 2% агарозном геле, и анализировали на транслюминаторе при УФ-свете.

# Выявление мутации DUMS



ПЦР-продукт DUMS



ПЦР-продукт DUMS после  
расщепления рестриктазой *Ava*I

# ECR F18

ECR F18 является геном рецептора *E. coli* F18, тесно сцепленным с геном альфа-1-фукозилтрансферазы (FUT1). Наличие точковой мутации гена FUT1 (A→G в позиции 307) делает возможным проведение косвенной диагностики полиморфизма гена ECR F18 / FUT1

Считают, что выявленный полиморфизм может служить причиной устойчивости или чувствительности свиней к колибактериозу.

Сохранность поросят в зависимости от наличия в генотипе матерей аллеля G гена ECR F18/FUT1.

CGCCACCTCTGTCTGACCTT  
AGGAGCGTGCCTGTCTACCTC

Порода	Всего голов	Сохранность, %		Разница между группами (%)
		AA	AG+GG	
Крупная белая	64	85,2	79,6	+5,6
Белорусская черно-пестрая	19	100	82,5	+17,5
Белорусская мясная	17	100	96,1	+3,9
Ландрас	18	88,9	80,9	+8,0
Ландрас	93	85,0	81,8	+3,2
Дюрок	25	76,8	81,7	-4,9
Эстонская беконная	41	75,0	87,3	-12,3

В нашей работе для Real-Time PCR SNPs диагностики точечной мутации SVM мы использовали праймеры для Реал-Тайм ПЦР, имеющие следующую последовательность:

F-5'-AGCTGGCACAATTTGTAGGT -3'  
R -5'-CTCAAAGTAAACCCAGCAAAGC-3'

и меченые:

F – VIC - 5'-TCATGGCAGTTCTCA – 3'  
R – FAM - 5'-TCATGGCATTTCTCA-3'.

Для Real-Time PCR SNPs диагностики точечной мутации BLAD использовали праймеры для Реал-Тайм ПЦР, имеющие следующую последовательность:

F-5'-CAGTTGCGTTCAATGTGACCTT -3'  
R-5'-GAGTAGGAGAGGTCCATCAGGTA-3'

и меченые:

F – VIC - 5'-CCCCATCGACCTGTAC – 3' и R – FAM - 5'- CCCATCGGCCTGTAC-3'. Праймеры для генотипирования и меченые зонды VIC, FAM праймеры были синтезированы – компанией Applied Biosystems (США). В первую очередь нормализовали концентрацию образцов ДНК путем разбавления ТЕ буфером до конечной концентрации 20-40 нг/мкл. Компоненты Real-Time PCR: 1. TaqMan Genotyping Master Mix (40 × набор для генотипирования) – 12,5 мкл 2. Прямые и обратные праймеры - 0,625 мкл 3. ДНК – 1,0 мкл 4. H<sub>2</sub>O - бидистиллированная – 10,8 мкл.

# Моногенные заболевания у новорожденных

- Миотоническая дистрофия
- Доминантная врожденная тугоухость
- Муковисцидоз
- Спинальная амиотрофия
- Рецессивная врожденная тугоухость

# Муковисцидоз

Заболевание, при котором поражаются экзокринные железы.

Причина – мутация в гене CFTR

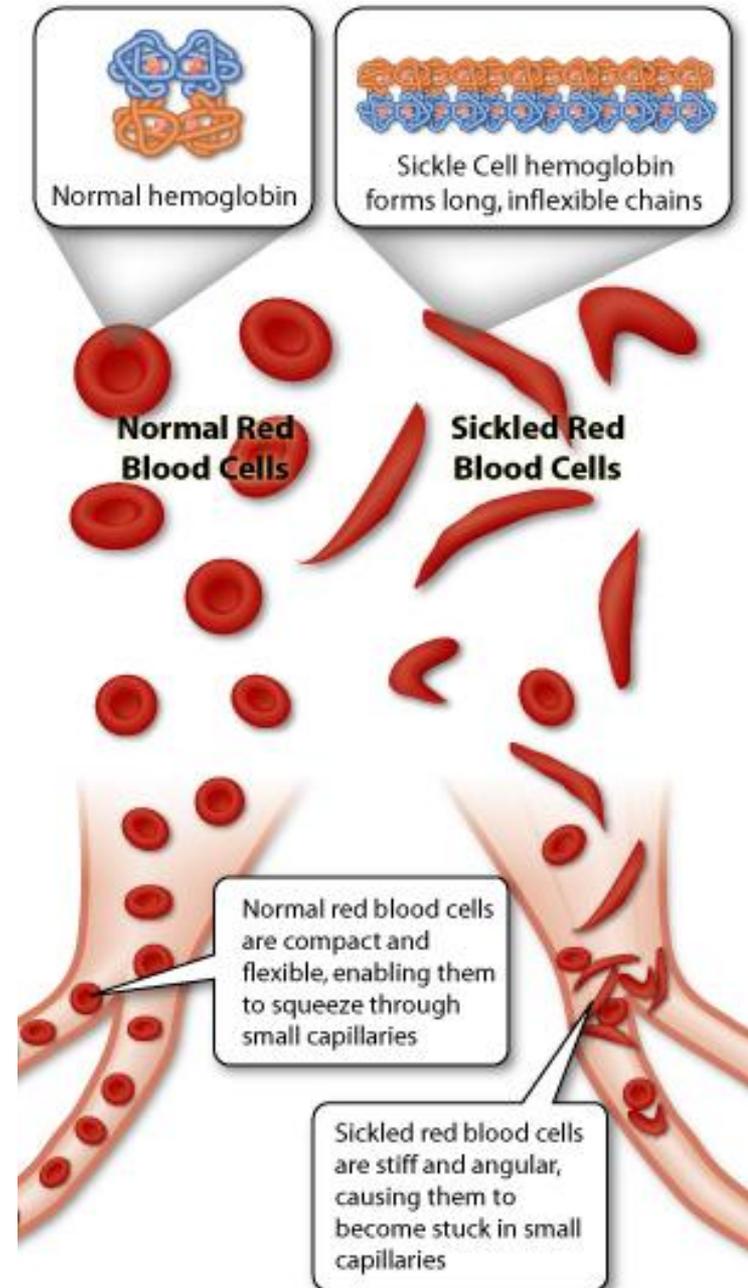
Наследуется по аутосомно-рецессивному типу.



- Examples:

Recessive gene mutations:

Sickle cell anemia – red blood cells are sickle shaped instead of round and cannot carry enough oxygen to the body tissues – heterozygous condition protects people from malaria



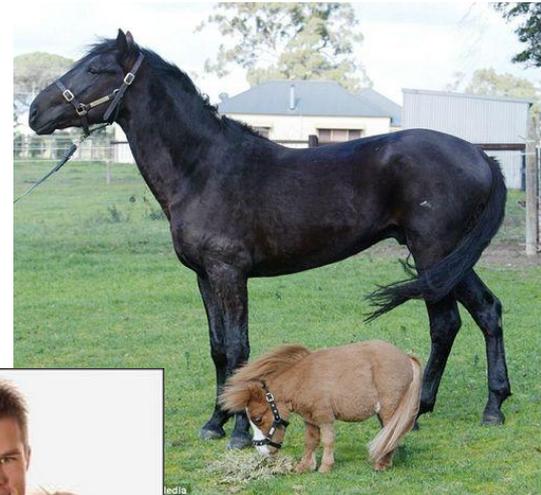
Phenylketonuria (PKU) – an amino acid common in milk cannot be broken down and as it builds up it causes mental retardation – newborns are tested for this



Dominant gene mutations:

Huntington's disease – gradual deterioration of brain tissue, shows up in middle age and is fatal

Dwarfism – variety of skeletal abnormalities



## **Заключение**

**ПЦР является эффективным инструментом раннего выявления инфекции у животных.**

**Своевременное выявление носителей вредных рецессивных мутаций позволяет исключить животных-носителей этих мутаций из племенной работы.**

**Достигается существенный экономический эффект за счет повышения воспроизводительных качеств животных**