

## ДНК-ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ РУП «ВИТЕБСКОЕ ПЛЕМПРЕДПРИЯТИЕ» ПО ГЕНАМ *CD18 (BLAD)* И *DUMPS*

\*Вишневец А.В., \*\*Михайлова М.Е., \*Бекиш Р.В., \*Смунева В.К.

\* УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»  
г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

\*\*ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

*Для выявления наследственных заболеваний рекомендуем проводить ДНК-диагностику по генам *CD18 (BLAD)* и *DUMPS* с целью исключения импорта быков-производителей, являющихся носителями генетически обусловленной мутации, и решения проблемы повышения резистентности поголовья, сохранности молодняка, снижения ранней abortируемости эмбрионов у крупного рогатого скота.*

*For revealing the hereditary diseases we recommend to conduct DNK-diagnostics on gene *CD18 (BLAD)* and *DUMPS* for the reason exceptions of the import oxen-producers, carriers genetic conditioned to mutations and decisions of the problem of increasing rezistentnosti live-stocks, safety of the saplings, reductions early abortion embryo beside large horned live-stock.*

**Введение.** В Республике Беларусь на протяжении длительного периода для совершенствования белорусской черно-пестрой породы крупного рогатого скота используется генофонд лучшей в мире молочной породы – голштинской. Однако разнообразие в выборе импортируемых быков не всегда позитивно отражается на качестве улучшаемого отечественного поголовья. Поэтому при закупке импортных быков встает проблема получения, оценки и отбора быков, наиболее пригодных для использования в хозяйственных условиях [2].

В настоящее время в большинстве стран Европы, где ведется интенсивная селекционная работа, широкое распространение получили современные методы биотехнологии, способные повысить точность и эффективность традиционной селекции. В числе современных методов, используемых в животноводстве как зарубежных стран, так и нашей республики, методы ДНК-технологий [1,5].

Особенности ведения современного сельского хозяйства в мировом масштабе приводят и к появлению ряда проблем. Использование зарубежного племенного материала пород для совершенствования белорусской черно-пестрой породы крупного рогатого скота может сопровождаться передачей наследственных заболеваний, в том числе синдрома иммунодефицита (BLAD - Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency - дефицит адгезивности лейкоцитов) и дефицита фермента уридинмонофосфат-синтазы (DUMPS - deficiency of uridine monophosphate synthase), обуславливающего раннюю abortируемость эмбрионов у крупного рогатого скота. Распространение таких мутаций может привести к огромному экономическому ущербу [3].

Племенные службы должны осуществлять проверку производителей на данные генетические дефекты и проводить запись в родословные племенных каталогов носителей данных мутаций.

Опасность распространения генных мутаций связана с использованием современной технологии размножения животных. Анализ данных показывает, что если на первом этапе поток мутантных генов в популяции идет в основном через быков-производителей, глубоководную сперму, то дальнейшее его распространение связано с использованием гетерозиготных быкопроизводящих коров [4].

Единственным существующим к настоящему времени методом, позволяющим безошибочно выявить носительство мутаций, является ДНК-диагностика с использованием метода ПЦР-ПДРФ.

Цель исследований – провести ДНК-диагностику наследственных заболеваний быков-производителей, обусловленных точечной мутацией в гене *CD18* (BLAD-синдром иммунодефицита) и диагностику дефицита фермента уридинмонофосфат-синтазы (ген *DUMPS*), обуславливающего раннюю abortируемость эмбрионов у крупного рогатого скота.

**Материал и методы исследований.** ДНК-тестирование быков-производителей по генам *DUMPS* и *CD18* проводили в ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».

Материалом исследований служили образцы ДНК быков-производителей, полученные в РУП «Витебское племпредприятие» из 100 проб крови и племенные карточки быков – производителей.

ДНК-диагностика включает следующие этапы:

- выделение ДНК
- избирательная амплификация участка ДНК, несущего интересующую мутацию;
- идентификация генотипа с помощью вертикального гель-электрофореза.

Выделение ДНК из крови быков-производителей осуществлялось с применением стандартных наборов для выделения ДНК. Для амплификации использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР), происходящую при высоких температурах. Ее специфичность зависит от концентраций реагирующих веществ и катализаторов, входящих в реакционную смесь, а также от оптимального подбора значений температур денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки матрично-праймерного комплекса, от количества циклов.

Ген *CD18* (BLAD-синдром) – болезнь дефекта иммунной системы у крупного рогатого скота. С целью типирования аллельных вариантов гена *CD18* использовали метод ПЦР с последующим анализом ПДРФ. На основе данных о сиквенсе участка гена, в котором была обнаружена мутация, было синтезировано два олигонуклеотидных праймера, которые амплифицируют участок, размером 132 п.н.:

BLAD-1: 5'- TGA GAC CAG GTC AGG CAT TGC GTT CA- 3',

BLAD -2: 5'-CCC CCA GCT TCT TGA CGT TGA CGA GGT C- 3

Режим амплификации: «горячий старт» - 3 мин при 93° С; 35 циклов амплификации; денатурация - 1 мин при 93° С; отжиг праймера - 1 мин при 62° С; синтез - 1,5 мин при 72° С; элонгация - 5 мин при 72° С.

При расщеплении продуктов амплификации рестриктазой TaqI при 65° С идентифицируются следующие генотипы:

- свободные от мутации ( $CD18^{TL/TL}$ ) - 71 и 61 п.н.
- гетерозиготные носители мутации ( $CD18^{TL/BL}$ ) - 132, 71, 61 п.н.
- гомозиготные носители мутации ( $CD18^{BL/BL}$ ) - 132 п.н.

Ген *DUMPS* (deficiency of uridine monophosphate synthase) дефицит фермента уридинмонофосфат-синтазы обуславливает раннюю абортруемость эмбрионов у крупного рогатого скота. Данное заболевание обусловлено точковыми мутациями, наследуемыми по аутосомно-рецессивному типу. Благодаря отсутствию фенотипических признаков заболевания у гетерозигот наблюдается очень высокая скорость распространения мутаций, что приводит к быстрому накоплению их в популяции и появлению гомозиготных, с фенотипическим проявлением болезни, животных [3,7].

Участок ДНК, несущий мутацию, амплифицируют посредством ПЦР, разрезают рестрикционным энзимом с последовательностью узнавания в месте мутации и разделяют образующиеся фрагменты в агарозном или полиакриламидном геле. По длине фрагментов (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) делают вывод об отсутствии или наличии точковой мутации, а также о гомозиготности или гетерозиготности индивидуума по данному аллелю.

Для ДНК-диагностики мутации гена *DUMPS* амплификацию проводили с помощью двух синтезированных олигонуклеотидных праймеров следующего состава:

UMPS L 5'GCAAATGGCTGAAGAACATTCTG-3'

UMPS R 5'GCTTCTAACTGAACCTCCTCGAGT-3'

Режим амплификации: «горячий старт» - 94 °С - 4 мин; 35 циклов ПЦР: денатурация - 94 °С - 1 мин; отжиг праймеров - 62 °С - 1 мин; элонгация - 72 °С - 1 мин.

В амплифицируемом участке ДНК находятся два сайта узнавания для эндонуклеазы *Ava1*. Размер амплификата составляет 108 п.н.. В случае разрезания продукта амплификации рестриктазой на фрагменты 53, 36 и 19 п.н., образец диагностируется как гомозиготный *TD/TD DUMPS*-генотип (здоровое животное). Если в результате рестрикции образуются фрагменты 89, 53, 36, 19 п.н., животное диагностируется как гетерозиготный *TD/DP DUMPS*-генотип (скрытый носитель мутации) и если образуются фрагменты 89, 19 п.н., животное диагностируется как гомозиготный *DP/DP DUMPS*-генотип (больное животное) [6,8].

**Результаты исследований.** Главнейшей задачей при работе с любой породой является улучшение продуктивных и племенных качеств животных. Заводские породы наиболее успешно совершенствуются при разведении их по линиям. *Стремление широко использовать в племенной работе лучших животных, в каждом отдельном случае характеризующихся разным сочетанием ценных признаков и существенно различающихся по наследственности между собой, - основа дифференциации породы на линии.* Любая заводская порода должна иметь разветвленную внутривидовую структуру, основные элементы которой составляют линии, семейства, внутривидовые экологические и заводские типы. Чем в большей степени в породе выражена внутривидовая дифференциация по этим основным структурным элементам, тем больше возможностей для получения животных желательного типа в короткие сроки.

В РУП «Витебское племпредприятие» используются быки разных генеалогических линий. Генеалогическая структура исследуемых быков-производителей представлена на рисунке 1.

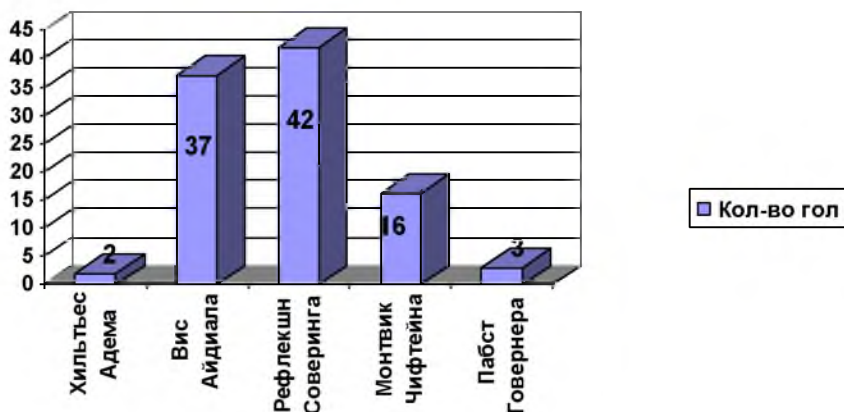


Рисунок 1 - Генеалогическая структура быков-производителей Витебского племпредприятия

Основная часть быков принадлежит к трем генеалогическим линиям голштинского корня: Вис Айдиала 933122, Рефлекшн Соверинга 198998 и Монтвик Чифтейна 95679. Больше всего быков-производителей линии Рефлекшн Соверинга 198998. Их количество составляет 42 головы. Две головы относятся к линии Хильтьес Адема 37910 голландского происхождения и три - Пабст Говернера 882933.

Интенсивное использование мирового породного генофонда и биотехнологий репродукции (искусственное осеменение, трансплантация эмбрионов) позволили значительно повысить генетический потенциал продуктивности животных. Вместе с тем в поголовье все чаще проявляются признаки генетической «эрозии» — накопления груза вредных, рецессивных мутаций. При этом снижаются воспроизводительная способность и плодовитость; жизнеспособность новорожденных и молодняка; резистентность и продолжительность хозяйственного

использования животных, что отрицательно сказывается на рентабельности производства. Генные мутации распространяются по всему миру с импортом породистых сельскохозяйственных животных.

Одним из таких генетических дефектов, наследуемых по аутосомно-рецессивному типу, т.е. проявляющихся только у животных, гомозиготных по соответствующему гену и не имеющих клинических проявлений у гетерозигот, является дефицит адгезии лейкоцитов (BLAD-синдром), введенный в генофонд черно-пестрого скота в виде рецессивной мутации в гене *CD18*. Экономический ущерб в результате распространения такой мутации приводит к необходимости строгого генетического контроля импортируемого материала.

BLAD-синдром получил распространение в породах черно-пестрого скота по причине широкого использования для улучшения генетического потенциала выдающихся голштинских быков, имевших эту мутацию в скрытом виде.

Клинически BLAD проявляется в подавлении клеточного иммунитета, т.е. неспособности лейкоцитов к адгезивной реакции, а также блокируется способность лейкоцитов проникать через кровеносные капилляры и двигаться с кровотоком к очагу инфекции. Эти нарушения способствуют развитию иммунодефицитного состояния животного. Животные с мутантным аллелем (гетерозиготный генотип TL/BL) не имеют фенотипических проявлений заболевания, но являются скрытыми носителями мутации. У особей, гомозиготных по рецессивному аллелю (**рецессивный гомозиготный генотип BL/BL**), резко снижается устойчивость к бактериальным и вирусным инфекциям, замедляется рост. У пораженных животных отмечаются тяжелые язвы на слизистых оболочках ротовой полости, потеря зубов, диарея, хроническая пневмония. Биохимические показатели крови указывают на постоянную нейтрофилию. Большинство телят погибает в возрасте 3-7 месяцев [7].

Генные мутации, как правило, затрагивают участки ДНК, соответствующие одному гену. Молекулярный механизм генных мутаций связан с выпадением, добавкой или заменой нуклеотидов. В результате изменяется процесс экспрессии мутантного гена, обуславливающий изменения биохимических и физиологических функций организма. Часть генных мутаций вызывает летальный исход на разных этапах внутриутробного развития или вскоре после рождения животных.

Молекулярной основой BLAD является точечная мутация в кодирующей части гена *CD18*, имеющая аутосомно-рецессивный характер наследования. Замена (аденин-гуанин) в положении 383 кДНК приводит к аминокислотной замене в молекуле белка (Asp→Gly), в результате чего нарушается вся цепочка экспрессии β-интегрина, поверхностного белка нейтрофилов, лейкоциты теряют свою активность и способность выполнять защитную фагоцитарную функцию. В итоге возникает иммунодефицитное состояние, при котором животное погибает от любой инфекции [7].

Врожденные иммунные дефициты возникают вследствие генетически детерминированной неспособности организма животного реализовать иммунный ответ. В организме таких животных возникают морфологические, функциональные расстройства клеточного и гуморального иммунитета на различных этапах развития популяций Т- и В-лимфоцитов, макро- и микрофагов, образования иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента.

В Беларуси развернута крупномасштабная работа по генетическому улучшению белорусской черно-пестрой породы скота. Животноводство республики интенсивно развивается, применяя методы искусственного осеменения, максимально используя при этом лучших быков голштинской породы, ввозимых из-за рубежа. Поэтому несомненно, что ситуацию по распространению мутации BLAD в Беларуси следует держать под контролем.

В результате проведенного нами молекулярно-генетического анализа быков-производителей РУП «Витебское госплемпредприятие» по ДНК-тестированию выявлен бык Тунец 200337 линии Вис Айдиала 933122, который является носителем мутации *CD18* (TL/BL гетерозиготное состояние), приводящей к иммунодефициту. Это животное не имеет фенотипических проявлений заболевания, но является скрытым носителем мутации. Для предотвращения распространения мутации в стаде рекомендуем вывести его из использования в селекционном процессе.

В результате молекулярно-генетического анализа 99 быков-производителей РУП «Витебское госплемпредприятие» установлено, что они свободны от мутации по гену *CD18* (BLAD) и их можно использовать в хозяйствах Витебской области.

Недостаточность уридинмонофосфатсинтазы и связанное с ним наследственное заболевание давно описаны для человека, и дефицит уридинмонофосфата крупного рогатого скота (DUMPS) имеет с ним сходство.

У крупного рогатого скота дефицит уридинмонофосфатсинтазы был впервые выявлен в 1983 году как заболевание, которое характеризуется гибелью гомозиготных эмбрионов после первых 40 дней развития. В ходе исследований было выяснено, что ген DUMPS наследуется как моногенный аутосомнорецессивный признак, являющийся результатом точечной мутации, возникшей и получившей широкое распространение среди представителей голштинской породы благодаря масштабному применению искусственного осеменения.

Причина заболевания была выявлена после того, как был выделен и секвенирован ген уридинфосфатсинтазы, также было установлено, что заболевание обусловлено точечной мутацией (С→Т) в 405 кодоне, что приводит к образованию преждевременного стоп-кодона и усеченной с-терминальной субъединицы протеина. Точка мутации обозначена как R405Stop [8].

В то же время заболевание в скрытой форме достаточно быстро распространяется среди животных голштинской породы и, по результатам скрининга европейских популяций крупного рогатого скота, в некоторых регионах достигает 2 и более процентов. Мониторинг популяций ведется по всей Европе. В результате активных скрининговых работ, позволяющих контролировать распространение скрытых рецессивных заболеваний, и DUMPS в том числе, численность носителей в европейской популяции голштинского скота значительно снижена. В настоящее время, однако, несмотря на достигнутые результаты, в Европе продолжается мониторинг данного заболевания. Кроме того, учеными активно исследуются связи наследования данного признака как с другими заболеваниями, так и с признаками продуктивности животных.

С помощью специального теста у фенотипически нормальных гетерозиготных животных можно диагностировать снижение активности фермента уридинфосфатсинтетазы, бифункционального фермента, катализирующего две последние стадии биосинтеза пиримидинов, включающие конверсию оротата в уридинмонофосфат.

Важную роль в биосинтезе мононуклеотидов играет молекула рибозо-5-фосфат, которая является основой при биосинтезе как пуриновых, так и пиримидиновых оснований. Поскольку у лактирующих коров, гетерозиготных по *DUMPS*, в молоке наблюдается повышенное содержание оротата, можно предположить, что данная мутация вызывает нарушение декарбоксилазной функции.

В результате проведенного молекулярно-генетического анализа среди исследованных быков-производителей не выявлено генотипов, несущих мутантный аллель *DP-DUMPS*, приводящий к ранней абортности эмбрионов. Необходимо контролировать распространение данной мутации, что снизит ущерб наносимый животноводству. В противном случае это может привести к увеличению частоты мутантных аллелей в популяции. Бесконтрольное использование в селекционных программах племенного поголовья крупного рогатого скота, который не тестировали на выявление гена *DUMPS*, является экономически неоправданным и небезопасным.

Маркер-зависимая селекция позволяет вести на генетическом уровне отбор и элиминацию из стад животных, являющихся носителями наследственных заболеваний.

**Заключение.** Основная часть исследуемых быков принадлежит к трем генеалогическим линиям голштинского корня: Вис Айдиала 933122, Рефлекшн Соверинга 198998 и Монтвик Чифтейна 95679. Больше всего быков-производителей линии Рефлекшн Соверинга 198998 (42 головы).

Установлено, что бык Тунец 200337, принадлежащий РУП «Витебское госплемпредприятие», является носителем мутации гена *CD18* (TL/BL гетерозиготное состояние), вызывающего иммунодефицит. Это животное не имеет фенотипических проявлений заболевания, но является скрытым носителем мутации. Тунец относится к линии Вис Айдиала 933122 (ветвь Тайди Бек Элевейшна). Для предотвращения распространения мутации в стаде рекомендуем вывести его из использования в селекционном процессе. **Установлено, что** 99 быков-производителей РУП «Витебское госплемпредприятие» свободны от мутации по гену *CD18* (BLAD) и их можно использовать в хозяйствах Витебской области.

В результате проведенного молекулярно-генетического анализа среди исследованных 100 быков-производителей не выявлено генотипов, несущих мутантный аллель *DP-DUMPS*, приводящий к ранней абортности эмбрионов. Бесконтрольное использование в селекционных программах племенного поголовья крупного рогатого скота, который не тестировали на выявление гена *DUMPS*, является экономически неоправданным и небезопасным.

**Литература.** 1. Зиновьева, Н. А. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Н. А. Зиновьева, Е. А. Гладырь, Л. К. Эрнст, Г. Брем // Дубровицы, ВИЖ, 2002. 112 с. 2. Калашникова, Л. А. Селекция XXI века: использование ДНК-технологий / Л. А. Калашникова, И. М. Дунин, В. И. Глазко; под ред. Калашниковой Л. А. [и др.] - Московская область: Лесные Поляны, ВНИИплем. 2001. - 34 с. 3. Михайлова, М. Е. Генетико-популяционные аспекты возникновения и распространения врожденных дефектов у крупного рогатого скота в Республике Беларусь / М. Е. Михайлова, Е. В. Белая, Н. М. Волчок, Н. А. Камыш, В.А. Машеро // Молекулярная и прикладная генетика: Сб. науч. трудов. Том 8, / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; ред. колл.: А.В. Кильчевский [и др.]. Минск: Право и экономика, 2008.-175 с. 4. Михайлова, М.Е. Не допустить распространения мутаций / М.Е.Михайлова, Н.М.Волчок, Е.В.Белая // Наука и инновации. 2011. №8 (102). С.12-14. 5. Эрнст, Л. К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Эрнст Л. К., Зиновьева Н. А. - Москва: РАСХН, 2008. - 508 с. 6. Kaminski, S. No incidence of *DUMPS* carriers in Polish dairy cattle. *J. Appl Genet* 46 (4), 2005, pp.395-397. 7. Rahimi, G Genotyping *BLAD*, *DUMPS* and *kappa* - *CSN* loci in Holstein young bulls of the National Animal Breeding Center of Iran. *Pakistan-Journal-of-Biological-Sciences*. 2006; 9(7): 1389-1392. 8. Schwenger, B. *DUMPS* cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate syntase gene / Schwenger B, Scober S, Simon D. // *Genomics* 16, 241-244, 1993.

Статья передана в печать 22.02.2012 г.

УДК 637.344:636.2.084.1

## ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СЕРНОКИСЛОТНОЙ КАЗЕИНОВОЙ СЫВОРОТКИ В РАЦИОНАХ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ДОРАЩИВАНИИ И ОТКОРМЕ

\*Глинкова А.М., \*Кот А.Н., \*\*Возмитель Л.А.

\*РУП «Научно – практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», г. Жодино

\*\* УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»

г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

*Результаты исследований показали, что включение в рацион молодняка крупного рогатого скота на доращивании сернокислотной казеиновой сыворотки способствовало снижению расхода кормов, оказало положительное влияние на интенсивность роста животных, обеспечив снижение себестоимости прироста и получения дополнительной прибыли.*

*Research results show that implementation of sulfuric casein serum in diets for young cattle at growing and fattening promoted decrease of forage spends, had positive effect on animals' growth intensity, ensuring decrease of gain prime cost and obtaining extra profit.*

**Введение.** Основной задачей агропромышленного комплекса является устойчивый рост производства сельскохозяйственных продуктов. Производство продукции животноводства, необходимо обеспечить за счет существенного повышения продуктивности всех видов животных [1]. Достижение оптимального уровня интенсивно-