

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 4, Number 34 (2016), 53 – 57

ALTERNATIVE METHODS FOR DETECTION OF COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION (CVM) IN BREEDING ANIMALS**Y.S. Ussenbekov, S.N. Kasymbekova, M.V. Solomadin**Kazakh national agrarian university,
Trading company «Zalma LTD», Almaty

Keywords: Complex vertebral malformation, CVM, point mutation, polymerase chain reaction, Real-Time PCR, breeding animals.

Abstract. The authors of the article conducted DNA testing of breeding bulls of the foreign and domestic selection for the presence of a genetic defect - Complex Vertebral Malformation (CVM) by polymerase chain reaction in combination with RFLP analysis and Real-Time PCR diagnostic SNPs. According to the results of genetic monitoring it have been identified heterozygous carriers of SLC35A3 gene mutations in two sires of Black-and-White Holstein and Hereford breeds of foreign selection.

УДК 636.22/28.082.12

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ КОМПЛЕКСНОГО УРОДСТВА ПОЗВОНОЧНИКА (CVM) У ПЛЕМЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**Е.С. Усенбеков, Ш.Н. Касымбекова, М.В. Соломадин**Казахский национальный аграрный университет,
Торговая компания «Zalma LTD», г. Алматы

Ключевые слова: комплексное уродство позвоночника, CVM, точечная мутация, полимеразная цепная реакция, Реал-Тайм ПЦР, племенные животные.

Аннотация. Авторами статьи проведено ДНК тестирование племенных быков-производителей зарубежной и отечественной селекции на наличие генетического дефекта – комплексного уродства позвоночника (CVM) с помощью полимеразной цепной реакции в сочетании с ПДРФ анализом и Реал-Тайм ПЦР SNPs диагностики. По результатам генетического мониторинга были выявлены гетерозиготные носители мутации гена SLC35A3 у двух быков-производителей голштинской черно-пестрой и герефордской пород зарубежной селекции.

Введение

В Республике Казахстан проблема скрининга племенной продукции, в частности, замороженной спермы быков-производителей отечественной и зарубежной селекции, племенных быков остается актуальным вопросом. Генетические дефекты в виде DUMPS, CVM сопровождаются абортами у коров, мертворожденностью телят, различными уродствами, низкой воспроизводительной функцией у коров [1].

Своевременное выявление носителей данной мутации позволит избежать скрещивания двух гетерозиготных особей или, наоборот, использовать при разведении под контролем в случае их высокой препотентности. Чтобы не допустить дальнейшего бесконтрольного распространения мутации, необходимо, наряду с тестированием быков-производителей, проводить тестирование популяций быкопроизводящих коров и ремонтного молодняка. Поэтому актуальным является выявление и исключения животных-носителей генетически обусловленного CVM-синдрома и оздоровления селекционно-племенного поголовья [2].

Исследованиями установлена G/T мутация в кодирующей части гена SLC35A3 при наследственном заболевании, комплексное уродство позвоночника (CVM). Ген SLC35A3, кодирующий синтез UDP- N – acetyl glucosamine transporter расположен на 3 хромосоме, размер гена 58582 пар нуклеотидов. В результате данной мутации произошла замена аминокислоты в составе пептида в позиции 180 валина на фенилаланин [3].

Для выявления носителей мутации комплексного уродства позвоночника CVM часто используются аллель специфические праймеры CVM – G, F 5'-CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAG- 3' и CVM – T, F 5'-CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAT- 3' и R 5'-CGATGAAAAAGGAACCAAAAGGG - 3'. ПЦР проводили в общем объеме 50 мкл, содержащем 1-2 ед. Taq - полимеразы, по 0,25 mM каждого dNTP, 67 mM трис -HCl pH 8,6, 1,5 mM MgCl₂, 16,6 mM NH₄OH, по 0,5 мкм каждого праймера и 100-150 нг ДНК.

Исследование фенотипического проявления комплексного уродства позвоночника проводилось учеными Дании, которые использовали в экспериментах органы, ткани от плода коров, абортированных во второй половине стельности и мертворожденных телят. Анализ полученных ими результатов показывает, что всего протестировано образцов от 107 телят, по результатам ПЦР диагностики из них 62 головы оказались гомозиготными носителями CVM, 16 образцов гетерозиготными носителями и 29 образцов были нормальными гомозиготными [4].

Полученные результаты свидетельствуют о роли носительства летальной рецессивной мутации в этиологии эмбриональной смертности у коров. Как видно на рисунке 1, характерными признаками CVM у телят являются уродство позвоночника, увеличение живота, выпадение языка, контрактура суставов, искривление грудного и шейного отделов позвоночника [4,5].



Рисунок 1 – Клиническое проявление синдрома – комплексное уродство позвоночника, CVM у телят

Анализ зарубежной литературы показывает, что сейчас учеными разрабатываются кроме метода классической полимеразной цепной реакции в сочетании с ПДРФ и метод Реал-Тайм ПЦР диагностики для детекции точечной мутации. Так, китайскими учеными амплификация нужного фрагмента ДНК генов CD 18 и SLC35A3, осуществлялась на основе метода Реал-Тайм ПЦР (ПЦР с детекцией накопленных продуктов амплификации в режиме реального времени) компании Roche (Roche), с использованием TaqMan-зондов, специфических пар праймеров, которые синтезировались лабораторией США Applied Biosystems [6].

Реал-Тайм ПЦР представляет собой метод, позволяющий выявить количество образующегося ПЦР-продукта в реальном времени, т.е. с каждым ПЦР - циклом. За прошедшие годы появилось множество различных методик типирования SNP, которые основаны на различных методах дискриминации аллелей. Чтобы понять каждую из технологий, необходимо разделять реакцию дискриминации аллелей и метод детекции. Продукты реакции дискриминации аллелей могут быть детектированы более чем одним методом и теми же методами может быть произведена детекция продуктов, полученных с помощью других реакций и образцов.

Так, большинство методов генотипирования SNP могут быть сгруппированы в четыре группы, исходя из их молекулярного механизма действия: аллель-специфическая гибридизация (allele specific hybridization), достройка праймера (primer extension), лигирование олигонуклеотидных фрагментов (oligonucleotide ligation) и рестриктазный анализ. Существует несколько методов выявления продуктов и их анализа по каждой группе перечисленных выше реакций (флюоресценция, люминесценция и т. д.).

Задачами нашего исследования были: оптимизация условий выделения ДНК из различных тканей (из спермы и крови), постановка технологии ПЦР диагностики комплексного уродства позвоночника (CVM), разработка Реал-Тайм ПЦР SNPs экспресс метода диагностики точечной мутации у крупного рогатого скота при CVM.

Материалы и методы исследований. Работа по генотипированию проводилась на 68 племенных быках-производителей АО «Асыл-Тулик» Акмолинской области и на 43 быках ТОО «Асыл» Алматинской области в рамках реализации проекта «Мониторинг племенных животных Республики Казахстан на носительство генетических дефектов с помощью молекулярно-генетических методов» на базе учебно-научно-диагностической лаборатории Казахстанско-Японского инновационного центра КазНАУ.

В нашей работе для Real-Time PCR SNPs диагностики точечной мутации CVM мы использовали праймеры для Реал-Тайм ПЦР, имеющие следующую последовательность: прямые F-5'-AGCTGGCACAATTTGTAGGT -3' и обратные R -5'-CTCAAAGTAAACCCAGCAAAGC-3' и внутренние меченые прямые F – VIC - 5'-TCATGGCAGTTCTCA – 3' и внутренние меченые обратные R – FAM - 5'-TCATGGCATTCTCA-3'. Для Real-Time PCR диагностики нами были заказаны у компании Applied Biosystems следующие компоненты на 40 образцов: праймер для секвенирования Sequence Detection Primer 80,0 nmol, фермент Taq DNA Polymerase Recombinant 500 U, набор для генотипирования на 40 реакции, TaqMan Genotyping Master Mix, Mini Pack 40 reactions, праймеры для Реал Тайм ПЦР диагностики CVM на 150 реакции (CUSTTQMN SNP ASSAYS NON-HUMAN).

В первую очередь нормализовали концентрацию образцов ДНК путем разбавления TE буфером до конечной концентрации 20-40 нг/мкл. Компоненты Real-Time PCR:

1. TaqMan Genotyping Master Mix (40 Ч набор для генотипирования) – 12,5 мкл
2. Прямые и обратные праймеры - 0,625 мкл
3. ДНК – 1,0 мкл
4. H₂O - бидистиллированная – 10,8 мкл.

Результаты исследования и их обсуждение. Для выявления точечной мутации CVM, при скринировании известных SNP в каждом случае нужны только те олигонуклеотиды, которые соответствуют известным аллельным вариантам. Такие аллель-специфические наборы олигонуклеотиды были использованы для кодирующей части гена SLC35A3 у крупного рогатого скота в позиции 559 G/T. Использование программы Real Time PCR Primer and Probe Database позволяет нам определить последовательности ДНК указанных генов. Следующий этап синтез праймеров с аллельспецифическим олигонуклеотидом G/T.

Необходимо отметить, что использование метода ПЦР-ПДРФ анализа для детекции носителей генетического дефекта CVM является сложным и трудоемким способом, так как нет соответствующей рестриктазы для выявления точечной мутации. Обычно для детекции носителей CVM используются различные варианты метода полимеразной цепной реакции: амплификация участка гена с помощью аллельспецифических праймеров (AS-PCR), создание сайта рестрикции при амплификации для выявления точечной мутации (CRS-PCR -created restriction site) и введение в последовательности праймера замену одного нуклеотида с целью создания сайта рестрикции для эндонуклеазы (PCR-PIRA).

Регистрация флуоресцентного сигнала проводится в процессе амплификации на специальном приборе - амплификаторе для Real-Time Step One Plus. По нарастанию интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью программного обеспечения, прилагаемого к амплификатору, вычисляется концентрация исходной матрицы ДНК. Real-Time PCR SNPs диагностика скрытого генетического дефекта CVM проводилась на приборе Американского производства Real-Time Step

One Plus Applied Biosystems марки 7500. Проведение данного эксперимента проводится в следующей последовательности: выбор типа эксперимента, выбор типа реагента и типа анализа.

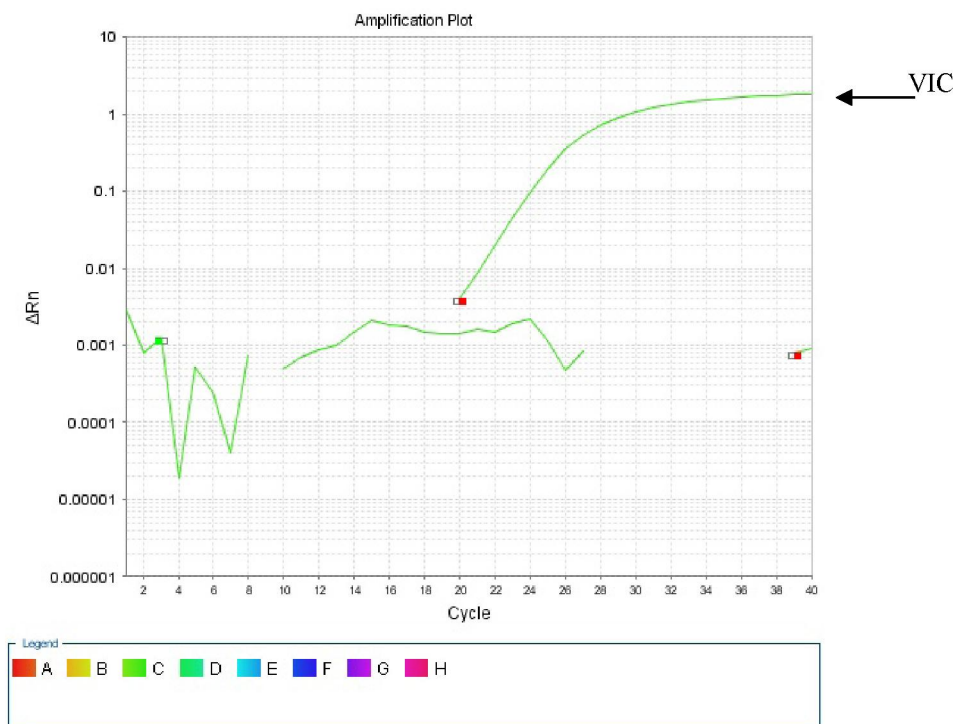


Рисунок 2 – Результаты Реал-Тайм ПЦР SNPs диагностики, гомозиготное здоровое животное по локусу SVM (амплификация с VIC зондом, дикий тип)

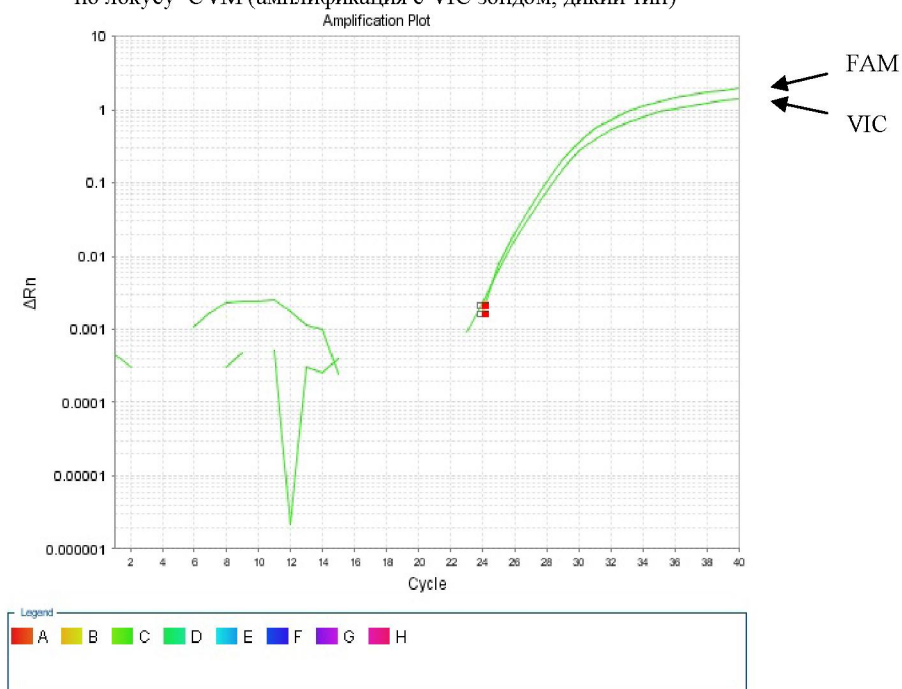


Рисунок 3 - Графическое изображение результатов Реал-Тайм ПЦР SNPs диагностики точечной мутации гена SLC35A3, гетерозиготный носитель SVM (амплификация с FAM зондом, мутантный тип и с VIC зондом, дикий тип)

Набор праймеров и зонды были разработаны на основании опубликованных результатов секвенирования, гена SLC35A3. В каждом наборе зондов, один зонд, который идеально совпадал с мутирующим геном, был обозначен как 5' при помощи 6-карбоксифлуоресцеина (FAM); другой

зонд, совпадающий с вариантом дикого типа, был обозначен 5'-VIC, кроме того, оба зонда включали в себя нефлуоресцентные гасители и частицы белка.

Real-Time PCR диагностику CVM проводили с помощью амплификатора Real Time StepOnePlus, объемом реакционной смеси 25 мкл. В пробирку Эппендорфа набираем компоненты реакционной смеси (на 15 реакций), имеющий состав: TaqMan Genotyping Master Mix 190 мкл, праймеры 9,5 мкл и бидистиллированная вода 10,8 мкл.

Затем смесь перемешиваем на вортексе и переносим реакционную смесь в количестве 24 мкл в стрипы и добавляем по 1 мкл ДНК. Во избежание загрязнения стрипов работаем в латексной перчатке и с помощью держателя герметично закрываем крышку стрипа.

Выводы

В связи с вышеизложенным, нами на заключительном этапе работы был разработан метод Реал-Тайм ПЦР SNPs диагностики для детекции носителей генетического дефекта CVM. Разработанный метод диагностики позволяет в течение двух часов точно определить здоровых гомозиготных животных и гетерозиготных носителей мутации (Рисунок 2, 3). У гетерозиготных носителей мутации идет амплификация с двумя зондами с VIC и FAM, соответственно образуются две кривые. Реал-Тайм ПЦР способ детекции точечной является экспресс методом и нет необходимости проведения этапов электрофореза и рестрикции продукта амплификации.

Следует отметить, что животные местных пород, Алатауской, Аулиекольской, Казахской белоголовой являются свободными от носительства наследственного заболевания – комплексного уродства позвоночника. В результате ДНК тестирования были выявлены два животных, гетерозиготные носители (бык-производитель голштинской черно-пестрой породы, индивидуальный № 1НО08415 CM-R-Run-Morty-Jacson-Et и бык-производитель породы геррефорд, индивидуальный № 2791092 Schu-Lar-3T) мутации гена SLC35A3 зарубежной селекции. Использование метода ПЦР-ПДРФ анализа для выявления носителей CVM является сложной и трудоемкой процедурой, так как нет соответствующей рестриктазы для детекции точечной мутации в кодирующей части гена SLC35A3. На основании исследования рекомендуем для исключения распространения вредной мутации CVM проводить мониторинг племенных животных с помощью Реал-Тайм ПЦР SNPs диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Rezaee A. R., Nassiry M. R., Sadeghi B., Motlagh A. S., Tahmoospour M. and Valizadeh R. (2009). Implication of complex vertebral malformation and deficiency of uridine monophosphate synthase on molecular-based testing in the Iranian Holstein bulls population. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (22), pp. 6077-6081
- [2] Riberio A L, Baron E E, Martinez M L & Coutinho L L (2000). PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 23: 831-834
- [3] Agerholm J S, Bendixen C, Andersen O & Arnbjerg J (2001). Complex vertebral malformation in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13: 283-289
- [4] Agerholm J S, Bendixen C, Arnbjerg J & Andersen O (2004) Morphological variation of complex vertebral malformation in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16: 548-553
- [5] Nagahata H., Oota H., Nitani A., Oikawa S., Higuchi H., Nakade T., Kurosawa T., Morita M. and Ogawa H. (2002). Complex Vertebral Malformation in a Stillborn Holstein Calf in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 64(12): 1107-1112.
- [6] Zhang Yi, Xuehua Fan, Dongxiao Sun, Yachun Wang, Ying Yu, Yan Xie, Shengli Zhang and Yuan Zhang Zhang (2012). A novel method for rapid and reliable detection of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3:24

АСЫЛ ТҰҚЫМДЫ ЖАНУАРЛАРДА ОМЫРТҚАНЫҢ КЕШЕНДІ КЕМТАРЛЫҒЫН (CVM) ЖАНАМА БАЛАУ ӘДІСТЕРМЕН АНЫҚТАУ

Е.С. Усенбеков, Ш.Н. Касымбекова, М.В. Соломадин

Түйін сөздер: омыртқаның кешенді кемтарлығы, CVM, нүктелік мутация, полимераздық тізбек реакциясы, Реал-Тайм ПТР, асыл тұқымды жануарлар.

Аннотация. Мақала авторлары отандық және шетелдік сұрыпталған асыл тұқымды бұқаларға омыртқаның кешенді кемтарлығына (CVM) – генетикалық ауруға полимераздық тізбек реакциясы мен рестрикцияланған фрагменттер ұзындығының полиморфизмі (РФҰП) және Реал-Тайм ПТР SNPs балау әдістерімен ДНК тестілеу жүргізген. Генетикалық мониторинг нәтижесіне сәйкес SLC35A3 генинің мутациясы, гетерозиготалы тасымалдаушы голштейн қара-ала және геррефорд тұқымдас шетелдік сұрыпталған екі бұқаларда анықталған.

Поступила 15.07.2016 г.