

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ОВЦЕВОДСТВА И КОЗОВОДСТВА - ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ
АГРАРНЫЙ ЦЕНТР»**

**МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД СКРИНИНГА
НАСЛЕДСТВЕННЫХ АНОМАЛИЙ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

(методические рекомендации)

**Ставрополь
«Агрус»
2018**

УДК 636.22/.28.082.12

Авторский коллектив:

В.И. Трухачев, академик РАН;
М.И. Селионова, доктор биол. наук, профессор РАН;
С.А. Олейник, доктор с.-х. наук, профессор;
Л.Н. Чижова, доктор с.-х. наук, профессор;
Н.З. Злыднев, доктор с.-х. наук, профессор;
А.К. Михайленко, доктор биологических наук; профессор;
Г.Т. Бобрышова, кандидат с.-х. наук, доцент;
Г.П. Ковалева, кандидат с.-х. наук, доцент;
Л.В. Кононова, кандидат с.-х. наук, доцент;
М.Н. Лапина, кандидат биол. наук;
Г.Н. Шарко, старший научный сотрудник.

ISBN 5-94873-018-2

В работе изложены методические подходы проведения ДНК-диагностики генетических заболеваний крупного рогатого скота молочного направления продуктивности. Приведена имеющаяся информация о наследственных заболеваниях, включающая новейшие данные о взаимодействии генов, а также о роли генотипа племенных животных, в частности производителей, на наследственные факторы, обуславливающие динамические изменения генотипического состава стад, популяций, пород. Кроме общих методических подходов, детально описаны этиология, клинические проявления рецессивных генетических болезней и наследственная предрасположенность к ним. Особое внимание уделено таким практически важным вопросам, как организация и проведение генетического скрининга, выявляющего скрытых носителей наследственных дефектов, профилактике распространения наследственных заболеваний в стадах молочного скота.

Методические рекомендации предназначены для зооветспециалистов, биологов, занимающихся проблемами генетического мониторинга в животноводстве, а также аспирантам, студентам биологических специальностей.

Рекомендованы к изданию Ученым советом факультетов ветеринарной медицины и технологического менеджмента ФГБОУ ВО Ставропольский аграрный университет (протокол № 5 от «27» декабря 2017 года) и ученым советом ВНИИОК - филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ» (протокол № 4 от «10» ноября 2017 года).

ISBN
X-XXXX-XX-X

ВНИИОК - филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ»

Оглавление

Перечень сокращений	4
Введение	5
1. Наследственные генетические заболевания молочного скота	7
2. Этиология, клинические признаки рецессивных генных заболеваний	10
3. Оборудование	20
4. Материалы и методы выявления мутаций	25
5. Скрининг мутаций наследственных дефектов молочного скота	33
Заключение	42
Список использованной литературы	43

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) – дефицит адгезии лейкоцитов
- BL – носитель мутации BLAD
- TL – свободен от мутации BLAD
- CVM (Complex Vertebral Malformation) – комплексный порок позвоночника
- CV – носитель мутации CVM
- TV – свободен от мутации CVM
- DUMPS – дефицит уридинмонофосфатсинтетазы
- DP – носитель мутации DUMPS
- TD – свободен от мутации DUMPS
- BY (брахиспина) – смертность на стадии эмбриона
- BD – носитель мутации укорочения верхней челюсти
- TB – свободен от мутации укорочения верхней челюсти
- DF – носитель мутации карликовости
- TD – свободен от мутации карликовости
- HL – носитель мутации безволосости
- TH – свободен от мутации безволосости
- IS – носитель гена частичного ороговения кожи
- TI – свободен от мутации частичного ороговения кожи
- MF – носитель гена синдактилии (однокопытность)
- TF – свободен от гена синдактилии
- RC – красно-пестрая гомозигота
- B/R – гетерозигота по гену красной масти
- FXID – дефицит фактора XI крови
- BC – цитруллинемия
- АРОВ – аполипопротеин В (дефицит холестерина), гаплотип НСD
- FANCI – анемия Фанкони, комплементарная группа I (брахиспина BY), гаплотип НН0
- АРАF1 – апоптотический протеаза-активирующий фактор 1, гаплотип НН1
- SMC2 – белок структурной поддержки хромосом 2, гаплотип НН3
- GART – фосфорибозилглицинами дсинтетаза, гаплотип НН4
- TFB1M – митохондральный транскрипционный фактор В1, гаплотип НН5

Введение

Интенсивное использование мирового породного генофонда крупного рогатого скота и биотехнологий репродукции (искусственное осеменение, трансплантация эмбрионов) позволили значительно повысить генетический потенциал продуктивности животных.

В последнюю четверть XX века черно-пестрая голштинская и айрширская породы по численности в России и во всем мире заняли первое место среди пород молочного направления.

Благодаря завозу племенного материала из США и Канады в Европу, а также и в другие страны, интенсивному использованию производителей голштинской породы на черно-пестром скоте, резко возросли удои коров [3, 4]. Это связано с их высоким генетическим потенциалом молочной продуктивности, скороспелости, способности к интенсивному раздоя, пригодности к машинному доению и другими ценными качествами [1, 2]. Однако широкое использование ограниченного контингента производителей привело к тому, что в разных странах фиксировалось рождение телят с различными аномалиями, которые, как показал анализ, имели наследственную основу, обусловленную мутациями генов.

Современные методы искусственного осеменения дают возможность получать от каждого производителя десятки тысяч потомков, что значительно сокращает сроки ввода ценных генных комплексов в селекционном процессе, с одной стороны, реальную опасность генетической эрозии – обеднения или сужения генофонда, а также, в случае, если лидеры породы оказываются носителями вредной мутации, данная мутация может охватить в ближайшей перспективе миллионы голов, а для ее ликвидации потребуется длительное время и огромные средства, с другой.

Не случайно в странах с развитым животноводством действуют национальные программы генетического мониторинга, включающие как обязательный элемент генетическое обследование животных на присутствие

наследственных заболеваний. В России подобные исследования предусмотрены статьей 19 федерального закона «О племенном животноводстве» и регламентируются Государственными программами: «Генетическая экспертиза племенной продукции (материала) в Российской Федерации», утвержденной в МСХ и продовольствия РФ, 1998 г. и «Национальная система генетической экспертизы и оценки генетического статуса пород и типов крупного рогатого скота, свиней, овец», утвержденной МСХ РФ, 2010 г., а также приказом об утверждении правил в области племенного животноводства «Виды организаций, осуществляющих деятельность в области племенного животноводства», утвержденным МСХ РФ, 2011 г.

Однако в России отсутствует организация регулярного контроля генетических дефектов быков-производителей с введением соответствующих рекомендаций и указаний в племенной службе. До настоящего времени не ясны вопросы юридической ответственности перед хозяйствами за экономический ущерб, наносимый генетическими заболеваниями в результате продажи-покупки дефектного семени. Все это сдерживает применение методов молекулярной генетики в животноводческой практике в РФ.

В настоящей работе изложены основные сведения о генетических аномалиях. Основной упор сделан на характеристику наиболее часто встречаемых генетических дефектах молочного скота. Описаны методы и приемы по идентификации наследственных заболеваний. Указаны приборы и оборудование для проведения молекулярно-генетических исследований.

Предпосылкой к разработке настоящих рекомендаций являются результаты анализа скрининговых работ, свидетельствующие о наличии генетических дефектов у молочного скота, разводимого в хозяйствах Ставропольского края.

1. Наследственные генетические заболевания МОЛОЧНОГО СКОТА

В настоящее время у крупного рогатого скота известно и описано более 200 наследственных заболеваний. Быстрота и точность диагностики многих из них значительно повысились благодаря достижениям молекулярной генетики, развитию молекулярно-генетических методов регистрации полиморфных локусов ДНК и мутационных изменений, созданию эффективных ДНК-диагностических процедур [14].

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 [15]. Часть генных мутаций вызывает летальный исход на разных этапах внутриутробного развития или вскоре после рождения животных.

Существует международная единая система обозначения наиболее часто встречающихся мутаций:

BL – носитель мутации BLAD; TL – свободен от мутации BLAD.

CV – носитель мутации CVM; TV – свободен от мутации CVM.

DP – носитель мутации DUMPS; TD – свободен от мутации DUMPS.

BD – носитель мутации укорочения верхней челюсти; TB – свободен от мутации укорочения верхней челюсти.

DF – носитель мутации карликовости; TD – свободен от мутации карликовости.

HL – носитель мутации безволосости (на теле практически отсутствует шерстный покров); TH – свободен от мутации безволосости.

IS – носитель гена частичного ороговения кожи; TI – свободен от мутации частичного ороговения кожи.

MF – носитель гена синдактилии (однокопытность); **TF** – свободен от гена синдактилии.

RC – красно-пестрая гомозигота; **B/R** – гетерозигота по гену красной масти; **TR** – свободен от гена красной масти в гетерозиготном состоянии.

В молочном животноводстве России наиболее частовстречаемыми являются:

CVM (комплексный порок позвоночника) – смертность на стадии эмбриона. Комплекс аномалий позвоночника, сложный тератологический синдром телят голштинской породы, заключающийся, прежде всего, в абортах, преждевременных родах, мертворождении или смерти телят в первые дни жизни, а значит, воздействующий на смертность молодняка и воспроизводительные способности скота. Самым ярким проявлением этой аномалии, о чем говорит уже само ее название, являются многочисленные уродства скелета. Носители данной мутации также распространены в популяциях голштинской и черно-пестрой породы всего мира;

BLAD (дефицит лейкоцитарной адгезии, врожденный иммунодефицит), мутация в гене *ITGB2*, ассоциированном с этим заболеванием, обуславливает резкое снижение устойчивости телят к бактериальным инфекциям и приводит к смерти в первый год жизни теленка, носители данной мутации распространены в популяциях голштинской и черно-пестрой породы всего мира;

DUMPS (дефицит уридинмонофосфатсинтетазы) – наследственное летальное аутосомно рецессивное заболевание в голштинской популяции, приводящее к ранней эмбриональной смертности на стадии имплантации эмбриона в матку. Это связано с нарушением синтеза уридин-монофосфата в организме, который является одним из ключевых элементов при *de novo* синтезе пиримидиновых нуклеотидных оснований. Смертность эмбриона наступает примерно на 40-й день после оплодотворения;

BY (брахиспина) – смертность на стадии эмбриона. Ключевой участок генома, который отвечает за проявления этого заболевания, был выявлен только в 2011 году, а системный анализ на носительства летального аллеля,

вызывающее это заболевание, проводится только с 2012 года. Что является причиной высокого процента носительства этого заболевания среди популяций голштинской породы по всему миру, достигая в некоторых странах 14-15%. Распространенность этого заболевания достигает 10% в Российской популяции черно-пестрой и голштинской породы. Родоначальник: бык-производитель US1682485 Sweet Haven Tradition;

FXID (дефицит фактора XI крови) – хронические заболевания кровеносной системы. Фактор XI крови – это один из более чем 15 протеинов, участвующих в свертывании крови. Дефицит фактора XI крови приводит к спонтанным кровотечениям и нарушению свертываемости крови. Для больных коров характерно наличие крови в молоке во время лактации. Животные, пораженные этим недугом, предрасположены к пневмонии, маститу и метриту. Снижение показателей репродуктивности и некондиционное качество молока у животных, больных этим заболеванием приводит к значительным экономическим потерям в молочной индустрии;

ВС (цитруллинемия) – смертность наступает в первый год жизни теленка. При рождении телята, гомозиготные по летальному аллелю, ассоциированному с цитруллинемией, выглядят нормальными, но в течение 6 суток у них проявляется депрессия ЦНС, атаксия, слепота, они бьются головой, затем начинаются конвульсии, повышается температура и наступает смерть после проявления тетании (при высокой температуре, гиперпноэ) и комы. Неконтролируемое распространение этого заболевания приводит к значительным экономическим убыткам.

2. Этиология, клинические признаки рецессивных генных заболеваний

Комплексный порок позвоночника (CVM). Причиной этой наследственной аномалии является аутосомная рецессивная мутация SLC35A3-гена, способствующая значительному его отклонению от нормального процесса развития и появления множественных аномалий. Поэтому все плейотропно действующие гены летальны и гомозиготные по SLC35A3 генотипу не жизнеспособны [16, 17].

Высокий процент скрытых носителей CVM в поголовье скота за рубежом грозит распространением этого генетического дефекта и в России. К сожалению, в нашей стране длительное время ДНК-диагностику заболевания сдерживало то, что патент на мутацию, обуславливающую CVM, был у датских ученых. И только в 2005 г. ВГНИИЖ приобрел лицензию на проведение этой диагностики. Ученые института разработали собственную методику анализа, которая позволяет достоверно выявить как явных носителей CVM, так и скрытых. Было изучено распространение CVM среди быков-производителей, использующихся на племпредприятиях России. Оказалось, что доля быков-скрытых носителей CVM – на племпредприятиях России составляет 3,7 %. Это означает, что в среднем 1 из 27 производителей, используемых в системе искусственного осеменения, – скрытый носитель этого наследственного дефекта.

Результаты мониторинга и их анализ свидетельствует о проникновении генетического груза в Россию в основном путем завоза быков-производителей, их спермы или нетелей из Голландии и США, в меньшей степени – из Германии и Канады [18, 19].

Первым установленным носителем CVM явился бык-производитель П. Айвенго Стар (Pennstate Ivanhoe Star USA 000001441440) 1963 года рождения. Дальнейшее распространение мутации происходило через его сыновей, внуков, правнуков (таблица 1). Молекулярный тест на определение носительства этого

генетического дефекта было разработан в 2006 году В. Thomsen et. al. [33]. Большое количество потомков, используемых в селекционном процессе, значительный временной промежуток между возникновением генетической аномалии и разработкой метода по ее установлению и обусловил значительное распространение этой генетической мутации.

Таблица 1 – Распределение по линиям быков-скрытых носителей SVM

Линия	Количество быков-скрытых носителей SVM	
	п	%
Монтвик Чифтейн 95679	17	70,8
Рефлекшин Соверинг 198998	3	12,3
Говернер 882933	2	8,3
Уэс Идеал 933122	1	4,2
В.Б. Айдиал	1	4,2
Итого	24	100,0

Начавшееся, в 80-90 годах прошлого столетия, широкое использование в РФ скрытых носителей SVM, создало ситуацию появления большого процента носителей среди племенного поголовья, в том числе среди быкопроизводящей группы животных. Это подтверждают результаты исследования дочерей двух быков – скрытых носителей SVM. От них получено 216725 доз семени, 35541 потомок, в том числе 18523 сына и 17023 дочери. Случайная выборка из 23 дочерей этих быков показала, что 7 из них (30,4 %) оказались скрытыми носителями SVM [21].

Совершенно нет уверенности в том, что животные – скрытые носители SVM и в настоящее время не продолжают завозиться в нашу страну.

Синдром SVM сопровождается многочисленными уродствами скелета новорожденных телят: большое количество полупозвонков, сросшихся и деформированных позвонков, неправильное развитие позвоночных дисков, сколиоз, кифоз, расщепление позвоночника надвое, ребра либо слиты между собой проксимальными или средними частями, либо уникалатерально и/или

билатерально редуцированы [22, 23]. Перечисленные пороки встречаются в заднешейном и переднегрудном отделах позвоночника. Исследователи отмечают, что чаще всего встречаются уродства от первого шейного до второго поясничного, в 13, 18, 19 и 20 поясничных позвонках. Частота встречаемости пораженных позвонков колеблется от 2 до 18. При этом поражения шейного и грудного отделов зачастую сопровождаются артрогрипозом. Известен случай полного отсутствия поясничных, крестцовых и хвостовых позвонков, т.е. пояснично-крестцовый отдел заменен мягкими тканями [24, 25].

Кроме того, многочисленные уродства позвоночника сопровождаются поражением передних или задних конечностей, атрофированностью мышц. Однако, вместе с тем, изменения в строении черепа и головы не отмечены, но присутствует каудовентральное смещение ушей, высунутый язык и поражения конъюнктивы глаз. Как правило, уродства телят сопровождаются низкой живой массой, а также аномалиями внутриутробных органов (выпячивание брюшной полости и пупочная грыжа) [26,27].

Кроме того, отмечаются и различные пороки сердечно-сосудистой системы (дефект интравентрикулярной перегородки сердца, гипертрофия правого желудочка, правосторонняя позиция дуги аорты и перемещение легочной артерии), а также ателектаз легких, западение легких вследствие слабости дыхательных движений, в некоторых случаях у абортированных плодов недоставало одной почки [28]. Регистрировались и случаи нарушения осевого скелета в пояснично-крестцовой области, сопровождающиеся отклонениями в развитии половой системы: при нормальном развитии яичника и рога матки, присутствовало недоразвитие наружных половых органов, отсутствие шейки матки, а тело матки каудально соединено с мочевым пузырем и краниально с ободочной кишкой, а прямая кишка – в виде тонкостенного мешочка, наполненного слизистыми желто-коричневыми массами, оканчивающегося щелевидным анусом, открытым на 0,5 см [29].

Изучено, что позвоночник проходит 3 стадии развития: в первой стадии образуется хорда – гибкий несегментированный тяж, идущий вдоль средней

линии спинной стороны эмбриона, во второй стадии из хрящевых структур формируется тело позвонков и сам позвоночник. В третьей стадии происходит замена хрящевых структур на костный скелет [30].

Согласно теории эмбриональной индукции Шпемана, в определенных частях зародыша возникают организующие факторы-индукторы, которые оказывают индуцирующее влияние на другие участки зародыша, обуславливая его развитие в определенном направлении. Организатор первого порядка находится в дорсальной губе бластопоры. Он индуцирует участок эктодермы, обуславливая его развитие в нервную пластинку.

Нервная пластинка и хорда определяют развитие и взаимное расположение других частей зародыша.

В течение эмбриогенеза происходит важная стадия, в ходе которой, нервная трубка трансформируется и прикрепляется своим каудальным концом к бластопору. Уродства или нарушения миграции нервной трубки на данной стадии будут сопровождаться частично неправильным развитием хорды, следствием чего будут и позиционные аномалии некоторых брюшных органов [31]. В то же время врожденные дефекты могут быть результатом нарушений в переходных стадиях эмбрионального развития. Возникновение дефектов может обуславливать аномалии либо в одной клеточной группе или системе органов [32].

Как правило, морфогенез и нормальная клеточная дифференциация должны быть четко синхронизированы с экспрессией определенных генов: активные гены выстраивают правильное соответствие множества временных и пространственных структур, что и способствуют процессу развития. Эти структуры по существу являются переводом одномерной хромосомной ДНК в трехмерную структуру [33].

Учеными выяснено, что за специфику построения тела отвечают *Homeobox* – гены (*Hox 1.1*) и их протеиновая продукция. *Hox 1.1*-гены экспрессируются в виде отдельных структур центральной и периферической нервной системы, осевого скелета и нервной трубки на уровне от 4-го шейного до 1-го

поясничного позвонков. Клетки склеротома (зародышевые зачатки костно-хрящевой ткани) также отражают экспрессию Нох 1.1-гена и являются предшественниками ребер, позвонков, мезодермы желудка и, позднее метанефроса Нох 2.1- и Нох 3.1-гены также имеют большое значение в формировании клеточной памяти и определении местоположения клеток вдоль передней и задней оси хорды [34]. Нох 2 преимущественно участвует в формировании отделов задней части мозга, всей длины спинной хорды, мезонефроса, тогда как Нох 3.1 чаще встречается в предпозвоночной области и по дорсо-вентральной оси эмбриона. Тканеспецифичная экспрессия этих генов происходит в течение эмбрионального, постнатального периодов, а также у зрелого организма [35].

Вышеизложенное свидетельствует о том, что причиной нарушения органогенеза, а также появления уродств групп скелетных, нервных и висцеральных органов, представленных у CVM – пораженных телят, является мутация в семействе Homebox – генов.

Дефицит лейкоцитарной адгезии BLAD. Три семейства адгезивных белков (иммуноглобулинов, интегринов и селектинов), являющиеся гетеродимерами, каждый из которых состоит соответственно из α -субъединиц (CD11a, CD11b и CD11c) и общей β -субъединицы (CD18), обеспечивают взаимодействие клеток друг с другом, а также с экстрацеллюлярным матриксом на уровне молекул. Семейство интегринов в свою очередь включает следующие факторы LFA-1, Mac-1 и p150,95, известные в международной классификации как CD11/CD18 [36]. Локус CD18 человека располагается на хромосоме 21q22.3, тогда как у крупного рогатого скота – на хромосоме 1 в группе синтении U10. Учеными доказано, что дефицит Mac-1 гликопротеина (CD11b/CD18) у крупного рогатого скота черно-пестрого генеалогического корня, сопровождается синдромом гранулоцитопатии, аналогично нарушению адгезии у человека, что послужило основанием обозначения этого явления как синдром BLAD. Это явилось удобной моделью для сравнительной медицины человека и ветеринарной медицины при изучении синдрома лейкоцитарной

адгезии у человека и животных. То есть ситуация интеграции сравнительной генетики человека и животных особенностей клинических проявлений заболевания, фенотипических, генетических и других показателей, служит хорошей основой для разработки диагностических подходов [37, 38].

Синдром VLAD проявляется резким снижением β_2 интегрин на поверхности лейкоцитов (менее 2% от 160 кД белка здорового животного), что сопровождается резким падением функциональной активности фагоцитоза, эндотелиальной адгезии, невозможностью выхода лейкоцитов за пределы кровеносного сосуда и хемотаксисом. Лейкоциты, больных VLAD, содержат очень низкое количество β_2 интегрин на своей поверхности. Все это происходит из-за мутаций CD18 гена кодирующего гликопротеиновое вещество или β_2 интегрин, а именно: в этом локусе две мутации, – одна «немая», в 775 положении цитозин замещается на тимин, что ведет в 259 положении аминокислотной последовательности замене лейцина на изолейцин. Вторая мутация связана с заменой нуклеотида аденина на гуанин в 383 позиции ДНК, вызывающая в свою очередь замещение в положении 128 аспарагиновой кислоты на глицин [39].

Молекулярной основой VLAD является точечная мутация в кодирующей части гена CD18, имеющая аутосомно-рецессивный характер наследования. Замена (аденин-гуанин) в положении 383 в ДНК приводит к аминокислотной замене в молекуле белка, в результате чего нарушается вся цепочка экспрессии γ – интегрин, 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. 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 [40].

Оказалось, что гомозиготные телята заболевают и погибают в ранний период онтогенеза (2-4 месяца), как правило, не доживают до года.

Больные телята значительно отстают в росте и развитии (94%) по сравнению со сверстниками и очень восприимчивы к различного рода инфекционным и инвазионным заболеваниям, сопровождающимся нарушениями в деятельности желудочно-кишечного тракта (64%), верхних дыхательных путей (40%), воспалением легких (62%), ротовой полости (40%), частичным выпадением зубов. Как правило, симптоматическое лечение таких животных – безрезультативно и они погибают до годовалого возраста [41].

У особей, гомозиготных по рецессивному аллелю, резко снижается устойчивость к бактериальным и вирусным инфекциям, замедляется рост. Большинство телят погибает в возрасте 3-7 мес. от кишечных и легочных инфекций.

Мутация быстро распространилась в голштинской породе из-за доминирования потомков быка-производителя К.М. Айвенго Белла (Carlin-M Ivanhoe Bell USA000001667366) 1974 года рождения, а также его многочисленных сыновей, внуков и других родственных групп. Носительство мутации было установлено в 1992 году Shuster D.E. et al. [42].

Уридинмонофосфатсинтетаза (DUMPS). Как отмечалось выше, практика ввоза молочного скота из-за рубежа свидетельствует о том, что наряду с быстрым увеличением продуктивности животных и ростом производства молока проявляются и негативные факторы, такие как распространение различных наследственных заболеваний, в том числе вызываемых редкими мутациями, накопившимися в популяциях [43, 44].

Известно, что в раннем эмбриогенезе наиболее активно работают гены, определяющие структуру белка, ответственные за дифференцировку тканей, закладку органов систем. Мутации в этих генах с гипоморфным, гипер- или неоморфным действием приводят к летальному исходу.

Наиболее ярким примером нарушений контроля биосинтеза белка является такой генетический дефект, как дефицит фермента уридинмонофосфатсинтетазы, получивший аббревиатуру DUMPS-синдрома.

По данным исследователей эта рецессивная мутация обнаружена у голштинского скота и у гомозигот вызывает раннюю эмбриональную смерть, а у гетерозигот – изменение уровня оротата в моче, молоке, сыворотке крови [45].

Аутосомная рецессивная мутация DUMPS, приводящая к дефициту активности фермента уридинмонофосфатсинтетазы, является причиной дефектов синтеза нуклеиновых кислот и проявляется мегалобластозами, т.е. увеличением размеров клеток, например, эритроцитов и разрастанием эритробластной системы. Наблюдается также проявление дефектов функционирования нервной системы. Этой мутацией отягощен, главным образом, скот голштинской породы. Гетерозиготы фенотипически нормальны, но активность фермента в различных тканях у них в 2 раза меньше, чем у нормальных гомозигот [46].

Недостаточность уридинмонофосфатсинтетазы и связанное с ним наследственное заболевание давно описаны для человека, и дефицит уридинмонофосфата крупного рогатого скота, имеет с ним сходство [47].

У крупного рогатого скота дефицит уридинмонофосфатсинтетазы был впервые выявлен в 1983 году как заболевание, которое характеризуется гибелью гомозиготных эмбрионов. В ходе исследований было выяснено, что ген DUMPS наследуется как моногенный аутосомнорецессивный признак, являющийся результатом точковой мутации, возникшей и получившей широкое распространение среди представителей голштинской породы благодаря масштабному применению искусственного осеменения [48].

Причина заболевания была обозначена после того, как был выделен и секвенирован ген уридинмонофосфатсинтетазы, установлено, что заболевание обусловлено точечной мутацией (C→T) в 405 кодоне. Это приводит к образованию преждевременного стоп-кодона и усеченной с-терминальной

субъединицы протеина. Точка мутации обозначена как R405Stop. Изучен молекулярный механизм мутации: у гетерозиготных животных вследствие точечной замены C→T кодон 405 CGA, кодирующий аргинин, заменяется нонсенс-кодом (Stop-codon) TGA [49].

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. У животных-носителей синдрома DUMPS происходит синтез укороченного белка с нарушенными биологическими функциями. Из-за отсутствия каталитически активного сегмента белковой молекулы фермент лишен активности. Данный фермент связан с воспроизводительной функцией животных и влияет на выживаемость потомства. Мутация вызывает гибель эмбрионов, как правило, после первых 40 дней развития. Однако, в ряде случаев, у носителей данной мутации отмечается задержка роста, а в отдельных случаях – более длительные межотельные периоды. Мутации зарегистрированы у черно-пестрых голштинов в США и Европе, а также у животных красно-пестрой, голштинской породы в Швейцарии. У носителей этой мутации отмечается задержка роста и другие отклонения, что может заканчиваться летальным исходом [50].

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. Тем не менее, по мнению исследователей, 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 [51].

С помощью специального теста у фенотипически нормальных гетерозиготных животных можно диагностировать снижение активности фермента уридинмонофосфатсинтетазы, 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, то исследователи полагают, что данная мутация вызывает нарушение декарбоксилазной функции.

Возникновение мутации определено у быка-производителя С. С. Нед (Skokie Sensation Ned USA 000001308101) 1957 года рождения. Метод выявления носительства скрытого генетически рецессивного заболевания был разработан в 1984 году R.D. Shanks et. al. [49].

3. Оборудование




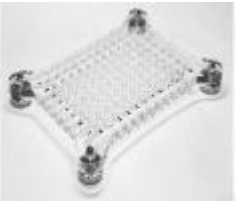

Для выявления мутантных аллелей в генах VLAD и SVM используется метод полимеразной цепной реакции. В таблице 2 приведены зоны и комплектация оборудования для проведения ПЦР-анализа.

Таблица 2 – Комплектация лаборатории для проведения ПЦР-анализа

ЗОНА А ПРИЕМ, РЕГИСТРАЦИЯ И ПЕРВИЧНАЯ ОБРАБОТКА МАТЕРИАЛА		
изображение оборудования	название и характеристика	назначение
	Центрифуга лабораторная Hettich Universal 320R <ul style="list-style-type: none"> • скорость 15 000 об/мин • температурный диапазон - 20°C...+ 40°C 	Осаждение и разделение компонентов проб с возможностью охлаждения
ЗОНА Б ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК		
изображение оборудования	название и характеристика	назначение
	Бокс бактериальной воздушной среды БАВп-01-«Ламинар-с»-1,5 <ul style="list-style-type: none"> • производительность 1560 м³/час • габариты рабочей камеры 140x61x68 см 	Защита оператора при работе с патогенными агентами и микроорганизмами, передающимися воздушно-капельным путем
	Мультивортекс CV 1500 <ul style="list-style-type: none"> • диапазон скорости 500-3000 об/мин • платформа на 12 образцов 	Интенсивное перемешивание одновременно до 12 образцов

	<p>Аспиратор с сосудом-ловушкой BioSan FTA-1</p> <ul style="list-style-type: none"> • вакуум -500 мбар • объем сосуда 1 л 	<p>Удаление следовых количеств спирта/буфера со стенок пробирок при выделении и очистке НК</p>
	<p>Бактерицидный рециркулятор BioSan UVR-M</p> <ul style="list-style-type: none"> • УФ-лампа 25 Вт • продуктивность 14 м³/час 	<p>Дезинфекция воздуха помещения при помощи УФ</p>
	<p>Термостат программируемый «Терцик»</p> <ul style="list-style-type: none"> • диапазон температур +25°С...+ 120°С • блок 28x0,5 мл + 40x1,5 мл 	<p>Поддержание постоянной температуры образцов в пробирках, помещенных в гнезда термоблока</p>
	<p>Высокоскоростная миницентрифуга BioSan MicroSpin 12</p> <ul style="list-style-type: none"> • скорость 1000 - 10000 об/мин • ротор 12x1,5 мл 	<p>Центрифугирование образцов при выделении НК, осаждение биологических компонентов</p>
	<p>Система очистки лабораторной воды Millipore Simplicity UV</p> <ul style="list-style-type: none"> • производительность 0,5 л/мин 	<p>Получение сверхчистой воды I типа</p>
	<p>Холодильник с морозильной камерой</p>	<p>Хранение образцов и компонентов полимеразной цепной реакции</p>

	<p>Вертикальный низкотемпературный морозильник Стинол</p> <ul style="list-style-type: none"> • объем камеры 333л • диапазон -50°С...-86 °С 	<p>Долговременное хранение коллекции образцов и стоковых растворов компонентов ПЦР</p>
	<p>Штативы для пробирок 0,2, 0,5 и 1,5 мл</p>	<p>Размещение пробирок с образцами и компонентами ПЦР на всех этапах работы оператора</p>
	<p>Комплект дозаторов переменного объема Ленпипет</p>	<p>Автоматическое дозирование объема жидкости</p>
<p>ЗОНА В ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-РВ</p>		
<p>изображение оборудования</p>	<p>название и характеристика</p>	<p>назначение</p>
	<p>Анализатор нуклеиновых кислот «АНК-32», прибор для определения в режиме реального времени флуоресцентной детекцией специфической последовательности нуклеиновых кислот (ПЦР-РВ, real-time PCR)</p>	<p>Проведение полимеразной цепной реакции</p>
	<p>Бокс для стерильных работ BioSan UVT-S-AR</p> <ul style="list-style-type: none"> • две УФ-лампы 30 Вт • размер рабочей поверхности 1200x520 мм 	<p>Чистая работа с ДНК-пробами, обеспечение защиты от контаминации при выделении НК и приготовления реакционной смеси для ПЦР</p>

	<p>Мультивортекс CV 1500</p> <ul style="list-style-type: none"> • диапазон скорости 500-3000 об/мин • платформа на 22 образцов 	<p>Интенсивное перемешивание одновременно до 12 образцов</p>
	<p>Бактерицидный рециркулятор BioSan UVR-M</p> <ul style="list-style-type: none"> • УФ-лампа 25 Вт • продуктивность 14 м³/час 	<p>Дезинфекция воздуха помещения при помощи УФ</p>
	<p>Холодильник с морозильной камерой</p>	<p>Хранение образцов и компонентов полимеразной цепной реакции</p>
	<p>Штативы для пробирок 0,2, 0,5 и 1,5 мл</p>	<p>Размещение пробирок с образцами и компонентами ПЦР на всех этапах работы оператора</p>
	<p>Комплект дозаторов переменного объема Ленпипет</p>	<p>Автоматическое дозирование объема жидкости</p>

ЗОНА Г ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР		
изображение оборудования	название и характеристика	назначение
	<p>Прибор для электрофореза Helicon</p> <ul style="list-style-type: none"> • размер геля 12,4x14,5 см • разделение до 40 образцов • объем буфера 580 мл 	<p>Электрофоретическое разделение продуктов амплификации нуклеиновых кислот в агарозном геле</p>
	<p>Источник питания Эльф-4</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1000 мА, 400 В, 200 Вт • подключение до 2х камер 	<p>Электрофоретическое разделение продуктов амплификации нуклеиновых кислот в агарозном геле</p>
	<p>Система гель-документации «Gel Imager-2»</p> <ul style="list-style-type: none"> • фотокамера Canon • темная комната BDA Box 2 • трансиллюминатор 312 uv TCP-15C (15 V) • ПК с монитором 19" • термопринтер Mitsubishi • программное обеспечение BDA software 	<p>Документирование результатов гель-электрофореза</p>
	<p>Весы электронные ВК-600</p>	<p>Приготовление агарозного геля для электрофоретического разделения продуктов амплификации</p>
	<p>Микроволновая печь</p>	<p>Приготовление агарозного геля для электрофоретического разделения продуктов амплификации</p>

4. Материалы и методы выявления мутаций

4.1. Биоматериалом для исследований служит кровь, сперма, ткань и др. Выделение ДНК из крови осуществляется с применением стандартных наборов (ООО «Изоген», г. Москва), с соблюдением следующей последовательности:

в пробирку объемом 1,5 мл вносится 100 мкл исследуемой пробы, добавляется 400 мкл лизирующего реагента и перемешивается содержимое пробирки переворачиванием (5-10 раз);

пробирки со смесью термостатируются 5-7 мин. при температуре 65°C;

добавляется 20 мкл суспензии сорбента NucleoS™;

пробирки помещаются на ротатор и перемешиваются 10 мин (10-20 об/мин);

центрифугируются 10 с при 5000 g;

осторожно, не задевая осадка, удаляется супернатант с помощью водоструйного насоса;

к осадку добавляется 200 мкл лизирующего реагента, тщательно перемешивается на вортексе до полного гомогенного состояния;

в пробирки добавляется 0,5 мл рабочего раствора солевого буфера (содержимое флакона с 10-кратным солевым буфером, 5 мл, переносится в мерный цилиндр, доводится бидистиллированной водой до метки 50 мл и 96% этиловым спиртом до метки 150 мл и перемешивается);

содержимое пробирок перемешивается переворачиванием пробирки 5-10 раз;

центрифугируется 10 с при 5000 g;

осторожно удаляется супернатант, не задевая осадка, с помощью водоструйного насоса;

в пробирки добавляется 0,5 мл солевого буфера, содержимое пробирок перемешивается на вортексе; центрифугируется 10 с при 5000 g и осторожно удаляется супернатант с помощью насоса;

повторяется, как описано выше;

осадок высушивается при t -ре 65°C в течении 4-5 мин;

к осадку вносится 50-100 (80) мкл Экстра Гена™;

содержимое пробирки суспендируется на вортексе 5-10 с до получения гомогенной суспензии, после чего термостатируется 4-5 мин при t -ре 65°C ;

перед центрифугированием содержимое пробирки суспендируется на вортексе еще раз;

центрифугируется 1 мин при 10 000 g;

супернатант с ДНК переносится в чистую пробирку, ДНК хранится при температуре -20°C (до года).

4.2. Для выявления точечных мутаций CVM и BLAD используется метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). При скринировании известных SNP, в каждом случае нужны только те олигонуклеотиды, которые соответствуют известным аллельным вариантам.

Разработанный компанией ЗАО Синтол набор реагентов «CVM-BLAD» для определения комплексной аномалии позвоночника и дефицита лейкоцитарной адгезии у крупного рогатого скота является уникальным, не имеет аналогов, так как позволяет одновременно диагностировать две аномалии.

Так, для кодирующей части гена CD18 у крупного рогатого скота используются аллель-специфические наборы олигонуклеотиды в положениях 383 А – G, а для диагностики CVM точечная G – T мутация гена SLC35A3 в позиции 559 (таблица 3).

ПЦР-РВ основано на флуоресценции интеркалирующих красителей, интенсивность которых значительно возрастает при их внедрении в двухцепочечные молекулы ДНК, что позволяет наблюдать за накоплением продуктов амплификации. При этом используются аллель-специфические зонды комплементарные продукту ПЦР. Зонд содержит флуорофором и гаситель флуоресценции при этом возможно использование как концевое, так и внутреннего мечения олигонуклеотида. При отсутствии мишени, т.е.

последовательности, комплементарной зонду, флуорофор и гаситель сближаются, в результате флуоресценция зонда подавляется.

Таблица 3 – Характеристика генетических дефектов крупного рогатого скота

Основные параметры	Название генетического дефекта	
	CVM	BLAD
Название гена	SLC35A3	CD18
Локализация гена, пар нуклеотидов	Хромосома 3	Хромосома 1
Размер гена	58582	37901
Замена нуклеотида wild type/mutant type	в позиции 559G – T	в позиции 383 A – G
Здоровые гомозиготные	G/G	A/A
Гетерозиготные носители	G/T	A/G
Гомозиготные носители	T/T	G/G

При наличии комплементарного зонду фрагмента ДНК происходит гибридизация с ампликоном и возрастание интенсивности сигнала на соответствующем флуорофору канале флуоресценции с каждым циклом ПЦР, пропорционально накоплению ампликонов.

Мониторинг сигнала позволяет построить кинетическую кривую реакции, при этом, момент заметного увеличения сигнала и отрыва его от фонового – так называемый пороговый цикл – зависит от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл. Сравнение кинетики накопления продуктов амплификации по кривым плавления в исследуемых (специфические фрагменты ДНК) и контрольных образцах позволяет определить генотип животных по генам CVM и BLAD.

Для определения СТ и CV аллелей используются 2 канала – Green и Yellow. Нормальный СТ аллель дает рост сигнала по каналу Green, детектируемый флуорофором FAM, а мутантный аллель CV – по каналу Yellow, детектируемый флуорофором R6G. Что касается TL и BL аллелей, то

для их определения используется также 2 канала – Orange и Red. Нормальный TL аллель дает рост сигнала по каналу Orange, детектируемый флуорофором ROX, а мутантный аллель BL – по каналу Red, детектируемый флуорофором Cy5. Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия кривой флуоресценции. При оптимальном количестве копий ДНК, кривая хорошо просматривается, начиная с 20-25 цикла до окончания 45 циклов амплификации.

Использование кривых не требует никаких дополнительных манипуляций с пробирками, а интерпретация полученных данных осуществляется автоматически (таблица 4).

Таблица 4 – Интерпретация результатов анализа определения CVM и BLAD

Ген	CVM	
Аллель	Аллель G (нормальный)	T (мутантный)
Канал	FAM (красный)	R6G (зеленый)
CVM не обнаружен	+	–
CVM обнаружен	+	+
Ген	BLAD	
Аллель	A (нормальный)	G (мутантный)
Канал	ROX (фиолетовый)	Cy5 (коричневый)
BLAD не обнаружен	+	–
BLAD обнаружен	+	+

Результат реакции для животного, не имеющих мутантных аллелей в локусах **CVM** и **BLAD**, должен быть положительным по каналам **FAM** и **ROX**, отрицательным по каналам **R6G** и **Cy5**.

Так, генотип такого животного на графике представляет собой две кривые: одну фиолетового и другую красного цвета, которые хорошо визуализируются, начиная с 25 цикла (рисунок 1).

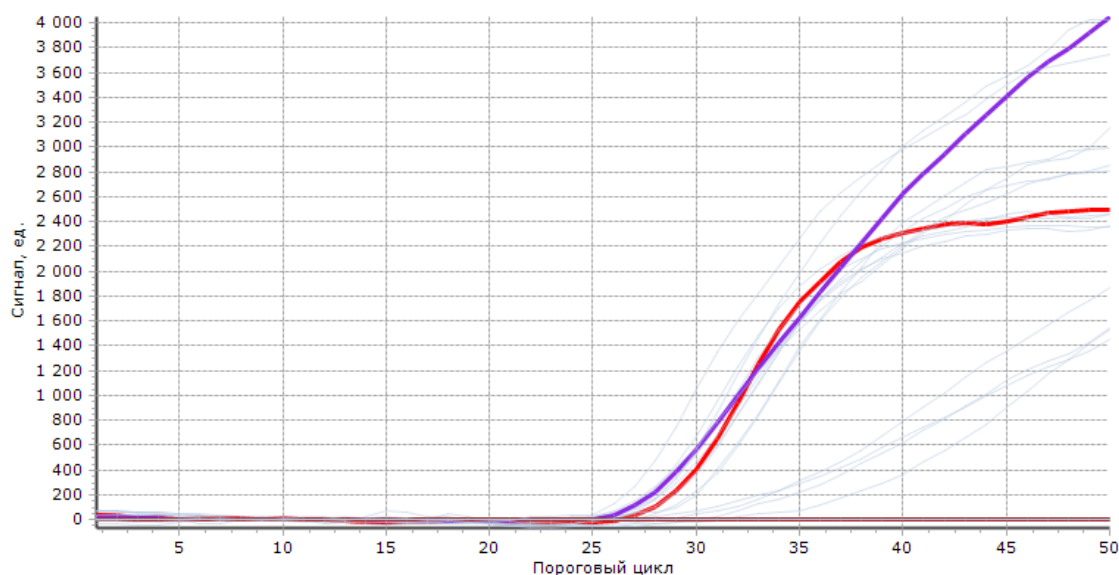


Рисунок 1 – Генотип гомозиготного по TV и TL аллелям животного

Результат реакции для гетерозиготного животного, носителя аномалий **CVM** и **BLAD** (мутантных CV и BL аллелей) должен быть положительным по двум каналам и четырем флуоресцентным красителям – **FAM, ROX, R6G, Cy5**.

На рисунке 2 приведен результат исследования гетерозиготного животного. Отчетливо видно, что, начиная с 25 цикла, происходит резкое нарастание кинетических кривых реакции, представленных соответственно красным, фиолетовым, зеленым и коричневым цветами и их отрыв от фонового уровня.

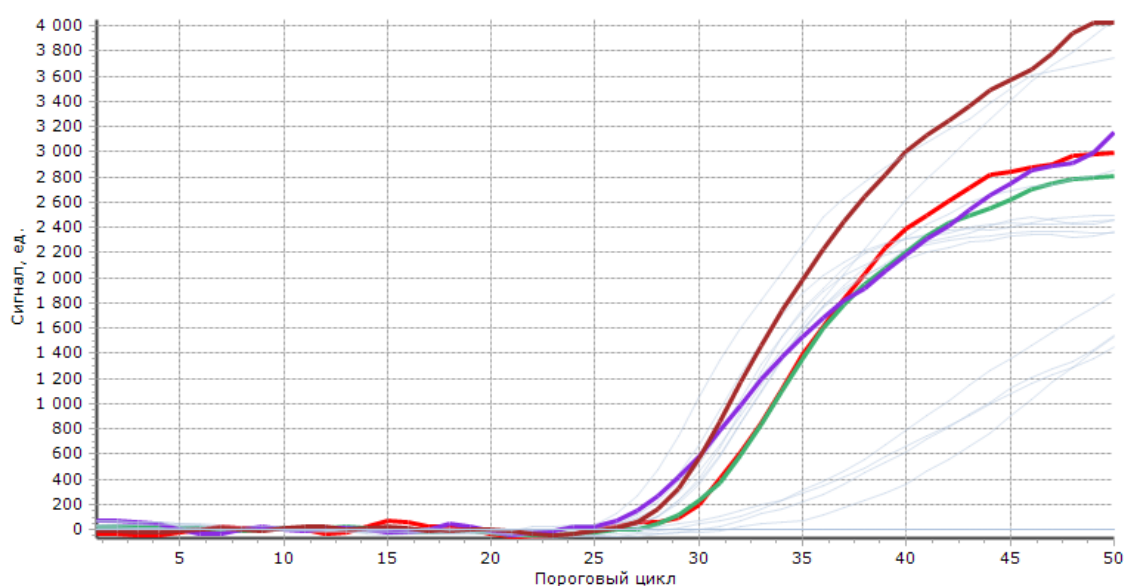


Рисунок 2 – Результаты исследования гетерозиготного животного-носителя мутантных CV и BL аллелей

На рисунке 3 представлен генотип животного, гомозиготного по мутантным аллелям CV и BL в генах CVM и BLAD. В данном случае отчетливо видны две кинетические кривые флуоресцентных красителей **R6G** и **Cy5** соответственно зеленого и коричневого цветов.

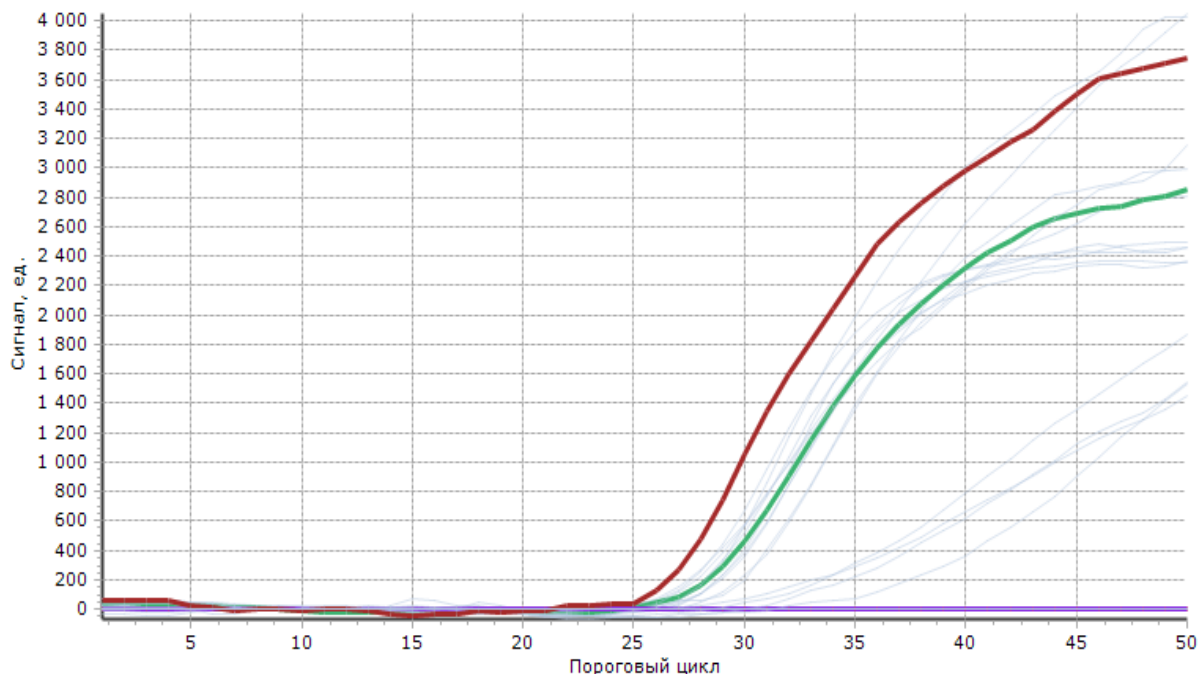


Рисунок 3 – Результаты исследования гомозиготного носителя мутантных CV и BL аллелей

В случае отрицательного результата реакции по каналам **FAM**, **ROX**, **R6G**, **Cy5** – необходимо повторное исследование образца.

На рисунке 4 представлен интерфейс фрагмента исследования, выполненного на анализаторе нуклеиновых кислот (АНК-32, «Синтол», Москва) с использованием наборов реагентов, изготавливаемых этим же производителем. Представлены кривые флюоресценции генотипов 28 животных и 4 контрольных образцов.

При использовании прибора для проведения полимеразно-цепной реакции в реальном времени на другом приборе необходима адаптация наборов под программу прибора и используемых каналов детекции.

При идентификации мутации **DUMPS** (дефицит уридинмонофосфатсинтетазы) используется метод гель-электрофореза с визуализацией продуктов ПЦР-ПДРФ под ультрафиолетовым светом.

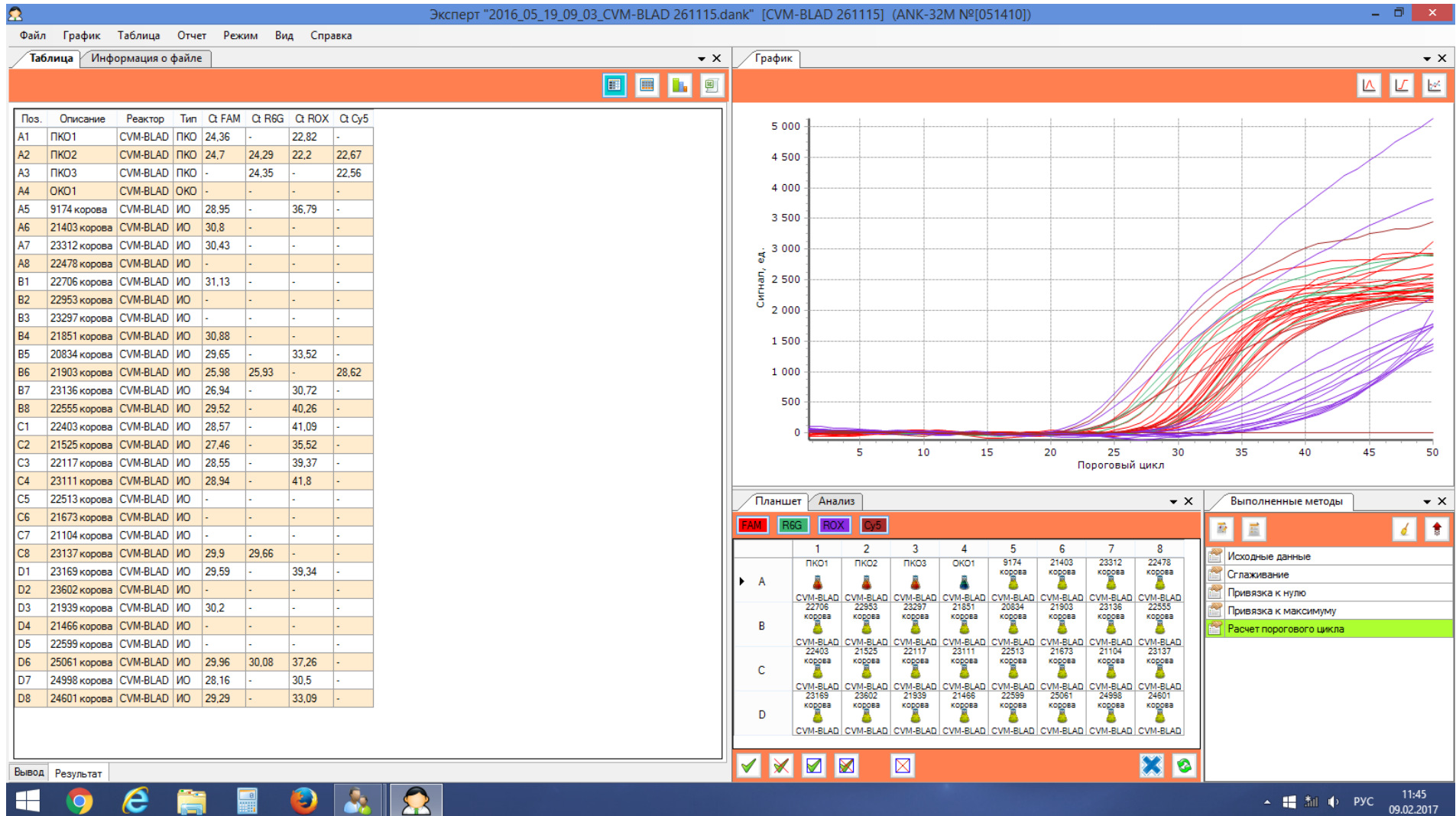


Рисунок 4 – Интерфейс результатов исследования по определению CVM и BLAD у крупного рогатого скота на приборе АНК-32

Амплификация проводится с помощью двух синтезированных олигонуклеотидных праймеров следующего состава: UMPS L 5`GCAAATGGCTGAAGAACATTCTG -3` UMPS R 5` GCTTCTAACTGAACTCCTCGAGT-3`.

Режим амплификации: «горячий старт» (94°C – 4 мин); 35 циклов ПЦР: денатурация (94°C – 1 мин); отжиг праймеров (62°C – 1 мин); элонгация (72°C – 1 мин). В амплифицируемом участке ДНК находятся два сайта узнавания для эндонуклеазы *Ava*1.

Рестрикция ДНК (разрезание, разрывание) производится с помощью рестриктаз, которые относятся к группе бактериальных эндонуклеаз. Если мутации известны, то они выявляются с помощью фенотипов-рестриктаз, которые распознают строго определенные нуклеиновые последовательности. Использование рестриктаз позволяет разрезать двойную нить ДНК в определенных последовательностях из 4-8 нуклеотидов. Разрезанные участки мутантной ДНК отличаются по длине от нормальных участков.

Размер амплификата составляет 108 п.н. В случае разрезания продукта амплификации рестриктазой на фрагменты 53, 36, 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 мутаций) и, если образуются фрагменты 89, 19 п.н., животное диагностируется как гомозиготный DP/ DP DUMPS-генотип (больное животное).

Регулярный контроль за распространением мутации значительно снизит ущерб, наносимый животноводству. В противном случае может привести к увеличению частоты мутантных аллелей в популяции. Бесконтрольное использование в селекционных программах племенного поголовья крупного рогатого скота, который не тестируется на наличие наследственных аномалий, является экономически неоправданным и небезопасным.

5. Скрининг мутаций наследственных дефектов МОЛОЧНОГО СКОТА

Как отмечалось выше, в последние годы особую актуальность приобрела проблема распространения вредных летальных рецессивных мутаций у племенного молочного скота. При этом мутации проявляются, практически, во всех породах молочного направления продуктивности с регулярной повторяемостью появления новых дефектов [52].

Наиболее крупная на сегодня база данных, содержащая информацию о наследственных дефектах 16 видов животных, - OMIА Университета Сиднея. Она содержит фенотипическое описание 398 наследственных аномалий крупного рогатого скота и 214 аномалий свиней, в том числе соответственно 145 и 45 аномалий, обусловленных изменениями в одном локусе, из которых 79 и 18 наследственных дефектов описано на молекулярном уровне (<http://omia.angis.org.au/home>) [53].

Селекционное значение имеют те мутации, носителями которых являются интенсивно используемые быки-производители. Существует поэтапный подход выявления летальных генетических дефектов. Первый – основан на первоначальной регистрации заболевания с последующим картированием хромосомного региона и идентификаций соответствующей мутации. В результате чего были открыты такие значительные генетические дефекты как BLAD, CVM, DUMPS (описанные выше). Следующий этап основан на выявлении (по результатам полногеномного секвенирования или SNP-скрининга с использованием ДНК-чипов высокой и средней плотности) участка хромосом, характеризующихся потерей гомозиготности по одному из аллелей на фоне сегрегации обоих аллелей в используемой популяции, и не требует наличия информации о фенотипических признаках заболевания. Для их обозначения был предложен термин «гаплотипы фертильности».

К ним относятся генетические дефекты, ассоциированные с эмбриональной смертностью, удлинением сервис-периода, возрастом

количества осеменений на одну стельность, аборт, увеличением межотельного периода, удлинением лактации.

Согласно утвержденной номенклатуре, наименование гаплотипа состоит из двух латинских букв и порядкового номера. Первая буква обозначает породу Н – Holsten, вторая – Н – haplotype. У голштинского скота изучено 7 гаплотипов – НСD, НН0, НН1, НН2, НН3, НН4, НН5 [54].

В настоящее время установлены гены и точечная локализация соответствующих LoF-мутаций (LoF-потеря функций – loss of function) для указанных гаплотипов фертильности (таблица 5).

Таблица 5 – Гены и соответствующие гаплотипы ассоциированные с фертильностью крупного рогатого скота

Гаплотип			Ген	
Наименование	Частота встречаемости, %	Стадия стельности	Символ	Наименование (дефект)
НСD	2,50	до 90 д. ж.	АРОВ	Аполипопротеин В (Дефицит холестерина, CDH)
НН0	2,76	250-270 д. с.	FANCI	Анемия Фанкони, комплементарная группа I (Брахиспина ВУ)
НН1	1,92	стельность	АРАF1	Апоптотический протеаза-активирующий фактор 1
НН2	1,66	до 90 д. с.	–	–
НН3	2,95	до 60 д. с.	SMC2	Белок структурной поддержки хромосом 2
НН4	0,37	стельность	GART	Фосфорибозилглицинами дсинтетаза
НН5	2,22	до 60 д. с.	TFB1M	Митохондральный транскрипционный фактор В1

Примечание: д. ж. – день жизни (теленка); д. с. – день стельности (для телок)

В середине 2015 года на конференции в Орлеане (США) было сделано сообщение о регистрации летального гаплотипа голштинского скота, картированного на хромосоме 11, вызывающего нарушения в метаболизме холестерина, сопровождающегося потерей веса, аппетита, диареей,

неподдающемуся медикаментозному лечению. Следствием является гибель телят в первые месяцы жизни. В крови гетерозиготных животных выявлено пониженное содержание холестерина, у гомозиготных – полное его отсутствие. Этот гаплотип получил название гаплотипа дефицита холестерина – HCD.

Установлено, что причиной HCD является инсерция мобильного LTR-элемента (ERV2-1) размером 1299 bp после позиции 77.958.994 на BTA11 (UMD3.1), расположенная между нуклеотидами 24-м и 25-м нуклеотидами экзона 5 гена APOB (ген рецептора липопротеинов низкой плотности) и приводит к отсечению 97% соответствующего белка длиной 4567 аминокислот (Gly135ValfsX10). Ген APOB занимает центральное место в системе аполипопротеинов и является обязательным компонентом липопротеинов низкой плотности и хиломикронов [55, 56].

Распространению гаплотипов среди племенного скота способствует то, что широко используемые быки-производители, зачастую, являются их носителями. Так, быки HARTLINE TITANIC (1998 г.р.), Comestar STORMATIC (1997 г.р.) и Ladino Park TALENT (1998г.р.) оказались носителями гаплотипа HCD, от которых только в Канаде было получено, соответственно, более 100 и 52 тысяч лактирующих дочерей.

Гаплотип HH0, ассоциированный с мертворождением, картирован в области 20-25 Mb на 21-й хромосоме гена FANCI. Выявлена связь с гаплотипом HH0 делеции размером 3,3 kb в гене FANCI, которая включала экзоны 25-27-й из 37 экзонов, интроны 25-й, 26-й и частично интроны 24-й и 27-й. Мутация в гене FANCI у крупного рогатого скота вызывает нарушение эмбрионального развития, снижение массы плода, нарушение роста, позвоночные уродства – укорочение позвоночного столба, что зачастую сопровождается аномалиями развития внутренних органов (сердце, печень, почки).

Ген FANCI (Fanconi anemia complementation group I) необходим для поддержания хромосомной стабильности. Этот белок специфически связываясь как с одноцепочечной, так и с двухцепочечной ДНК, принимает активное участие в активации клеточного цикла на фазах S и G₂.

Анализом данных о показателях фертильности североамериканских голштинов, генотипированных с помощью Bovine SNP50 Bead Chip, идентифицированы новые летальные гаплотипы, которые встречались в гомозиготном состоянии. Один из них локализованный на ВТА5, в области 58-66 Mb (UMD 3.0 genome assembly), получил название гаплотипа фертильности НН1, связанный с эмбриональной смертностью на разных сроках стельности. Установлено, что причиной снижения фертильности, ассоциированной с НН1, служит нонсенс-мутация С→Т в гене АРАF1 (апоптотический протеаза-активирующий фактор 1), приводящий к замене Gln на Stop кодон в позиции 579 аминокислотной последовательности [57]. Функциональный пептид АРАF1 инициирует апоптоз и необходим для нормального эмбрионального развития [58].

Носителями гаплотипа НН1 оказались два известных быка-производителя американского происхождения: Pawnee Farm Arlinda CHIEF (1962 г.р.) и его сын Walkway Chief MARK (1978 г.р.), от которых было получено более 60 тыс. дочерей и целый ряд сыновей, ставших в последующем активно используемыми быками-производителями, среди которых Shoreman MASON (1990 г.р.) с более 70 тысячами лактирующих дочерей.

Гаплотип НН2 является причиной гибели плодов до 100-х суток стельности, картирован в области 92-97 Mb на 1-й хромосоме. Позднее McClure M.C. et. al. (2014) обозначили его расположение между позициями 94.860.836 и 96.553.339 Mb. Однако точная локализация этой мутации пока не установлена. Активное использование быка канадского происхождения Comestar OUTSIDE (1994 г.р.) и его сына England-Ammon MILLION (2003 г.р.), от которых получено более 100 и 70 тыс. дочерей, способствовало распространению гаплотипа НН2 [59].

Гаплотип НН3, связанный с эмбриональной смертностью до 60-х суток стельности, картирован на 8-ой хромосоме 90-95 Mb [54]. Позже была уточнена его локализация – на 94-96 Mb и установлена ассоциация гаплотипа НН3 с мутацией в гене SMC2 (structural maintenance of chromosomes 2), который

играет важную роль в процессах репарации ДНК, к конденсации хромосом и их сегрегации в процессе клеточного деления [60]. Причиной мутации является несинонимичная замена Т→С в позиции 95.410.507 24-го экзона в гене SMC2, приводящая к аминокислотной замене Phe→Ser в положении 1135 в НТФазном домене кодирующего белка [59].

Скрытым носителем гаплотипа НН3 оказался известный бык OMAN-O-Vee-Manfred Justice (1998 г.р.), имеющий более 100 тысяч дочерей и ряд оцененных сыновей, ставшие отцами более, суммарно, 800 тысяч лактирующих коров. В частности, среди носителей НН3 – бык Macomber-O-Man-BOGART (2004 г.р.) у которого 23 тысячи дочерей.

Гаплотип НН4, приводящий к эмбриональной смертности, локализован на 1-й хромосоме в области 1,9-3,3 Mb [60]. Установлено, что гаплотипу НН4 соответствует миссенс-мутация А→С в положении 1.277.227 в гене GART (glycinamide ribonucleotide formyltransferase), приводящая к аминокислотной замене Asn→Thr в позиции 290. GART – трифункциональный пептид, который участвует в биосинтезе пуринов *de novo* и необходим для нормального эмбрионального развития [62].

Бык французского происхождения JOCKO BESNE, от которого было заморожено более 1,7 млн. доз семени, является носителем НН4 гаплотипа.

Гаплотип НН5, с которым связаны эмбриональные потери до 2 мес. стельности, картирован на 9-й хромосоме в области 92.350.052-93.910.957 [63]. Причиной эмбриональной смертности, является делеция размером 138 kb (точки разрыва и слияния соответственно в позициях 93.232.651 и 93.370.998 UMD 3.1). На участках, прилегающих к разрывам с обеих сторон, найдены повторяющиеся элементы – член семейства Bov-B (upstream) и L1ME3 из семейства L1 LINE (downstream), это послужило основанием для вывода о том, что мутация произошла вследствие гомологичной рекомбинации/делеции. Делеция затрагивает полную последовательность гена TFB1M (mitochondrial transcription factor B1, TFB1M). TFBM1 необходим для инициации трансляции

белков в митохондриях, поэтому его отсутствие у животных, гомозиготных по мутации, вызывает летальный исход [64].

Бык английского происхождения Picston SHOTTLE (1999 г.р.) с более 100 тыс. дочерей оказался носителем HH5 гаплотипа.

Основная причина накопления гаплотипов фертильности в популяциях крупного рогатого скота заключается в том, что интервал от возникновения мутации до их идентификации и разработки тест-систем для скрининга и выявления скрытых носителей составляет 18-59 лет (таблица 6).

Таблица 6 – Быки-скрытые носители, являющиеся родоначальниками гаплотипов фертильности

Гаплотип	Родоначальник мутации		Идентификация мутации	
	№ и кличка	Год рождения	Год	Ссылка
HCD	CAN 000005457798 Maughlin STORM	1991	2016	Menzi F. et al., 2016
HNO	USA 000001682485 Sweet Haven TRADITION	1974	2012	Charlier C. et al., 2012
HH1	USA 1427381 Pawnee Farm Arlinda CHIEF	1962	2012	Adams H.A. et al., 2012
HH2	CAN334489 Willowholme MARK ANTHONY	1975	2014	McClure M. et al., 2014
HH3	USA 1556373 GLENDALL Arlinda Chief	1968	2013	Hayes B. et al., 2013
	USA 1244845 Gray View SKYLINER	1954		
HH4	FRA4486041658 BESNEBUCK	1986	2013	Fritz S. et al., 2013
HH5	CAN264804 THORNLEA TEXAL SUPREME	1957	2013 ,	Cooper T.A., 2013
HHB	USA000001667366 Carlin-M IVANHOE BELL	1974	1992	Shuster D.E. et al., 1992
HHС	USA 000001441440 Pennstate IVANHOE STAR	1963	2006	Thomsen B. et al., 2006
HHD	USA000001308101 Skokie Sensation NED	1957	1984	Shanks R.D. et al., 1984

Результаты анализа родословных 560 быков-производителей [65], используемых в РФ свидетельствуют, что встречаемость мутаций гаплотипов варьирует от 1,6 до 5,4 (таблица 7).

Таблица 7 – Встречаемость LoF-мутаций фертильности у быков-производителей, используемых в РФ, %

HCD	НН0	НН1	НН2	НН3	НН4	НН5
5,4	3,2	3,2	3,4	5,4	1,6	4,1

В 2016 впервые ДНК-диагностикой были исследованы быки-производители, используемые в стадах Ставропольского края (СПК КПЗ «Казьминский» Кочубеевского, ООО «Приволье» Красногвардейского, ООО СП «Чапаевское» Шпаковского районов) на носительство мутаций в гаплотипах фертильности – HCD, НН1, НН3, НН4 и НН5. Было выявлено два носителя LoF-мутации в гаплотипе HCD, и по одному в гаплотипах НН3 и НН5.

Для предотвращения распространения скрытых мутаций наряду с генетическим скринингом быков-производителей не меньшее внимание должно уделяться коровам с нарушениями воспроизводительной функции (аборты, рождение мертвых телят, гинекологические заболевания), так как существует вероятность присутствия в этой группе животных скрытых носителей генетических дефектов.

Анализ материалов первичного зооветеринарного учета, журналов осеменений и отелов коров, регистрации приплода позволил установить случаи абортов, рождения мертвых телят и гинекологических заболеваний (таблица 8).

Таблица 8 – Характеристика выборки коров с проблемами воспроизводства

№ п/п	Хозяйство	Всего, коров	Исследовано коров, гол.	В том числе случаи		
				абортов	мертворожденных	гинекологические заболевания
1	СХПК «Россия»	850	32	11	6	15
2	СПК КПЗ «Кубань»	310	26	8	9	9
3	СПК КПЗ «Казьминский»	378	35	9	10	16
4	СПК колхоз им. Ворошилова	713	44	4	6	22
5	ООО СП «Чапаевское»	1015	37	8	5	24
6	СПК КПЗ «им. Чапаева»	573	36	7	6	23
7	ООО «Приволье»	584	22	-	-	22

В результате скрининговых работ стад молочного скота установлено присутствие генетических аномалий в локусе гена **VLAD** – 3 головы, выявленные у абортированных коров в ООО СП «Чапаевское», одна корова – СПК КПЗ «Казьминский» с гипофункцией правого яичника и одна голова с нарушением воспроизводительного цикла в ООО «Приволье» (таблица 9).

Таблица 9 – Распределение генетических аномалий у коров с нарушениями воспроизводительной функции

Локус гена	Нарушение функции воспроизводства, гол.			
	всего	аборты	после мертворожденных телят	гинекологические причины
VLAD	3	1	-	2
CVM	1	1	-	-
DUMPS	2	-	1	1
BC	-	-	-	-
BY	3	-	2	1
FXID	-	-	-	-
HH1	-	-	-	-
HH3	-	-	-	-
HH4	-	-	-	-
HH5	-	-	-	-

В локусе гена **CVM** мутантная аллель присутствовала у абортированной коровы (СПК колхоз имени Ворошилова).

Мутантная аллель в локусе **DUMPS** присутствовала в двух случаях: у коровы, родившей мертвого теленка (ООО СП «Чапаевское») и в группе коров с нарушениями функции воспроизводства (СПК колхоз имени Ворошилова).

Аномалия в гене **BY** выявлена у 2-х коров, родивших мертвого теленка (ООО СП «Чапаевское») и у коровы с гинекологическим заболеванием (СПК колхоз имени Ворошилова).

Выявленная ситуация свидетельствует об актуальности скрининга стад голштинского и голштинизированного скота, разводимого в хозяйствах Ставропольского края.

Для определения причин появления мутантных аллелей в стадах

молочного скота необходим генеалогический анализ выявления путей передачи генетического груза.

Одним из основных методических подходов контроля распространения мутаций, обуславливающих наследственные дефекты и постепенное их элиминирование из племенных стад молочного скота является системная организация в проведении скрининговых работ, которая позволит, прежде всего, оценить генетическую ситуацию в каждом хозяйстве, провести целенаправленный подбор родительских пар для получения потомства, лишённого генетических дефектов, установить причину нарушений функции воспроизводства коров. Такой подход позволяет осуществить идентификацию генетических дефектов в течение очень короткого периода времени, определить статус животных на носительство наследственных аномалий, получить информацию о их распространении в стадах, что необходимо для составления генетического профиля при подборе родительских пар, разработки планов, программ селекционно-племенных работ, направленных на элиминацию генетических дефектов как в отдельных стадах, так и в племенных хозяйствах края, в целом. С учетом количества животных, подлежащих ДНК-диагностике, для каждого хозяйства рассчитывается оптимальное поголовье для проведения скрининговых работ по выявлению генетических дефектов (таблица 10).

Таблица 10 – Группы животных, подлежащие ДНК-диагностике наследственных заболеваний (для племенных хозяйств)

Группы животных	Всего голов	Подлежат ДНК - диагностике		Примечание
	n	n	%	
Быки-производители	4	4	100	в случаях отсутствия данных о генотипировании
Коровы селекционного ядра (высокопродуктивные)	500	150	30	с учетом ротации
Первотелки	400	200-280	50-70	с учетом ротации
Коровы с проблемами воспроизводства:				
аборт	20	10	50	
гинекологические заболевания	30	15	50	в случаях превышения нормы
рождение мертвых телят	10	10	100	
рождение уродов	6	6	100	

Системный скрининг обеспечивает: высокую информативность, возможность использования любого исходного биоматериала (кровь, сперма, кожа), проведение диагностики в раннем возрасте, независимо от пола и физиологического состояния, длительность хранения образцов при низких температурах, а высокая производительность метода (50 и более голов в день) – минимальную стоимость работ по ДНК-диагностике.

Заключение

Благодаря фундаментальным достижениям в биотехнологии генетические факторы, в настоящее время, используются в решении вопросов не только при прогнозе селекционной перспективности сельскохозяйственных животных, но и при оценке их генетического благополучия, являющегося одним из основных факторов экономической составляющей животноводческой отрасли.

Сложность ситуации заключается в том, что основная часть врожденных дефектов не имеет клинического проявления в течении всей жизни животного, кроме того, зачастую, носителями наследственного дефекта являются высокопродуктивные и, как правило, широко используемые в селекционном процессе животные.

В этой связи значительная роль отводится организации и проведению скрининговых работ по выявлению генетически наследуемых заболеваний. Одним из ключевых элементов по выявлению наследственных аномалий является организация и проведение системного генетического скрининга. Что дает возможность определить статус племенных животных на носительство наследственных дефектов, контроля их распространения, разработать программы, направленные по их элиминации, как в стадах, так и в хозяйствах в целом.

Системная организация скрининговых работ позволяет осуществлять идентификацию летальных генетических дефектов в воспроизводительной части стада (быки-производители, коровы селекционного ядра, первотелки) до случайной компании. Такой подход обеспечивает участие в селекционном процессе животных, лишенных генетического груза.

Список использованной литературы

1. Багиров, В.А. Сохранение и рациональное использование генофонда животных / В.А. Багиров, Ш.Н. Насибов, П.М. Кленовицкий, В.А. Воеводин, Н.А. Зиновьева, Л.К. Эрнст, В.В. Калашников, В.А. Солошенко // Доклады РАСХН. – 2009. – № 22. – С. 37-40.
2. Янчуков, И.Н. Научно-практические основы системы племенной работы с молочным скотом на региональном уровне управления: Автореф.дис...д. с.-х. н.:06.02.07, Москва-Балашиха: ГАЗУ. – 2012. – 47 с.
3. Букаров, Н.Г. Генетический мониторинг – методология повышения эффективности разведения крупного рогатого скота / Н.Г. Букаров, Е.Ю. Лебедев, А.З. Канеев, И.М. Морозов // Материалы международной научно-практической конференции: Прошлое, настоящее и будущее зоотехнической науки. – Дубровицы, 2004. – Вып. 62. – Т.1. – С. 43-46.
4. Кузнецов В.М. Современные методы анализа и планирования селекции в молочном стаде. Зональный НИИСХ Северо-Востока. - Киров, 2001. – 116с.
5. Эрнст, Л.К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Л.К. Эрнст, Н.А. Зиновьева. Москва.: 2008. – 508 с.
6. Способ получения высокопродуктивных производителей сельскохозяйственных животных / В.Л. Петухов, Л.К. Эрнст, А.И. Жёлтиков и др. Патент на изобретение RUS 2414124 15.06.2009.
7. Эрнст, Л.К. Мониторинг генетического груза в черно-пестрой, голштинской и айрширской породах крупного рогатого скота / Л.К. Эрнст, А.И. Жигачев, В.А. Кудрявцев // Зоотехния. – №3. – 2009. – С. 5-10.
8. Кудрявцев, В.А. Спектр врожденных генетически обусловленных аномалий у телят потомков одного быка / В.А. Кудрявцев, А.И. Жигачев // Сборник науч. трудов № 136. – СПб. Издательство СПбГАВМ. – 2004. – С. 56-58.
9. Косовский, Г.Ю. Популяционно-генетическая дифференциация молочного скота по ISSR-PCR маркерам / Г.Ю. Косовский, В.И. Глазко, А.В. Архипов и др. // Доклады РАСХН. – 2014. – № 5. – С. 53-56.
10. Жигачёв, А.И. О накоплении груза мутаций в породах крупного рогатого скота при интенсивных технологиях воспроизводства и улучшения по целевым признакам / А.И. Жигачев, Л.К. Эрнст, Т.С. Богачёва // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – № 6. – С. 25-32.
11. Калашникова, Л.А. Геномная оценка молочного скота / Л.А. Калашникова // Молочное и мясное скотоводство. – 2010. – № 1. – С. 10-12.
12. Новикова, Л.Ф. SVM – комплексное уродство позвоночника крупного рогатого скота / Л.Ф. Новикова, Д.В. Карликов //Быково. – 2002. – 28 с.
13. Марзанова, С.Н. Разработка генодиагностики комплекса аномалий позвоночника [SVM] и иммунодефицита [BLAD] у животных черно-пестрого голштинизированного скота: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Марзанова Саида Нурбиевна. – М.: 2012. – 143 с.

14. Глазко, В.И. Молекулярно-генетические маркеры полиморфизма ДНК и их геномное позиционирование / В.И. Глазко, И.Л. Цветков, Л.Ф. Созинова, Т.Т. Глазко // Доклады РАСХН. – 2009. – № 3. – С.3-6.

15. Турбина, И.С. Генеалогия и некоторые биологические особенности у быков носителей и неносителей VLAD / И.С. Турбина, Е.В. Федорова, Н.М. Кертиева, Г.В. Ескин, Г.С. Турбина, Н.С. Марзанов // Труды ВНИИплем «Селекция, кормление, содержание сельскохозяйственных животных и технология производства продуктов животноводства». – Лесные Поляны. – 2004. – С. 3-7.

16. Вишневец, А.В. ДНК-диагностика наследственных заболеваний быков-производителей РУП «Витебское племпредприятие» по гену SVM / А.В. Вишневец, Р.В. Бекиш, Ж.В. Вишневец, В.К. Смунова // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак почета»: ГАВетМ. – 2013. – Т. 49. – Вып. 2. – Ч. 2. – С. 13-17.

17. Schutz, E. Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency DNA-based Testing on disease frequency in the Holstein population / E. Schutz, M. Scharfenstein, B. Brenig // J. Dairy Sci. – 2008. – Vol.91. – P. 4854-4859.

18. Жигачев, А.И. О накоплении груза мутаций в породах крупного рогатого скота при интенсивных технологиях воспроизводства и улучшениях по целевым признакам / А.И. Жигачев, Л.К. Эрнст, А.С. Богачев // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – № 6. – С. 25-32.

19. Яковлев, А. Определение носителей генетических дефектов среди быков-производителей / А. Яковлев, В. Терлецкий, О. Митрофанова, Н. Дементьева // Молочное и мясное скотоводство. – 2004. – № 7. – С. 31-32.

20. Трахимчик, Р.В. Наследственная устойчивость быков-производителей гродненского племпредприятия к VLAD-синдрому крупного рогатого скот/ Р.В. Трахимчик // Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 145-летию академии имени К.А. Тимирязева. Москва.: 2010. – Т.1. – С. 324-328.

21. Жигачев, А.И. Наследственные аномалии и их контроль у КРС / А.И. Жигачев, И.Л. Суллер // Практик – 2002. – № 3-4. – С. 46-53.

22. Rezaee, A.R. Study of complex vertebral malformation disorder in Iranian Holstein bulls / A.R. Rezaee, M.R. Nassiry, R. Valizadeh, M. Tahmoorepour, A. Javadmanesh, A. Zarei, H. Janati // World J. of Zoology – 2008. – Vol.3. – № 2. – P. 36-39.

23. Qin Chu. Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein / Qin Chu, Dongxiao Sun, Ying Yu, Yi Zhang and Yuan Zhang. // J. Vet. Diagn. Invest. – 2008. – Vol. 20. – P. 228-230.

24. Дементьева, Н.В. Встречаемость и значение мутации SVM у племенных животных Ленинградской области / Н.В. Дементьева, О.В. Митрованов, В.И. Тищенко, Е.В. Никитин // Молочное и мясное скотоводство. – 2014. – № 6. – С. 7-9.

25. Agerholm, J.S. Evaluation of the inheritance of the complex vertebral malformation syndrome by breeding studies / J.S. Agerholm, O. Anderson, M.B. Almskou, C. Bendixen, J. Arnbjerg, G.P. Aamand // *Acta Vet Scand.* – 2004. – Vol. 45. – P. 133-137.

26. Усенбеков, Е.С. Генетическая природа наследственных болезней крупного рогатого скота и молекулярно-генетические методы из диагностики / Е.С. Усенбеков, К.Ж. Жумалов, В.П. Терлецкий // *Вестник КазНУ, серия биологическая*, 2014. – № 12. – С. 375-378.

27. Benedixen, C. Mapping and identification of the CVM-gene in cattle / C. Benedixen, P. Horn, F. Panitz et al. // *29th International Conference on Animal Genetics*. Tokyo. Japan. – 2004. – P. 36.

28. Duncan, R.B. Complex vertebral malformation in a holstein calf: report of a case in the USA. / R.B. Duncan, C.B. Carrig, J.S. Agerholm, C. Bendixen // *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, 2001. – Vol. 13(4). – P. 333-336.

29. Norman, H.D. Herd and state means for somatic cell count from dairy herd improvement // H.D. Norman, R.H. Miller, R. Wright, G.R. Wiggans // *J. Dairy Sci.* – 2000. – Vol. 83. – P. 2782-2788.

30. Agerholm, J.S. Complex vertebral malformation in Holstein calves / J.S. Agerholm, C. Bendixen, J. Arnbjerg, O. Anderson // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2001. – Vol. 13. – P. 283-289.

31. Awgulewitsch, A. Spatial restriction in expression of a mouse homeo box locus within the central nervous system / A. Awgulewitsch, M.F. Utset, C.P. Hart, W. McGinnis, F.H. Ruddle // *Nature.* – 1986. – Vol. 320. – P. 328–335.

32. Jones, C.J. Perosomus elumbis (vertebral agenesis and arthrogryposis) in a stillborn Holstein calf / C.J. Jones // *Veterinary Pathology.* – 1999. – Vol. 36. – №1. – P. 64-70.

33. Thomsen, B. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N- acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation / B. Thomsen, P. Horn, F. Panitz, C. Bendixen, A. Petersen, L. Holm, V. Nielsen, J. Agerholm, J. Arnbjerg, C. Bendixen // *Genome Res.* – 2006. – Vol. 16. – P. 97-105.

34. Mahon, K.A. Expression of homeobox gene hox 1.1 during mouse embryogenesis / K.A. Mahon, H. Westphal, P. Gruss // *Development.* – 1988. – Vol. 104. (Suppl.). – P. 187-195.

35. Holland, P.W.H. Spatially restricted patterns of expression of the homeobox-containing gene Hox 2.1 during mouse embryogenesis / P.W.H. Holland, B.L.M. Hogan // *Development.* – 1988. – Vol. 102. – P. 159–174.

36. Tammen, I. Weiterentwicklung des DNA-Tests auf BLAD (Bovine Leukozyten Adhasions defizienz) fur den Einsatz in Rinderzucht und klinischer Diagnostik / I. Tammen // Hannover, 1994. – 128 s.

37. Марзанов, Н.С. Скрининг гена дефицита лейкоцитарной адгезии у черно-пестрого голштинизированного скота / Н.С. Марзанов, И.С. Турбина,

Г.В. Ескин, Г.С. Турбина, А.Н. Попов, В.М. Игнатъев, Б. Харлициус // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – № 6. – С. 23-30.

38. Vătăşescu-Balcan, R.A. Evidence of single point mutation inducing BLAD disease in Romanian Holstein-derived cattle breed / R.A. Vătăşescu-Balcan, M.A. Manea, S.E. Georgescu, A. Dinischiotu, C.D. Tesio, M. Costache // Biotechnology in Animal Husbandry. – 2007. – Vol. 23. – № 5-6. – P. 375-381.

39. Pfeiffer, I. Frequency of the canine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) mutation among Irish red setters in Germany / I. Pfeiffer, B. Brenning, J. Anim // Breed. Genet. – 2005. – Vol. 122. – P. 140-142.

40. Springer, T.A. Adhesion receptors of the immune system / T.A. Springer // Nature. – 1990. – Vol.346. – P.425-434.

41. Барсукова, О.Е. Рецессивные генетические дефекты в голштинской породе / О.Е. Барсукова // Бюллетень ГНУ ВНИИГРЖ. – 2012. – Вып. 151. – С. 15-17.

42. Shuster D.E. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency Holstein cattle / D.E. Shuster et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89. – P. 9225-9229.

43. Янчуков, И.Н. Роль геномной оценки в разведении молочного скота / И.Н. Янчуков, А.Н. Ермилов, С.Н. Харитонов, М. Глущенко // Молочное и мясное скотоводство. – 2013. – № 8. – С. 6-8.

44. Усенбеков, Е.С. Детекция точечной мутации у быков-производителей методом полимеразной цепной реакции / Е.С. Усенбеков. // Материалы международной научно-практической конференции. – Горки БГСХА. – 2013. – С. 17-22.

45. Кураж, О.П. Идентификация мутации DUMPS крупного рогатого скота / О.П. Кураж, Ж.А. Грибанова // Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – Вып. 4. – С. 47-51

46. Ghanem, M.E. Deficiency of uridine monophosphate synthase (DUMPS) and X-chromosome deletion in fetal mummification in cattle / M.E. Ghanem, T. Nakaо, M. Nishibori // Anim. Reprod. Sci. – 2006. – Vol. 91. – P. 45-54.

47. Meydan, H. Identification of BLAD and DUMPS as genetic disorders using PCR-RLFP in Holstein bulls reared in Turkey / H. Meydan, F. Ozdil, M. Yildiz // 57th annual meeting of the European Association for Animal Production, September 17-20, Antalya-Turkey. 2006. – P. 91.

48. Тюлькин, С.В. Идентификация генетических мутаций DUMPS и BC у быков-производителей / С.В. Тюлькин, Т.М. Ахметов, Р.Р. Вафин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Выпуск 216. – С. 329-333.

49. Shanks, R.D. Identification of the homozygous recessive genotype for the deficiency of uridine monophosphate synthase in 35-day bovine embryos / R.D. Shanks, R.G. Popp, G.C. Mc Coy, D.R. Nelson, J.L. Robinson // J. Reprod. Fertil. – 1992. – 94 (1):5-10. PMID: 1552492.

50. Windsor, P. Inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle / P. Windsor, J. Agerholm // *Aust. Vet. J.* – 2009. – V. 87 (5). – P. 193-199.
51. Schwenger, B. Detection of the homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro / B. Schwenger, I. Tammen, Aurich C. // *J Reprod Fertil.* 1994 100(2):511-514.
52. Зиновьева, Н.А. Роль ДНК-диагностики в контроле и элиминации рецессивных наследственных аномалий у сельскохозяйственного животного / Н.А. Зиновьева, Е.А. Гладырь, О.В. Костюнина и др. // *Достижения науки и техники АПК.* – 2012. – № 11. – С. 37-40.
53. Зиновьева, Н.А. Моногенные наследственные дефекты и их роль в воспроизводстве / Н.А. Зиновьева, Н.И. Стрекозов, Г.В. Ескин, И.С. Турбина, И.Н. Янчуков, А.Н. Ермилов // *Животноводство России.* – 2015. – № 6. – С. 30-31.
54. VanRaden, P.M. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. / P.M. VanRaden, K.V. Olson, D.J. Nisler and J.L. Hutchison // *J. Dairy Sci.* – 2011. – 94:6153-6161 (doi: 10.3168/jds.2011-4624).
55. Charlier, C. The role of mobile genetic elements in the bovine genome / C. Charlier // *Plant Anim. Genome XXIV Conf.*, abstr. W 636. – 2016.
56. Menzi, F. A transposable element insertion in APOB causes cholesterol deficiency in Holstein cattle / F. Menzi et al. // *Anim. Genet.* – 2016. – V. 47(2). – P. 253-257.
57. Adams, H.A. Identification of a Nonsense Mutation in APAF1 that is Causal for a Decrease in Reproductive Efficiency in Dairy Cattle / Adams, H.A. et al. // *Proc. Plant and Animal Genome XX Conf. San Diego, 2012*: P0555.
58. De Zio, D. Apa/1 in embryonic development – shaping life by death, and more / D. De Zio, E. Maiani, F. Cecconi // *Int. J. Dev. Biol.*, 2015, 59(1-3): 33-39 (doi: 10.1387/ijdb.150047dd).
59. McClure, M.C. Bovine exome sequence analysis and targeted SNP genotyping of recessive fertility defects BH1, HH2 and HH3 reveal causative mutation in *SMC2* for HH3 / M.C. McClure et al. // *PLoS ONE*, 2014, 9: e92769 (doi: 10.1371/journal.pone.0092769).
60. Pausch, H. Homozygous haplotype deficiency reveals deleterious mutations compromising reproductive and rearing success in cattle / H. Pausch // *BMC Genomics*, 2015, 16: 312 (doi: 10.1186/s12864-015-1483-7)
61. Fritz, S. Detection of haplotypes associated with prenatal death in dairy cattle and identification of deleterious mutations in GART, SHBG and SLC37A2 / S. Fritz, A. Capitan, A. Djari et al. // *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e65550 (doi: 10.1371/journal.pone.0065550).

62. Ng, A. Zebrafish mutations in gart and paics identify crucial roles for de novo purine synthesis in vertebrate pigmentation and ocular development / A. Ng, R.A. Uribe, L. Yieh, R. Nuckels, J.M. Gross // *Development*, 2009, 136(15): 2601-2611 (doi: 10.1242/dev.038315).

63. Cooper, T.A. Genomic evaluation of Ayrshire dairy cattle and new haplotypes affecting fertility and stillbirth in Holstein / T.A. Cooper, G.R. Wiggans, P.M. Van Raden, J.L. Hutchison, J.B. Cole, D.J. Null // *Brown Swiss and Ayrshire breeds. JAM*, 2013, T. 206.

64. Schutz, E. The Holstein Friesian lethal haplotype 5 (HH5) results from a complete deletion of TBF1M and cholesterol deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) insertion into the coding region of APOB / E. Schutz, C. Wehrhahn, M. Wanjek et al. // *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e0154602 (doi: 10.1371/journal.pone.0154602).

65. Зиновьева, Н.А. Гаплотипы фертильности голштинского скота / Н.А. Зиновьева // *Сельскохозяйственная биология*. – 2016. – Том 51. – № 4. – С. 423-435.