

ДНК-ТЕСТИРОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *SELPex8* В ПОПУЛЯЦИИ ГОЛШТИНСКОГО СКОТА

З.Ф. Фаттахова – к.б.н., с.н.с., **Н.Ю. Сафина** – к.б.н., с.н.с.,
Э.Р. Гайнутдинова – аспирант, н.с., **Ш.К. Шакиров** – д-р.с.-х.н., проф., г.н.с.
ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия, e-mail: fattahova.zf@mail.ru

Аннотация. *Учитывая генетическую ценность фертильности у молочных пород скота, изучение полиморфизма гена *SELPex8* является весьма актуальным. ДНК-тестированием коров-первотелок голштинской породы по гену *SELPex8* было установлено, что исследуемая татарстанская популяция крупного рогатого скота генетически биоразнообразна и находится в генетическом равновесии.*

Ключевые слова: *ген, аллель, полиморфизм, селектин, *SELPex8*, коровы-первотелки.*

Введение. За последние пять десятилетий по мере наращивания объёмов производства молока наблюдается резкое увеличение случаев нарушений репродуктивной функции и бесплодия дойных коров. Использование в программах разведения генетических параметров для повышения воспроизводительных качеств с целью предотвращения снижения фертильности может стать полезным инструментом в молочном скотоводстве [1].

Селектины – белки из семейства молекул клеточной адгезии, которые экспрессируются исключительно в клетках, присутствующих в сосудистой системе. Анализ данных научных исследований о роли селектинов показал, что в системе адгезионных молекул L-, P-, E-селектины, играют существенную роль в наступлении беременности и являются одними из ведущих звеньев эмбрионально-эндометриального взаимодействия, обеспечивая удерживание и имплантацию эмбриона в эндометрий [2]. Эти результаты послужили поиском ассоциаций полиморфизмов SNP в генах селектина, которые потенциально могут регулировать фертильность посредством изменений начальной адгезии между матерью и/или путем изменения последующего притока воспалительных клеток в плаценту, что может вызвать аборт [3].

В Великобритании изучили полиморфизм генов бычьих селектинов: P-селектина (*SELP*), L-селектина (*SELL*) и E-селектина (*SELE*) и сравнили частоту их SNP у пяти молочных пород (голштинская, фризская, джерсейская, айрширская и бурая швицкая). Исследование подтвердило, что у коров голштинской породы три SNP в гене *SELP Ex4-6-8* участвуют в прикреплении эндометрия, последующем развитии плаценты и связаны с признаками плодовитости, молочной продуктивности и продолжительностью хозяйственного использования [4].

Ген селектин-P (*SELP*) картирован на BTA16 (NC_037343.1). Однонуклеотидный полиморфизм в экзоне 8 (rs378218397) гена *SELP* вызван миссенс-мутацией *Val475Met*.

Целью наших исследований являлось выявление полиморфизма гена *SELP* в экзоне 8 у голштинского скота.

Материалы и методы исследований. В ходе работы были отобраны пробы крови у 258 коров-первотелок голштинской породы СХПК «Племенной завод им. Ленина» Атнинского района Республики Татарстан, из которых впоследствии была выделена ДНК с помощью набора «АплиПрайм» ДНК-сорб-В (Некст БИО, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Идентификацию полиморфизма гена *SELPex8* (G→A) проводили методом ПЦР-ПДРФ с применением праймеров (Евроген, Россия) со следующей однонуклеотидной последовательности:

F: 5' - GTG GAT GGT TTA GTT GCT AGG TT - 3'

R: 5' - TGG GAT TGC TGT GGG TTT - 3' [5].

Реакционную смесь конечным объемом 20 мкл, содержащую 2 мкл очищенной ДНК, 2 мкл смеси dNTPs, 2 мкл Taq буфера, 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы амплифицировали при помощи термоциклера «Thermal Cycler 100» (BIO RAD, США), с модифицированными температурно-временными режимами: денатурация в течение 5 мин. при температуре 95 °С, затем 25 циклов отжига 94 °С - 60 сек., 63,7 °С - 60 сек., 72 °С - 60 сек. и элонгация 72 °С - 5 мин.

Полиморфизм длин фрагментов определяли при помощи эндонуклеазы рестрикции *FAuND I* (СибЭнзим, Россия) при температуре 37 °С в течение 2 ч. Электрофоретическое разделение фрагментов проводили в горизонтальной камере в течение 30 мин в 2,6 % агарозном геле, содержащем бромид этидиума и 1*ТБЕ буфер.

Визуализацию и документирование осуществлялись с помощью оборудования «GelDoc Go» с программным обеспечением «Image Lab Touch» V. 3.0 (BIO RAD, США).

Для вычисления частоты встречаемости генотипов использовали формулу Шангина-Березовского Г.Н., а частоту отдельных аллелей определяли по формуле Меркурьевой Е.К. [5]. Генетическое равновесие в исследуемой популяции крупного рогатого скота тестировали согласно закону Харди-Вайнберга, вариабельность между наблюдаемым и ожидаемым распределением генотипов проверяли методом хи-квадрат (χ^2).

Результаты исследования и обсуждение. В результате ДНК-тестирования крови 258 коров-первотелок голштинской породы СХПК «Племенной завод им. Ленина» Атинского района Республики Татарстан установлено, что исследуемая популяция полиморфна и представлена 2-мя аллелями и 3-мя генотипами гена *SELPex8*.

В наблюдаемом распределении максимальное количество голов на уровне 69,0% (n=178) насчитано у гомозиготного генотипа GG (таблица 1). Гетерозиготные особи GA составляют 29,1% (n=75) от общего поголовья. Наименьшей численностью - 1,9% (n=5) обладает группа первотёлок с гомозиготным генотипом AA.

Таблица 1. Частота встречаемости генотипов и аллелей гена *SELPex8*

f	Генотипы						Аллели		χ^2
	n	%	n	%	n	%			
	GG		GA		AA		G	A	
<i>f_o</i>	178	69,0	75	29,1	5	1,9	0,835	0,165	0,82
<i>f_e</i>	180	69,8	71	27,5	7	2,7			

**f_o* – наблюдаемое распределение, *f_e* – ожидаемое распределение

В исследуемом поголовье частота встречаемости аллелей составила: G – 0,835 и A – 0,165, что свидетельствует о доминировании аллеля G. Значение хи-квадрат имеет уровень значимости ниже $\chi^2_{\text{крит}} (0,05) = 5,99$, что свидетельствует о генетическом балансе в популяции. В прогнозируемом распределении наблюдается незначительное смещение в сторону наращивания гомозиготности.

Аналогичные результаты по распределению полиморфных вариантов гена *SELPex8* получены в ранних исследованиях X. Chen с соавторами [4]. В изучаемом поголовье из 294 голов голштино-фризских молочных коров частота встречаемости составила: для генотипов GG, GA и AA – 67,7; 31,3 и 1,0 %, а для аллелей G и A – 0,833 и 0,167, соответственно.

Заключение. Результаты проведенного ДНК-тестирования коров-первотелок голштинской породы по гену *SELPex8* свидетельствуют о генетическом биоразнообразии опытной популяции и соблюдении генного равновесия.

Статья подготовлена в рамках государственного Эколого-генетические подходы к созданию и сохранению ресурсов растений и животных, расширению их адаптивного потенциала и биоразнообразия, разработка сберегающих агротехнологий с целью повышения устойчивости производства высококачественной продукции, достижения безопасности для здоровья человека и окружающей среды. Номер регистрации: 122011800138-7.

Библиографический список

1. Идентификация полиморфизма гена ARAF1 у голштинского скота / Н. Ю. Сафина [и др.] // Международный вестник ветеринарии. 2022. № 2. С. 134-139. DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.2.134
2. Бурлев В. А. Роль растворимых и клеточных селектинов в наступлении беременности при лиганд-рецепторных взаимодействиях эмбриона и эндометрия // Проблемы репродукции. 2014. Т. 20. № 5. С. 66-72.
3. Bovine P-selectin mediates leukocyte adhesion and is highly polymorphic in dairy breeds / X. Chen [et al.] // Research in Veterinary Science. 2016. V 108. P. 85-92. DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.08.004
4. Polymorphisms in the selectin gene cluster are associated with fertility and survival time in a population of Holstein Friesian cows / X. Chen [et al.] // PLoS One. 2017. V 12. N 4. P. 1–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0175555
5. Меркурьева Е. К., Шангин-Березовский Г. Н. Генетика с основами биометрии. М.: Колос, 1983. 400 с.