

МЕТОД ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Н. А. Кирсанова¹, А. В. Сухоедова², М. А. Плескачева³, И. В. Солтынская⁴, И. А. Тимофеева⁵, О. В. Прасолова⁶, Е. В. Крылова⁷

¹ Научный сотрудник, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: n.kirsanova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-1666-3058

² Младший научный сотрудник, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: a.suhoedova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-7552-4816

³ Лаборант-исследователь, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: pleskacheva@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6721-2812

⁴ И.о. заведующего отделом, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: i.soltynskaya@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6274-5265

⁵ Научный сотрудник, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: i.timofeeva@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6996-1817

⁶ Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: o.prasolova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0001-8924-2273

⁷ Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: e.krylova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0003-0080-0158

РЕЗЮМЕ

В настоящее время зарегистрировано большое количество различных групп заболеваний сельскохозяйственных животных, в которых наследственность играет значимую роль. Например, у крупного рогатого скота выявлено свыше 500 генетически обусловленных морфологических и функциональных нарушений, причем для 150 известны конкретные мутации. Реализация генетического материала крупного рогатого скота сопровождается распространением различных заболеваний, обусловленных мутациями, возникающими у выдающихся представителей пород. В результате насыщения популяций летальными мутациями возникла необходимость более широкого использования молекулярно-генетических методов для выявления моногенных наследственных заболеваний. Для решения данной задачи перспективно применение технологий пиросеквенирования ДНК, наиболее удобной для экспресс-диагностики однонуклеотидных мутаций в геноме крупного рогатого скота, расположенных в областях с известной нуклеотидной последовательностью. С использованием пиросеквенирования в ФГБУ «ВГНКИ» были разработаны, валидированы и утверждены методики идентификации наиболее распространенных значимых мутаций крупного рогатого скота голштинской,

симментальской, бурой швицкой и абердин-ангусской пород, ассоциированных с дефицитом адгезии лейкоцитов, комплексным пороком позвоночника, дефицитом уридин-монофосфат синтетазы, цитруллинемией, спинальной мышечной атрофией, спинальной демиелинизацией, гаплотипом 2 бурой швицкой породы, синдромом Вивера, с дупликацией развития, α-маннозидозом, карликовостью, субфертильностью быков, тромбоцитопатией, синдромом арахномелии, дефицит-цинк-подобным синдромом. Данные методики предназначены для исследования спермопродукции в племенных центрах страны, научных лабораториях, работающих в области биотехнологии и репродукции животных, центрах воспроизводства продуктивных животных. Внедрение предложенных генетических тестов для исследования на наличие мутантных аллелей и ограничение использования носителей мутаций в племенной работе позволит минимизировать распространение наследственных заболеваний и тем самым улучшить отечественный генофонд крупного рогатого скота.

Ключевые слова: пиросеквенирование, наследственные заболевания, генетические аномалии, полиморфизм, крупный рогатый скот.

PYROSEQUENCING: ITS POTENTIAL AND LIMITATIONS IN DIAGNOSIS OF INHERITED DISEASES IN CATTLE

N. A. Kirsanova¹, A. V. Sukhoedova², M. A. Pleskacheva³, I. V. Soltynskaya⁴, I. A. Timofeeva⁵, O. V. Prasolova⁶, E. V. Krylova⁷

¹ Researcher, FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: n.kirsanova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-1666-3058

² Junior Researcher, FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: a.suhoedova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-7552-4816

³ Laboratory Research Assistant, FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: pleskacheva@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6721-2812

⁴ Interim Head of Department, FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: i.soltynskaya@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6274-5265

⁵ Researcher, FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: i.timofeeva@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0002-6996-1817

⁶ Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: o.prasolova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0001-8924-2273

⁷ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBU "VGNKI", Moscow, Russian Federation, e-mail: e.krylova@vgnki.ru; ORCID ID 0000-0003-0080-0158

SUMMARY

A large number of different groups of livestock diseases in which heredity plays a significant role are currently reported. In particular, more than 500 genetically determined morphological and functional disorders have been detected in cattle; for 150 of them, specific mutations are known. The sale of bovine genetic materials is associated with the spread of various diseases caused by mutations that occur in the prominent representatives of breeds. The abundance of lethal mutations in the populations requires a broader application of molecular diagnostic methods for detection of monogenic hereditary diseases. DNA pyrosequencing, being the most convenient technique for the rapid diagnosis of single nucleotide mutations in the bovine genome that are located in the regions with known nucleotide sequence, has a potential for meeting this need. Pyrosequencing-based methods for identification of the most common significant mutations in Holstein, Simmental, Brown Swiss and Aberdeen Angus cattle were developed, validated and

approved at the FGBU "VGNKI". Such mutations are associated with leukocyte adhesion deficiency, complex vertebral malformation, uridine monophosphate synthetase deficiency, citrullinemia, spinal muscular atrophy, spinal cord demyelination, Brown Swiss haplotype 2, Weaver syndrome, developmental duplications, α-mannosidosis, dwarfism, bovine male subfertility, thrombocytopathy, arachnomelia syndrome, hypozincemia-like syndrome. These methods are intended to test semen in the breeding centres, scientific laboratories working in the field of biotechnology and animal reproduction, livestock reproduction centres. The use of the proposed genetic tests to detect mutant alleles, as well as reduced use of mutation-bearing animals in stock breeding will allow minimizing the occurrence of inherited diseases and thus improving the gene pool of cattle in the country.

Key words: pyrosequencing, inherited diseases, genetic abnormalities, polymorphism, cattle.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время интенсивное использование мирового генофонда и биотехнологий репродукции (искусственное осеменение, трансплантация эмбрионов) позволили значительно повысить генетический потенциал продуктивности животных за счет получения потомства производителей – лидеров породы. Однако при таком интенсивном потоке селекции по желаемым продуктивным признакам в породах крупного рогатого скота (КРС) стали накапливаться мутации, связанные с разнообразными патологиями [3, 6]. При этом снижаются воспроизводительная способность и плодовитость, жизнеспособность новорожденных и молодняка, продолжительность хозяйственного использования животных, что влечет за собой значительный экономический ущерб. Поэтому актуальной является разработка методик для своевременного выявления скрытых мутаций у животных-производителей и выбраковки спермодоз по наличию генетических аномалий. Выявление животных – носителей мутаций, ассоциированных с различными заболеваниями, возможно только с помощью молекулярно-генетических методов.

Моногенные наследственные заболевания, как правило, фенотипически могут быть выявлены только у рецессивных гомозиготных носителей на позднем постэмбриональном развитии или в раннем постнатальном периоде. Такие носители часто нежизнеспособны. У гетерозиготных носителей мутации фенотипически не проявляются. ДНК-тестирование ремонтного молодняка в раннем возрасте позволит выявить скрытых носителей и не допустить распространения наследственных заболеваний в популяциях КРС. Нежелательные аллели в популяции можно будет исключить за одно поколение и значительно ускорить процесс селекции.

У КРС выявлено свыше 500 генетически обусловленных морфологических и функциональных нарушений, причем для 150 известны конкретные мутации [9, 11]. Среди шести широко распространенных пород наибольшее число таких отклонений зафиксировано в голштинской породе, далее следуют фризская, чернопестрая, симментальская, швицкая и айрширская породы (соответственно 45, 32, 26, 24, 20 и 19 аномалий). Генетическая природа большей части наследственных заболеваний КРС связана с точечными мутациями, как правило, это однонуклеотидные замены (SNP) в определенных участках генов. Для выявления однонуклеотидных полиморфизмов генома используется широкий спектр молекулярно-биологических методов с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1]. К наиболее распространенным методам можно отнести анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, аллель-специфическую ПЦР, различные варианты ПЦР в режиме реального времени, гибридизацию с использованием ДНК-чипов, масс-спектрометрический анализ и методы секвенирования ДНК. Однако только секвенирование, являясь прямым методом определения нуклеотидной последовательности, позволяет однозначно интерпретировать полученный результат – нуклеотидную последовательность области полиморфизма и нуклеотидный полиморфизм в гомо- или гетерозиготном состоянии.

Выбор метода детекции генетического полиморфизма зависит как от задач, поставленных перед лабораторией, в т. ч. от планируемого количества исследований, так и от нуклеотидной последовательности анализируемой области генома. Поскольку для определения

однонуклеотидных полиморфизмов достаточно провести секвенирование небольшого фрагмента ДНК, использование секвенирования методом Сэнгера или высокопроизводительных систем генетического анализа не всегда целесообразно.

Для задач массового скрининга на наличие известных полиморфизмов, обуславливающих различные моногенные наследственные заболевания КРС, наиболее удобен метод пиросеквенирования. С его помощью возможно определение нуклеотидных последовательностей коротких фрагментов в области генетических полиморфизмов и выявление известных точечных мутаций (однонуклеотидные замены, делеции/вставки одного-трех нуклеотидов) путем сравнения с референсной последовательностью ДНК. С использованием технологии пиросеквенирования в ФГБУ «ВГНКИ» были разработаны методики идентификации наиболее распространенных значимых мутаций КРС голштинской, бурой швицкой, абердин-ангусской и симментальской пород.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования был использован биологический материал (замороженная сперма, венозная кровь) от быков голштинской, бурой швицкой, абердин-ангусской и симментальской пород как отечественной, так и зарубежной селекции.

Выделение ДНК из венозной крови осуществляли сорбционным методом с использованием набора «ДНК-сорб-С-М» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Выделение ДНК из замороженной спермы осуществляли с использованием набора «ДНК-сорб-С-М» с модификациями ФГБУ «ВГНКИ».

Дизайн праймеров для ПЦР и секвенирования проводили с использованием программного обеспечения PyroMark Assay Design Software. Для проведения ПЦР был использован ДНК-амплификатор «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Пиросеквенирование проводили на системе генетического анализа PyroMark Q96 MD (Qiagen, Германия) с использованием набора реагентов PyroMark Gold Q96 Reagents (50×96) производства Qiagen.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием технологии пиросеквенирования были разработаны методики выявления мутаций, ассоциированных с наиболее распространенными моногенными наследственными заболеваниями КРС (табл. 1).

На первом этапе работы был проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов-мишеней, представленных в базах данных OMIA, NCBI [10, 11] и литературных источниках [4, 7, 8]. Выбраны участки генома, ассоциированные с конкретными наследственными заболеваниями. С помощью программного обеспечения PyroMark Assay Design Software выбраны олигонуклеотидные праймеры, позволяющие амплифицировать соответствующие фрагменты генов в области мутации, а также праймеры для секвенирования.

В зависимости от нуклеотидной последовательности исследуемого фрагмента возможно проведение секвенирования в двух направлениях: прямой анализ (forward analysis) и обратный анализ (reverse analysis). В первом случае обратный праймер для амплификации должен быть связан на 5'-конце с биотином, во

Таблица 1

Характеристики мутаций, выявляемых с использованием технологии пиросеквенирования ДНК

Порода	Аббревиатура	Заболевание	Полиморфизм	Ген	Локализация
голландская	CVM	комплексный порок позвоночника	538G>T	SLC35A3	хромосома 3
	BLAD	дефицит адгезии лейкоцитов	383A>G	ITGB2	хромосома 1
	DUMPS	дефицит уридин-монофосфат синтетазы	1213C>T	UMPS	хромосома 1
	CIT	цитруллинемия	256C>T	ASS	хромосома 11
бурая швицкая	SMA	спинальная мышечная атрофия	562G>A	KDSR	хромосома 24
	SDM	спинальная демиелинизация	560G>A	SPAST	хромосома 11
	W	синдром Вивера	1703G>A	PNPLA8	хромосома 4
	BH2	гаплотип 2 бурой швицкой	757T>C	TUBD1	хромосома 19
абердин-ангусская	DD	дупликация развития	932T>C	NHLRC2	хромосома 26
	MA	α -маннозидоз	961T>C	MAN2B1	хромосома 7
	DW	карликовость	2032C>T	PRKG2	хромосома 6
симментальская	BMS	субфертильность быков	483C>A	TMEM95	хромосома 19
	TP	тромбоцитопатия	701A>G	RASGRP2	хромосома 29
	ZDL	дефицит-цинк-подобный синдром	702G>A	PLD4	хромосома 21
	AS	синдром арахноидии	1224_1225delCA (делеция)	MOCS1	хромосома 23

втором – с биотином должен быть связан прямой праймер (табл. 2).

Подготовка ПЦР-продукта к пиросеквенированию включает инкубацию ампликона с частицами сефарозы, покрытыми стрептавидином, щелочную денатурацию для получения одноцепочечной ДНК, серию последовательных отмывок с помощью вакуумно-фильтрационной системы, а также отжиг секвенирующего праймера в области анализируемого генетического локуса.

Секвенирование ПЦР-продукта проводят с использованием системы генетического анализа PyroMark Q96 MD. Реакция пиросеквенирования протекает в присутствии набора ферментов (ДНК-полимераза, люцифераза, АТФ-сульфуридаза, апираза), субстратов (люциферин, аденозин-5-фосфосульфат) и дезоксинуклеотидов.

При последовательном добавлении в реакционную смесь дезоксинуклеотида, в случае его комплементарности матрице, ДНК-полимераза катализирует включение нуклеотида в растущую цепь ДНК, что сопровождается высвобождением пирофосфата в количестве, эквивалентном количеству встроившихся нуклеотидов. АТФ-сульфуридаза в присутствии аденозин-5-фосфосульфата превращает пирофосфат в АТФ. Полученная АТФ запускает реакцию окисления люциферина в оксильюциферин, в результате чего происходит образование видимого света в количестве, пропорциональном количеству АТФ. Хемилюминесцентный сигнал детектируется и отображается в виде пиков на пинограмме. Высота каждого пика пропорциональна количеству нуклеотидов, включенных в матрицу. Добавление нуклеотидов в реакционную смесь осуществ-

Таблица 2

Способы проведения амплификации фрагментов, содержащих полиморфный генетический локус

Заболевание	Размер ампликона, п. н.	Тип анализа	Биотинилированный праймер
CVM	90	reverse analysis	прямой
BLAD	122	forward analysis	обратный
DUMPS	115	reverse analysis	прямой
CIT	146	forward analysis	обратный
SMA	140	forward analysis	обратный
SDM	97	reverse analysis	прямой
W	96	reverse analysis	прямой
BH2	86	forward analysis	обратный
DD	84	forward analysis	обратный
MA	103	forward analysis	обратный
DW	210	forward analysis	обратный
BMS	136	forward analysis	обратный
TP	170	reverse analysis	прямой
ZDL	183	reverse analysis	прямой
AS	105	reverse analysis	прямой

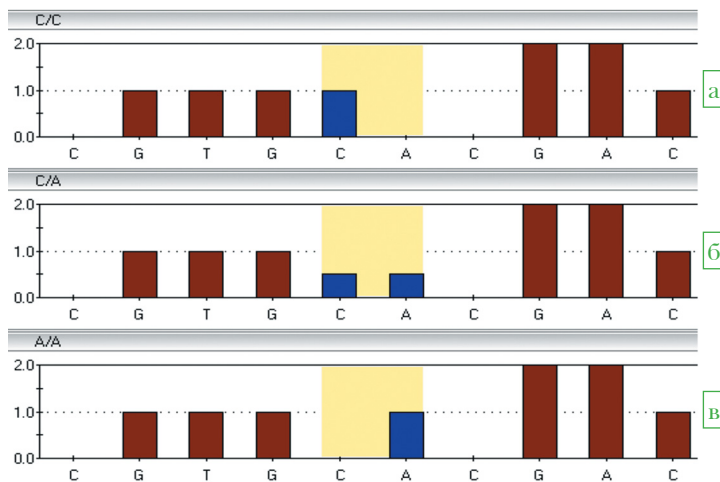


Рис. 1. Референсные пирограммы для идентификации мутации BMS (прямой анализ)

а – нормальный генотип;

б – гетерозигота (носитель);

в – гомозигота по мутантному аллелю.

вляется последовательно в соответствии с заданной нуклеотидной последовательностью [5]. На заключительной стадии пиросеквенирования проводится анализ полученных данных.

Поскольку объектом исследования являются охарактеризованные полиморфные локусы в геноме КРС и положение однонуклеотидной мутации известно, существует возможность для автоматической обработки результата программным обеспечением генетического анализатора PyroMark Q96 MD. На рисунке 1 представлены референсные пирограммы для каждого из вариантов анализируемого полиморфизма в гене TMEM95. Мутация в этом гене ассоциирована с субфертильностью быков симментальской породы (BMS).

Пример интерпретации результатов пиросеквенирования представлен на рисунке 2. Анализ области полиморфизма осуществляется автоматически программным обеспечением на основании относительных высот сигналов в полиморфной области (по отношению к сигналам, соответствующим референсным нуклеотидам). Достоверность прочтения пиков определяется программой SNP-RUN.

Для анализа аллельного состояния полиморфизмов используют только пирограммы надлежащего качества.

В данной работе были установлены следующие критерии оценки качества пирограмм:

1) анализируемая последовательность должна содержать установленное количество невариабельных референсных нуклеотидов. Анализируемая последовательность – это короткий фрагмент последовательности ДНК, содержащий один или несколько полиморфизмов, которые необходимо проанализировать. Референсные пики используются во время анализа для оценки высоты пиков в области полиморфизма и как внутренний контроль при оценке качества. Например, на рисунке 2 референсными являются нуклеотиды в позициях 2–4, 8–10;

2) отсутствие фонового сигнала в пустых позициях на пирограмме, автоматически созданных программой. Пустые позиции служат показателями неспецифического нуклеотидного встраивания. На рисунке 2 нуклеотиды в позициях 1 и 7 отсутствуют в целевой нуклеотидной последовательности, не встраиваются в синтезируемую цепь, соответственно уровень сигнала равен нулю;

3) отсутствие фонового сигнала в переменных позициях (область мутации, на рисунке 2 выделена цветом);

4) достаточная интенсивность сигнала целевых и референсных пиков, высота единичного пика должна составлять не менее 30 относительных световых единиц RLU (величина, используемая в пиросеквенировании для определения высоты пиков на пирограмме). На рисунке 2а указана высота пика в 281 RLU.

На основании относительной высоты целевых пиков в переменной позиции на пирограмме определяется генотип по исследуемому генетическому локусу и выдается заключение о генотипе животного. Варианты определяемого генотипа: гомозигота по частому аллелю (нормальный генотип), гетерозигота, гомозигота по редкому аллелю (мутантный генотип).

Например, при идентификации мутации BMS результат интерпретируется следующим образом (рис. 1):

– C/C – нормальный генотип (гомозигота по нормальному аллелю, мутация не выявлена);

– C/A – животное является носителем мутации в гене TMEM95, ассоциированной с субфертильностью быков (BMS) (гетерозигота, присутствуют одна мутантная и одна нормальная копии генов);

– A/A – мутантный генотип (гомозигота по мутантному аллелю).

С помощью разработанных методик на основе метода пиросеквенирования для мониторинга частоты

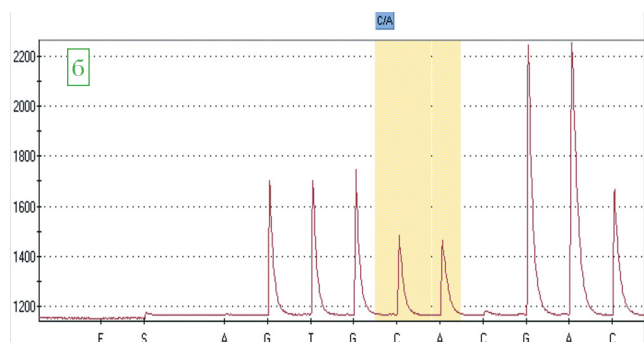
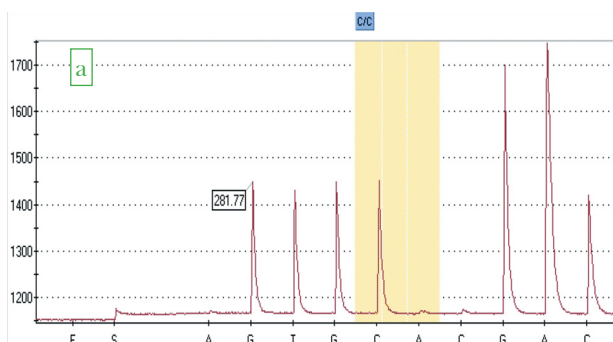


Рис. 2. Пирограммы, полученные при исследовании идентификации мутации BMS (прямой анализ)

а – нормальный генотип;

б – гетерозигота (носитель мутации)

встречаемости однонуклеотидных полиморфизмов выявили среди быков: голштинской породы – 2% носителей мутаций, ассоциированных с комплексным пороком позвоночника, и 0,5% носителей дефицита адгезии лейкоцитов; симментальской породы – 2% носителей синдрома арахноидии, 5% носителей субфертильности быков и 7% – тромбоцитопатии; абердин-ангусской породы – 7,5% носителей дупликации развития; бурой швицкой породы – 5% носителей спинальной мышечной атрофии.

Таким образом, метод пиросеквенирования обладает рядом преимуществ. Он эффективен для быстрого определения большого числа коротких последовательностей ДНК, выявления единичных мутаций нуклеотидов, ресеквенирования и т. д. Система генетического анализа PyroMark Q96 MD позволяет определить короткую последовательность ДНК до 96 образцов за небольшой промежуток времени. Простые химические реакции и надежная система детекции исключают необходимость использования в данном методе гелей, электрофореза и специфических флуоресцентных меток, что значительно упрощает пробоподготовку. При этом значительно снижается время и стоимость исследования в сравнении с капиллярным электрофорезом [2].

Кроме того, анализ полученных при пиросеквенировании данных прост и понятен. Он заключается в сравнении полученного на выходе графика с предложенной программным обеспечением референсной пирогаммой.

Перечисленные особенности делают метод пиросеквенирования наиболее удобным для экспресс-диагностики однонуклеотидных мутаций в геноме КРС, расположенных в областях с известной нуклеотидной последовательностью.

Однако следует отметить и недостатки метода. В связи с тем, что длина фрагментов ДНК для пиросеквенирования должна быть не более 200 п. н., данный метод не подходит для диагностики мутаций, обусловленных протяженными делециями или вставками. Поэтому для выявления носителей брахиспинального синдрома, остеопетроза и множественного артрогрипоза среди КРС голштинской и абердин-ангусской пород нами были разработаны методики на основе метода ПЦР с электрофоретической детекцией. Указанные заболевания обусловлены протяженными делециями (более 2000 п. н.).

Пиросеквенирование не позволяет точно определить в последовательности ДНК число одинаковых нуклеотидов при их количестве более 6 подряд. Так, например, мутация, ассоциированная с арахноидией и артрогрипозом у КРС бурой швицкой породы (SAA), представляет собой инсерцию одного нуклеотида гуанина (с.363–364insG) в определенном положении гена SOUX после последовательности из 7 нуклеотидов гуанина [GGGGGGG]. Поэтому для определения такого однонуклеотидного полиморфизма необходимо провести секвенирование фрагмента ДНК в области мутации методом Сэнгера.

Следует отметить, что использование пиросеквенирования для определения точечных мутаций зависит от состава нуклеотидной последовательности в области полиморфизма. Возникают ситуации, когда определить генотип по исследуемому генетическому локусу (нормальный генотип или носитель) не пред-

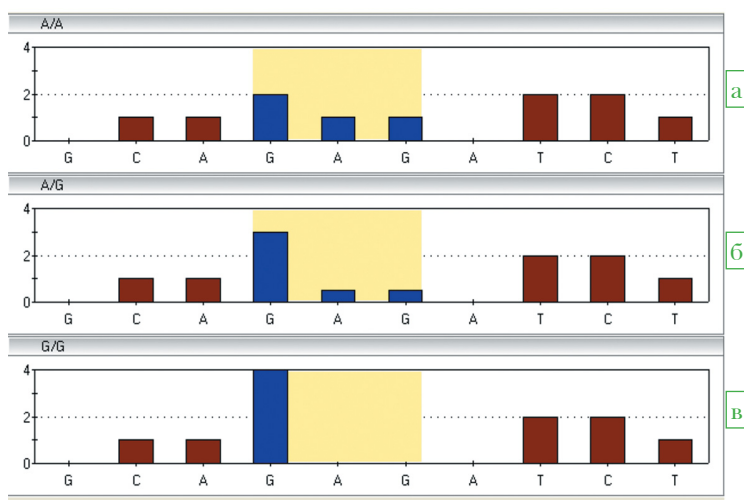


Рис. 3. Референсные пирогаммы для идентификации мутации TP (прямой анализ)

а – нормальный генотип;

б – гетерозигота (носитель);

в – гомозигота по мутантному аллелю.



Рис. 4. Референсные пирогаммы для идентификации мутации TP (обратный анализ)

а – нормальный генотип;

б – гетерозигота (носитель);

в – гомозигота по мутантному аллелю.

ставляется возможным. Так, например, на рисунке 3 представлены референсные пирогаммы для идентификации тромбоцитопатии (TP) у КРС симментальской породы. Заболевание развивается при замене аденина на гуанин в 701-м положении гена RASGRP2 в 29-й хромосоме. При использовании прямого анализа корректно определить варианты полиморфизма (рис. 3а и 3б) на основании относительной высоты целевых пиков в переменной позиции весьма проблематично.

В данном случае для упрощения интерпретации результатов было изменено направление секвенирования. При использовании обратного анализа установить варианты полиморфизма не вызывает затруднений (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема контроля генетических дефектов у крупного рогатого скота в условиях глобализации и коммерциализации племенного дела стала важной частью отечественной профилактической ветеринарии и корректирующей селекции. Дальнейшее повышение генетического потенциала животных в стране может быть обеспечено, например, введением обязательных проверок быков-производителей на соответствующие породе моногенные наследственные заболевания и записью в племенные каталоги носителей данной мутации.

Метод пиросеквенирования дает возможность проводить массовый скрининг на наличие известных полиморфизмов, приводящих к различным моногенным наследственным заболеваниям у КРС. Он позволяет определять нуклеотидные последовательности коротких фрагментов в области генетических полиморфизмов и выявлять известные точечные мутации. Внедрение предложенных ФГБУ «ВГНКИ» генетических тестов с использованием технологии пиросеквенирования для идентификации мутаций КРС голштинской, бурой швицкой, абердин-ангусской и симментальской пород, ассоциированных с наиболее распространенными наследственными заболеваниями, увеличение числа диагностических центров для такого рода деятельности, информирование фермеров о проблеме и возможности ее решения позволит минимизировать распространение наследственных заболеваний и тем самым улучшить отечественный генофонд крупного рогатого скота.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Введение в молекулярную диагностику: учебно-методическое пособие: в 2 т. Т. 2: Молекулярно-генетические методы в диагностике наследственных и онкологических заболеваний / под. ред. М. А. Пальцева, Д. В. Залетаева. – М.: Медицина, 2011. – 503 с.
2. Генетические полиморфизмы и риск развития некоторых мультифакторных заболеваний / Е. С. Потехина, К. О. Миронов, О. П. Дрибноходова [и др.] // Справочник заведующего КДЛ. – 2014. – № 10. – С. 37–47.
3. Жигачев А. И., Эрнст Л. К., Кудрявцев В. А. Генетические болезни у черно-пестрого, голштинского и айширского скота и их профилактика // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2008. – № 1. – С. 46–56.
4. Моногенные наследственные дефекты и их роль в воспроизводстве / Н. Зиновьева, Н. Стрекозов, Г. Ескин [и др.] // Животноводство России. – 2015. – № 6. – С. 30–31.
5. Опыт использования систем генетического анализа на основе технологии пиросеквенирования / К. О. Миронов, Е. А. Дунаева, О. П. Дрибноходова, Г. А. Шипулин // Справочник заведующего КДЛ. – 2016. – № 5. – С. 33–43.
6. Основные генетические причины эмбриональных потерь в молочном скотоводстве, связанные с интенсивной селекцией по продук-

тивности / С. В. Гуськова, И. С. Турбина, Г. В. Ескин, Н. А. Комбарова // Молочное и мясное скотоводство. – 2014. – № 3. – С. 10–14.

7. Cole J. B., Null D. J., VanRaden P. M. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility // *J. Dairy Sci.* – 2016. – Vol. 99 (9). – P. 7274–7288; DOI: 10.3168/jds.2015-10777.

8. Genetic disorders in beef cattle: a review / A. Cieplach, K. Rutkowska, J. Oprządek, E. Polawska // *Genes Genom.* – 2017. – Vol. 39 (5). – P. 461–471; DOI: 10.1007/s13258-017-0525-8.

9. Mendelian Inheritance in Cattle 2000 / ed. P. Millar, J. J. Lauvergne, C. Dolling Wasenigen: EAAP publication, 2000. – No. 101. – 590 p.

10. National Center for Biotechnology Information (NCBI). URL: www.ncbi.nlm.nih.gov (дата обращения: 13.09.19).

11. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). URL: www.omia.org/home (дата обращения: 13.09.19).

REFERENCES

1. Introduction to molecular diagnostics: a study guide: in 2 volumes. Vol. 2: Molecular genetics methods in the diagnosis of inherited and oncology diseases [Vvedenie v molekulyarnuyu diagnostiku: uchebno-metodicheskoe posobie: v 2 t. T. 2: Molekulyarno-geneticheskie metody v diagnostike nasledstvennyh i onkologicheskikh zabolevanij]. Ed. by M. A. Paltsev, D. V. Zaletaev. M.: Meditsina, 2011 (in Russian).
2. Genetic polymorphisms and risk of developing certain multifactor diseases [Geneticheskie polimorfizmy i risk razvitiya nekotorykh mul'tifaktornykh zabolevanij]. E. S. Potekhina, K. O. Mironov, O. P. Dribnokhodova [et al.]. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2014; 10: 37–47 (in Russian).
3. Zhigachev A. I., Ernst L. K., Kudryavtsev V. A. Genetic diseases in Black-and-White, Holstein and Ayrshire cattle and prevention thereof [Geneticheskie bolezni u cherno-pestrogo, golshtinskogo i ajshirskogo skota i ih profilaktika]. *Issues of Legal Regulation in Veterinary Medicine*. 2008; 1: 46–56 (in Russian).
4. Monogenic hereditary defects and their role in reproduction [Monogennyye nasledstvennyye defekty i ih rol' v vosproizvodstve]. N. Zinovyeva, N. Strekozov, G. Eskin [et al.]. *Zhivotnovodstvo Rossii*. 2015; 6: 30–31 (in Russian).
5. Experience of using pyrosequencing-based genetic analysis systems [Opyt ispol'zovaniya sistem geneticheskogo analiza na osnove tekhnologii pirosekvenirovaniya]. K. O. Mironov, E. A. Dunaeva, O. P. Dribnokhodova, G. A. Shipulin. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2016; 5: 33–43 (in Russian).
6. Main genetic causes of embryonic loss in dairy cattle husbandry associated with intensive selection based on performance [Osnovnye geneticheskie prichiny embrional'nykh poter' v molochnom skotovodstve, svyazannyye s intensivnoy selekciej po produktivnosti]. S. V. Guskova, I. S. Turbina, G. V. Eskin, N. A. Kombarova. *Dairy and Beef Cattle Farming*. 2014; 3: 10–14 (in Russian).
7. Cole J. B., Null D. J., VanRaden P. M. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility. *J. Dairy Sci.* 2016; 99 (9): 7274–7288; DOI: 10.3168/jds.2015-10777.
8. Genetic disorders in beef cattle: a review. A. Cieplach, K. Rutkowska, J. Oprządek, E. Polawska. *Genes Genom.* 2017; 39 (5): 461–471; DOI: 10.1007/s13258-017-0525-8.
9. Mendelian Inheritance in Cattle 2000. ed. P. Millar, J. J. Lauvergne, C. Dolling Wasenigen: EAAP publication, 2000: 101.
10. National Center for Biotechnology Information (NCBI). URL: www.ncbi.nlm.nih.gov (date of access: 13.09.19).
11. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). URL: www.omia.org/home (date of access: 13.09.19).

Поступила 26.09.19

Принята в печать 25.12.19