

ния. 2015.-с. 2(часть 2).-с. 267-271.
8.Завалишина С.Ю. Активность компонентов системы гемостаза у крупного рогатого скота. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. Дубровицы.-2017.-54с.

9.Ошуркова Ю.Л., Медведев И.Н. Физиологические особенности тромбоцитарно-коагуляционного гемостаза у сухостойных коров айширской породы /научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке»,-2017.-т. 19,с.20-23

УДК 636.082.2:636.034

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.2.134

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА АРАF1 У ГОЛШТИНСКОГО СКОТА

Сафина Н.Ю. – к.б.н., с.н.с., Фаттахова З.Ф. – к.б.н., с.н.с., Гайнутдинова Э.Р. – н.с., Ш.К. Шакиров – д.с.-х.н., проф., г.н.с.; Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства ФИЦ КазНЦ РАН

Ключевые слова: ген, полиморфизм, ПЦР-ПДРФ, АРАF1, HH1, Фактор 1, активирующий апоптотические протеазы, гаплотип фертильности, эмбриональная смерть, крупный рогатый скот **Keywords:** gene, polymorphism, PCR-RLFP, АРАF1, HH1, apoptosis peptide activating factor 1, reproduction function, embryonic death, cattle



РЕФЕРАТ

В статье представлены данные ДНК-тестирования крупного рогатого скота голштинской породы по гену АРАF1. Изучена структура татарстанской популяции в сравнении с мировым опытом. Цель исследования – изучить аллельный полиморфизм гена фактора 1, активирующего апоптотические протеазы (АРАF1; g.C6315040T; p.Gln579Q→X), – причины гаплотипа фертильности (HH1), в отечественной популяции голштинского скота Республики Татарстан. Методы. Генетическое типирование проводилось методом ПЦР-ПДРФ с последующим электрофоретическим разделением в агарозном геле в присутствии бромида этидия. Впервые в Республике Татарстан в условиях СХПК «ПЗ им. Ленина» проведена идентификация крупного рогатого скота по локусу гена АРАF1 - BstC8 I, оценено генетическое равновесие и структура популяции. В результате генодиагностики были идентифицированы два аллеля и три генотипа. Частота встречаемости аллелей Q и X составила 0,988 и 0,012; генотипов QQ и QX – 97,5 и 2,5 % соответственно. Поскольку гомозиготные ХХ-эмбрионы не выживают, они никогда не встречаются среди рожденных животных. Тестированием методом хи-квadrat показало, что исследуемая популяция находится в генетическом равновесии согласно закону Харди-Вайнберга. Наши исследования подтверждают незначительную долю присутствия животных-носителей летального аллеля в популяции голштинского скота отечественной селекции Республики Татарстан. Для сдерживания распространения мутантного аллеля Х гена фактора 1 активирующего апоптотические протеазы, при отборе и подборе пар для селекционно-племенной работы, рекомендуется проводить ДНК-тестирование полиморфизма гена АРАF1.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы существует мировая тенденция к увеличению генетических мутаций, приводящих к образованию летальных и полuletальных аллелей у голштинской крупного рогатого скота. Острыми патологиями для животных являются такие аномалии, как потеря эмбрионов или гибель плода, мертворождение, уродство или иммуносупрессия телят, дефицит адгезии лейкоцитов и дефицит уридинмонофосфатсинтазы, цитруллинэмия, брахиспина, сложные пороки развития позвоночника, гаплотип дефицита холестерина, и несколько гаплотипов голштинской породы. Все эти мутации являются рецессивными и проявляются как нарушения фенотипа только в том случае, если присутствуют оба аллеля, поэтому проблема распознается только тогда, когда частота гена высока, а аллель уже зафиксирована в популяции [6].

Летальные мутации являются наиболее вредными с экономической точки зрения, потому что ни одно потомство, несущее такие мутации, не выживет и не сможет размножаться. Летальные генетические мутации – гаплотипы голштинской породы (НН) ответственны за эмбриональную и внутриутробную смертность, а так же снижение репродуктивных качеств голштинского скота в целом [1, 12]. Было установлено, что причиной НН1 является нонсенс-мутация, при которой белковый продукт экспрессии мутантного гена приобретает новые и патологические функции (g.C6315040T; p.Gln579Q→X), в гене фактора 1, активирующего апоптотические протеазы (APAF1) BTA5, имеющего решающее значение для эмбрионального развития [4].

APAF1 представляет собой многодоменный белок, состоящий из домена рекрутирования каспазы (CARD), домена связывания и олигомеризации нуклеотидов (NOD) и области повторов WD40 [18]. В структурные изменения белка вовлечены сложные физиологические и биохимические процессы. Активированная форма каспазы-9 инициирует каспаз-

ный каскад, который в конечном итоге приводит к апоптотической гибели клеток [4, 17] APAF1 образует олигомер, который при контакте с цитохромом-с и dATP образует цитоплазматическую структуру апоптосомы, которая связывает препротейн каспазы-9 и расщепляет его до зрелой активной формы. Эти трансформации оказывают влияние на этиологию рака, нарушения развития и нейродегенеративные заболевания [13, 15].

Обширные исследования в области происхождения, распространения и наследования в России и за рубежом 10-ти гаплотипов фертильности голштинского крупного рогатого скота (HCD, HH0, HH1, HH2, HH3, HH4, HH5,

HHB, HHC, HHD) проведены командой российских ученых [1, 3]. А.Н. Зиновьевой и др. разработан и запатентован «Способ определения полиморфизма APAF1, ассоциированного с гаплотипом фертильности голштинского скота HH1», который применяется на практике [3].

Анализ на основе ПЦР, которые являются наиболее простыми, экономичными и точными, могут эффективно использоваться для скрининга летальных генов и генетических мутаций у ремонтных телок, маточного поголовья и быков-производителей [14, 19], своевременно идентифицируя животных-носителей летального аллеля. Поскольку гомозиготные эмбрионы не выживают, они никогда не встречаются в гомозиготном состоянии среди рожденных животных.

Цель данного исследования – изучение аллельного полиморфизма гена фактора 1, активирующего апоптотические протеазы (APAF1; g.C6315040T; p.Gln579Q→X), – причины гаплотипа фертильности (HH1), в отечественной популяции голштинского скота Республики Татарстан.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные данные были получены при проведении опыта в 2021 г. в условиях СХПК «Племенной завод им. Ленина», расположенного в Атнинском районе Республики Татарстан. Животные (80 гол.), от которых получен биоматериал, являются полновозрастными корова-

Таблица 1.

Частота встречаемости аллелей и генотипов гена APAF1

Распределение	Генотипы						Аллели		χ^2
	<i>QQ</i>		<i>QX</i>		<i>XX</i>				
	n	%	n	%	n	%	<i>Q</i>	<i>X</i>	
Наблюдаемое	78	97, 5	2	2,5	0	0,0	0,988	0,012	0,013

ми голштинской породы отечественной селекции старше 3-й лактации.

Лабораторные молекулярно-генетические тесты проб крови проводились в отделе агробиологических исследований ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Экстрагирование и очистку ДНК из цельной крови выполняли при помощи готового набора «АмплиПрайм» (Некст Био, Россия). Генотипирование животных по гену APAF1 (Gln579Q→X) осуществляли методом ПЦР, с последующей рестрикцией эндонуклеазой BstC8 I (*Bacillus stearothermophilus* C8), по ранее разработанному и апробированному протоколу [3]. Разделение продуктов ПДРФ-анализа протекало в камере горизонтального фореа в агарозном 2,6% геле. Данные, полученные при идентификации и визуализации SNP обрабатывались и документировались в программе Gel&Doc (Bio-Rad, США).

Для локуса гена APAF1 - BstC8 I были рассчитаны аллельные и генотипические частоты, ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность, равновесие Харди-Вайнберга.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе генетического типирования были идентифицированы два аллеля: Q и X, и два генотипа: QQ и QX (Таблица 1).

Частота встречаемости аллеля Q составила 0,988, а аллеля X – 0,012. Генотипы гена APAF1 имели следующее соотношение: QQ – 97,5% (78 гол.) и QX – 2,5% (2 гол.). Ожидаемая гетерозиготность была аналогична наблюдаемой, без признаков смещения в сторону нарастания или понижения. Вариабельность между теоретическими и экспериментальными данными распределения генотипов, оцененная методом хи-квадрат Пирсона, составила

0,013, что ниже критического значения χ^2 (5,99). По результатам теста Харди-Вайнберга, аллели находились в равновесии ($p > 0,05$). Хотя общее количество проанализированных животных слишком мало, чтобы предположить, что эти аллели равномерно распределены в исследуемой популяции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследователи гаплотипа фертильности HH1, вызываемого мутацией геном Фактора 1, активирующего апоптотические протеазы, в своих обзорах предоставили неоднозначные результаты ДНК-тестирования крупного рогатого скота по гену APAF1. Данные по частоте встречаемости генотипов среди разных популяций голштинского скота наглядно демонстрирует гистограмма на рисунке 1.

Максимальный уровень животных с гетерозиготным генотипом QX – 47,75% от общего числа идентифицированного поголовья зафиксирован в Польше [11]. Доля таких особей в популяциях, оцененных российскими учеными, составила 17,50 и 1,49 % [1, 2].

Установлено, что численность уругвайских голштинских коров, несущих в локусе гена APAF1 (g.C6315040T; p.Gln579Q→X) летальный аллель X, имеет значение 4,44% [6]. Поголовье животных, имеющих генотип QX в Японии и США, насчитывало 2,15 и 2,90 % соответственно [4, 10]. Незначительное количество – 0,88 и 0,24 % QX-типированных особей наблюдалось в популяциях колумбийского и индийского скота голштинской породы [7, 13].

В 3-х изученных стадах голштинского скота Бразилии [5], Франции [8] и Казахстана [16], судя по представленным в открытом доступе исследованиям, все жи-

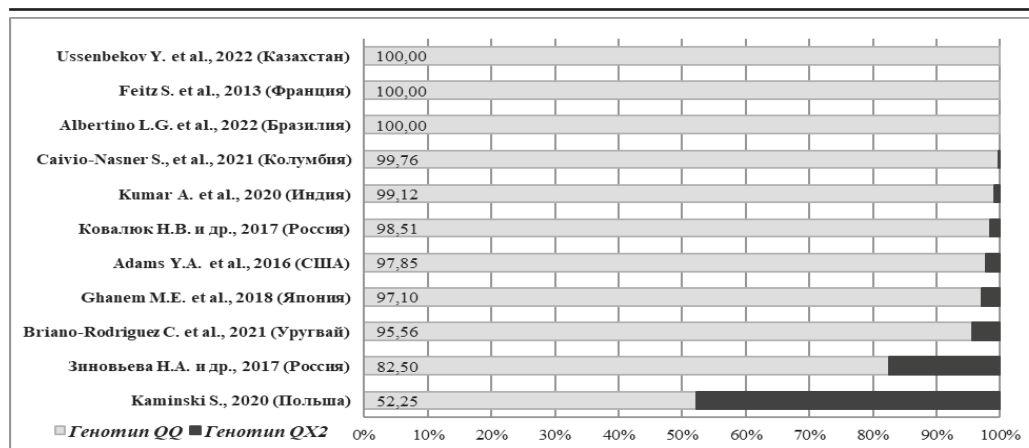


Рисунок 1. Частота встречаемости генотипов гена AFAF1 в мировых популяциях голштинского скота, %

вотные, прошедшие ДНК-тестирование полиморфизма гена AFAF1, являлись гомозиготными QQ.

ВЫВОДЫ

Из полученных нами результатов идентификации полиморфизма гена фактора 1, активирующего апоптотические протеазы (AFAF1; g.C6315040T; p.Gln579Q→X), – причины гаплотипа фертильности (HH1), в отечественной популяции голштинского скота Республики Татарстан следует, что животные-носители летального аллеля X занимают малую часть от общего поголовья – 2,5%, что, в большинстве случаев, согласуется с большей частью исследований различных авторов, изложенных выше. Скорее всего, описанное распределение аллелей связано с использованием спермопродукции быка, гетерозиготного по гену AFAF1 в селекционных мероприятиях.

Для сдерживания распространения мутантного аллеля X гена фактора 1 активирующего апоптотические протеазы, при отборе и подборе пар для племенной работы, рекомендуется проводить ДНК-тестирование полиморфизма гена AFAF1.

**Статья подготовлена в рамках государственного задания: 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.

IDENTIFICATION OF POLYMORPHISM IN AFAF1 GENE IN HOLSTEIN CATTLE

Natalia Yu Safina – candidate of biological sciences, senior researcher, Ziliya F Fattakhova – candidate of biological sciences, senior researcher, Elza R Gaynutdinova – researcher, Shamil K Shakrov – doctor of agricultural sciences, professor, chief researcher; Tatar Scientific Research Institute of Agriculture “Kazan Scientific Center of Russia Academy of Sciences”, Kazan, Russian Federation

ABSTRACT

The article presents the data of DNA testing of Holstein cattle by the AFAF1 gene. The structure of the Tatarstan population was studied in comparison with world experience. The aim of the study was to study the allelic polymorphism of the apoptosis peptide activating factor 1 gene (AFAF1; g.C6315040T; p.Gln579Q→X), the cause of the fertility haplotype (HH1), in the domestic population of Holstein cattle of the Republic of Tatarstan. Genotyping was carried out by PCR-RFLP followed by elec-

trophoretic separation in agarose gel in the presence of ethidium bromide. For the first time in the Republic of Tatarstan in the conditions of the Dairy farm "named Lenin" carried out the identification of cattle by the locus of APAF1 - BstC8 I, assessed the genetic equilibrium and structure of the population. As a result of gene diagnostics, two alleles and three genotypes were identified. The frequency of occurrence of alleles Q and X was 0.988 and 0.012; genotypes QQ and QX – 97.5 and 2.5%, respectively. Since homozygous XX embryos do not survive, they are never found among born animals. Chi-quad testing showed that the studied population is in genetic equilibrium according to the Hardy-Weinberg law. Our studies confirm an insignificant share of the presence of animals-carriers of the lethal allele in the population of Holstein cattle of domestic selection of the Republic of Tatarstan. In order to contain the spread of the mutant allele X of the apoptosis peptide activating factor 1 gene, it is recommended to conduct DNA testing of polymorphism of the APAF1 gene during the selection of pairs for breeding.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Зиновьева, Н.А. Гаплотипы фертильности голштинского скота / Н.А. Зиновьева // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т 51, № 4. С. 423-435.
2. Ковалюк, Н.В. А.А. Новая тест-система для выявления НН1 – гаплотипа фертильности крупного рогатого скота голштинской породы / Н.В. Ковалюк, Е.В. Мачульская., Ю.Ю. Шахназарова и др. // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. 2018. Т 7(2). С. 8-13.
3. Патент на изобретение RU 2614117 C1 Опубликовано 22.03.2017 Бюл. № 9. Заявка № 2016108132, от 09.03.2016 «Способ определения полиморфизма APAF1, ассоциированного с гаплотипом фертильности голштинского скота НН1» / Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А., Костюнина О.В. Романенкова О.С.
4. Adams, H.A. Identification of a nonsense mutation in APAF1 that is likely causal for a decrease in reproductive efficiency in Holstein dairy cattle / H.A. Adams, T.S. Sonstegard, P.M. VanRaden et al. // Journal of Dairy Science. 2016. vol. 99. P 6693–6701.
5. Albertino, L.G. Allele Frequency of APAF1 Mutation in Holstein Cattle in Brazil / L.G. Albertino, A.L.H. Albuquerque, J.F. Ferreira et al. // Frontiers in Veterinary Science. 2022. vol. 9. Art. 822224. DOI: 10.3389/fvets.2022.822224
6. Briano-Rodriguez, C. Lethal and semi-lethal mutations in Holstein calves in Uruguay / C. Briano-Rodriguez, A. Romero, S. Llambí et al. // Ciência Rural, Santa Maria. 2021. v. 51:7. e20200734. <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200734>
7. Caivio-Nasner, S. Frequency of genotypic markers for genetic disorders, colour, polledness, and major genes in Blanco Orejinegro cattle / S. Caivio-Nasner, A. López-Herrera, L.G. González-Herrera et al. // Tropical Animal Health and Production. 2021. vol. 53: 546. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02990-y>
8. 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. vol. 8(6): e65550. DOI:10.1371/journal.pone.0065550
9. Ghanem, M.E. Detection of APAF1 mutation in Holstein cows and mummified foetuses in Japanese dairy herds / M.E. Ghanem, M. Nishibori, N. Isobe et al. // Reproduction in Domestic Animals. 2018. vol. 53. P. 137–142.
10. Ghanem, M.E. Haplotypes associated with fetal death and abortion in Holstein cows with special reference to the situation in Japan / M.E. Ghanem, M. Nishibori // The Journal of Animal Genetics. 2018. vol. 46. P. 25–30.
11. Kamiński, S. Novel method for identification of the lethal mutation in bovine APAF1 gene and its preliminary prevalence in Polish Holstein-Friesian bulls / S. Kamiński // Polish Journal of Veterinary Sciences. 2020. vol. 23, No. 1. P. 157–160.
12. Kumar, A. Development of PCR based assays for detection of lethal Holstein haplotype 1, 3 and 4 in Holstein Friesian cattle /

- A. Kumar, I.D. Gupta, G. Mohan et al. // *Molecular and Cellular Probes*. 2020. 50: 101503. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.101503>
- 13.Ma, H. Identification and Functional Analysis of Apoptotic Protease Activating Factor-1 (Apaf-1) from *Spodoptera litura* / Ma H., Yan X., Yan L. // *Insects*. 2021. vol. 12. P. 64. <https://doi.org/10.3390/insects12010064>
- 14.Safina, N.Yu. Dynamics of dairy production of heifers of different genotypes of stearyl coa desaturase (SCD1) / N.Yu. Safina, Sh.K. Shakirov, F.F. Zinnatova et al. // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018. T. 9. No 6. P. 2028-2031.
- 15.Singh, R. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins / R. Singh, A. Letai, K. Sarosiek // *Molecular Cell Biology*. 2019. vol. 20. P. 175-193.
- 16.Ussenbekov, Y. Identification of monomorphic and polymorphic genes associated with recessive fertility defects in Holstein cows reared in Kazakhstan / Y. Ussenbekov, A. Bagdat, Zh. Bimenova et al. // *Veterinarski Arhiv*. 2022. vol. 92 (1). P. 27-35.
- 17.Wang, X. Bmapaf-1 is Involved in the Response against BmNPV Infection by the Mitochondrial Apoptosis Pathway / X. Wang, X. Ding, Q. Chen et al. // *Insects*. 2020. vol. 11: 647. DOI:10.3390/insects11090647
- 18.Yadav, N. Molecular insights on cytochrome c and nucleotide regulation of apoptosis function and its implication in cancer / N. Yadav, R. Gogada, J. O'Malley et al. // *BBA - Molecular Cell Research*. 2020. vol. 1867 (1). 118573. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2019.118573
- 19.Zinnatov, F.F. Studying the association of polymorphic variants of LEP, TG5, CSN3, LGB genes with signs of dairy productivity of cattle / F.F. Zinnatov, F.F. Zinnatova, A.H. Volkov et al. // *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2020. T. 11. No 2. P. 1428-1432.