

Выводы. В результате исследований выявлено, что аллелофонд EAB-локуса групп крови животных холмогорской породы при использовании голштинизированных холмогорских быков изменился. Отмечается сохранение преобладания аллелей холмогорской породы ($A_2'O'$, $E_3'G'G''$) при нарастании частоты встречаемости ($G_2Y_2E_1'Q'$) и появление новых аллелей, характерных для голштинской породы ($O_1A'2J'2K'O'$, $B_2Q'G'G''$, $E'3G'Q'$, B_1O_2B' , $O_4Y_2A_2'$, $O_4D'E_3'F_2'G'O'G''$).

Литература. 1. Ежегодник по племенной работе в молочном скотоводстве в хозяйствах Российской Федерации (2018 год). – Изд-во ФГБНУ ВНИИплем, 2019. – 254 с. 2. Программа разведения и совершенствования крупного рогатого скота холмогорской породы / Кертиев Р. М. [и др.]. – Зоотехния. – 2016. – № 2. – С. 14-15. 3. Методы современной селекции и сохранение генофонда молочного скота в Республике Коми / ГНУ НИИСХ Россельхозакадемии Республики Коми В.С. Матюков [и др.]. – Сыктывкар, 2012. – 156 с. 4. Племенная работа с холмогорской породой скота. / И. М. Дунин // МО, п. Лесные Поляны. – 2017. – №31. – С. 1-80.

УДК 636.2:636.082.12

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *FSHR* И *LHCGR* КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ОСНОВЕ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Ковальчук С.Н.

Институт инновационных биотехнологий в животноводстве – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», г. Москва, Россия

*Гены рецепторов фолликулостимулирующего (*fshr*) и лютеинизирующего (*lhcgr*) гормонов являются наиболее перспективными генетическими маркерами репродуктивного потенциала крупного рогатого скота. В результате проведенных исследований разработаны методы генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов *rs43745234* гена *fshr* и *ss52050737* гена *lhcgr* крупного рогатого скота на основе ПЦР в режиме реального времени с использованием аллель-специфичных флуоресцентно-меченых зондов. Данные методы позволяют проводить крупномасштабное генотипирование популяций крупного рогатого скота с целью отбора перспективных коров-доноров эмбрионов. **Ключевые слова:** крупный рогатый скот, трансплантация эмбрионов, *FSHR*, *LSHR*, генотипирование, ПЦР в реальном времени*

DEVELOPMENT OF REAL-TIME PCR ASSAYS FOR GENOTYPING SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF *FSHR* AND *LHCGR* GENES OF CATTLE

Kovalchuk S. N.

Institute of Innovative Biotechnologies in Animal Husbandry – the branch of L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Kostyakova str., Moscow, Russia

*Genes coding follicle stimulating hormone receptor (*fshr*) and luteinizing hormone / chorionotropin receptor (*lhcgr*) are the promising genetic markers for reproductive features of cows. As a result of the study real-time PCR assays with allele-specific fluorescent-labeled probes for genotyping single nucleotide polymorphisms *rs43745234* of *fshr* gene and *ss52050737* of *lhcgr* gene of cattle were developed. These methods allow large-scale genotyping of cattle populations in order to select the most successful donor cows for embryo transfer. **Keywords:** cattle, embryo transfer, *FSHR*, *LSHR*, genotyping, real-time PCR.*

Введение. Трансплантация эмбрионов является широко распространенным в мире методом ускоренного воспроизводства крупного рогатого скота. Данная технология включает в себя несколько этапов: подбор коров-доноров эмбрионов, проведение индукции суперовуляции, получение эмбрионов и их пересадка коровам-реципиентам [1]. Отбор перспективных коров-доноров эмбрионов является наиболее критичным этапом, от которого зависит экономическая целесообразность применения всей технологии. На эффективность технологии трансплантации эмбрионов влияют физиологические особенности потенциальных коров-доноров эмбрионов, их метаболический и гормональный статус, генетические факторы и др. [2, 3].

В качестве ДНК-маркеров репродуктивного потенциала коров предложены определенные аллельные варианты генов рецепторов фолликулостимулирующего гормона (FSHR) [4-6] и лютеинизирующего гормона [7-9]. Особый интерес представляют SNP 337C/G (rs43745234) в гене *fshr* [6] и SNP 1401G>T (ss52050737) в гене *lhcg*r [7]. Было выявлено, что коровы с генотипом G337G гена *fshr* характеризуются более высоким процентом жизнеспособных эмбрионов, животные с генотипами G337G и G337C имеют меньше неоплодотворенных ооцитов по сравнению с коровами, гомозиготными по аллелю С [6]. Для SNP 1401G>T (ss52050737) гена *lhcg*r было показано, что коровы с генотипами GG или GT характеризуются более высокими показателями общего количеству яйцеклеток, а по количеству выживших при трансплантации эмбрионов наилучшие показатели были у коров с генотипом GG. Также животные с генотипом GG имеют наименьшее количество неоплодотворенных яйцеклеток по сравнению с носителями двух других генотипов [7]. Таким образом, данные аллельные варианты генов *fshr* и *lhcg*r являются перспективными генетическими маркерами репродуктивного потенциала крупного рогатого скота.

Целью данной работы была разработка методов генотипирования SNP rs43745234 гена *fshr* и ss52050737 гена *lhcg*r крупного рогатого скота на основе ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы исследований. ДНК выделяли из образцов цельной крови коров черно-пестрого голштинизированного скота с помощью набора реагентов «М-сорб» (Синтол, Россия) согласно рекомендациям производителя. Для конструирования праймеров и зондов использовались программы GeneRunner, Multiple primer analyzer (<https://www.thermofisher.com/>). Олигонуклеотиды и зонды были синтезированы ООО «ДНК-синтез» (Москва, Россия).

ПЦР для SNP rs43745234 гена *fshr* проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл реактива LightCycler® 480 Probes Master («Roche», Швейцария), по 0,4 мкМ праймеров FSHR-F:5'-GAATTGAAAAGGCCAACAACC-3' и FSHR-R:5'-CACAGAATACAGAAGTTC-TT-CAGA-3', по 0,2 мкМ зондов FSHR337C: 5'-FAM-CATCGACCCTGATGCC-BHQ1-3' и FSHR337G: 5'-VIC-CATCGACGCTGATGC-BHQ1-3', 1 мкл смесь дНТФ (5 мМ), 0,3мкл HS TaqDNA полимеразы (Евроген, Россия), 10-30 нг ДНК. Программа для проведения ПЦР: 1-ый цикл: 95°C – 3 мин; далее 40 циклов при следующих условиях: 95°C – 20 сек, 55°C – 30 сек, 72°C – 20 сек. Детекция флуоресценции проводилась на стадии отжига праймеров и зондов по каналам FAM и VIC. ПЦР и анализ результатов генотипирования проводили с использованием амплификатора LightCycler® с программным обеспечением версии SW1.1. Валидацию разработанного метода проводили с помощью ПЦР-ПДРФ анализа: реакционная смесь для ПЦР (общий объем 20 мкл) готовилась с использованием набора HS Taq-DNA Polymerase dNTP mix («Евроген», Россия), праймеров F: 5'-GCTAAACTAAAACCCACCAG-3' и R: 5'-TGCTTTGTTTGTCTCTGATGA-3' (конечная концентрация 0,2 мкМ каждого) и 10 нг ДНК. Реакцию амплификации проводили при следующих условиях: 3 минуты при 95°C (1 цикл); 15 секунд при 95°C, 15 секунд при 58°C, 15 секунд при 72°C (40 циклов). Рестрикционный анализ проводили в 20 мкл смеси, содержащей полученные ампликоны, 2 мкл 10x буфера G и 0,5 мкл эндонуклеазы HgaI («Сибэнзим», Россия) в течении 16 часов при 37°C. Результаты ПЦР-ПДРФ оценивали методом электрофореза в 1,2% агарозном геле.

ПЦР для SNP ss52050737 гена *lhcg*r проводили в 10 мкл смеси ПЦР, содержащей 5 мкл реактива LightCycler® 480 Probes Master («Roche», Швейцария), по 0,4 мкМ прямого праймера *lhcg*r-F: 5'-TGAACCTCTGTCTACACCCTCACA-3' и обратного праймера *lhcg*r-R: 5'-

GCATGACTGGAATGGCATGTT-3', по 0.2 мкМ аллель-специфичных зондов *lhcgr*-T: 5'-(FAM)-CACTAGAAAGATGTCACACC-(BHQ1)-3' (0.2 μM) и *lhcgr*-G: 5'-(VIC)-STAGAAAGATGGCACACC-(BHQ1)-3', 10 нг ДНК. ПЦР проводили с помощью прибора LightCycler 96 («Roche», Швейцария) в оптимизированных условиях (95 °С - 10 мин.; 95 °С 15 сек., 58 °С r 30 сек., 72 °С 20 сек., 40 циклов). Детекция флуоресценции проводилась на стадии элонгации по каналам FAM и VIC. Для анализа результатов генотипирования использовали программное обеспечение к амплификатору LightCycler® 96 версии SW1.1. Валидацию метода проводили с помощью ПЦР-ПДРФ: реакционная смесь для ПЦР (общий объем 20 мкл) готовилась с использованием набора HS Taq-DNA Polymerase dNTP mix (Евроген, Россия), содержала по 0.2 мкМ праймеров Dir: 5'-ACAGTCCCCCGCTTTCTCAT-3' и Rev: 5'-TGACACCCACAAGAGGCAAC-3' и 10 нг ДНК. Реакцию амплификации проводили при следующих условиях: денатурация ДНК при 95°С в течение 15 с, отжиг праймеров при 62°С в течение 15 с, элонгация при 72°С в течение 15 с (40 циклов). Рестрикцию проводили в 20 мкл смеси, содержащей 2 мкл 10х буфера G и 1.5 мкл эндонуклеазы NnuCI (Thermo Scientific, США) в течение 16 часов при 37°С. Результаты рестрикции оценивали методом электрофореза в 1,2% агарозном геле.

Результаты исследований. На сегодняшний день для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов наиболее широко используется метод ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Основными недостатками данного метода являются его многостадийность (амплификация полиморфного участка гена, рестрикция полученного ампликона специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов), продолжительность (около 20 часов), вероятность недостоверных результатов в случае неоптимального соотношения количества ДНК, рестриктазы и времени рестрикции [10].

Альтернативой ПЦР-ПДРФ анализа является метод ПЦР в режиме реального времени. В результате проведенных исследования были разработаны методы генотипирования SNP rs43745234 гена *fshr* и ss52050737 гена *lhcgr* крупного рогатого скота на основе ПЦР в реальном времени. В ПЦР используются два праймера, фланкирующие участок гена с полиморфным сайтом, и два аллель-специфичных флуоресцентно-меченых зонда TaqMan. Идентификация аллелей генов *fshr* и *lhcgr* проводится по наличию флуоресценции красителей FAM и VIC. Результаты генотипирования представлены на рисунках 1 и 2.

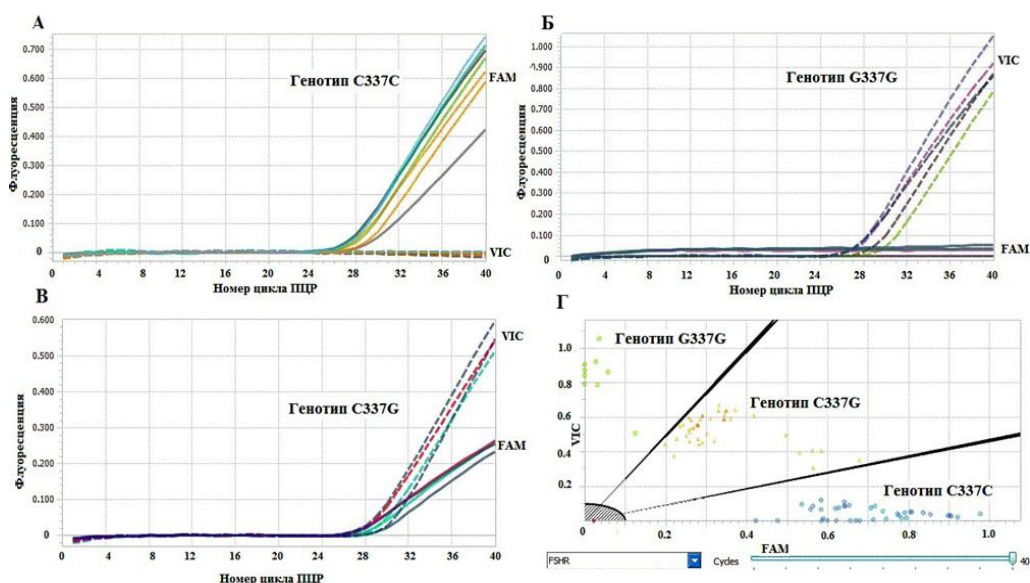


Рисунок 1 – А – кривые флуоресценции для гомозиготных образцов по аллелю С (генотип С337С).

Б – кривые флуоресценции для гомозиготных образцов по аллелю G (генотип G337G).

В – кривые флуоресценции для гетерозигот G337С.

Г - график распределения аллелей 337С/G гена *fshr*

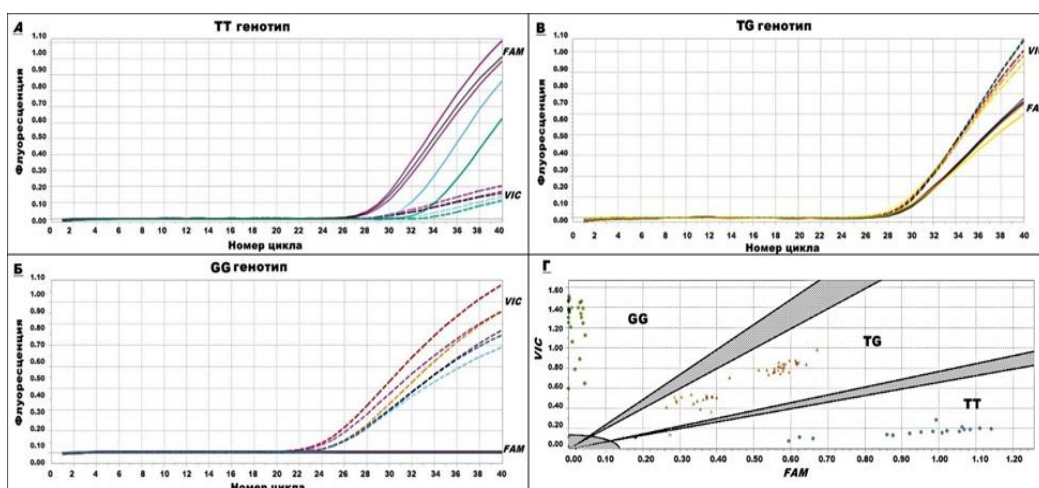


Рисунок 2 – Пример детекции аллелей 1401G/T (ss52050737) гена *lhcgr* крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени. Представлены кривые флуоресценции (А-В) и распределение генотипов (Г)

Валидацию разработанных методов проводили с помощью ПЦР-ПДРФ анализа (рисунок 3).

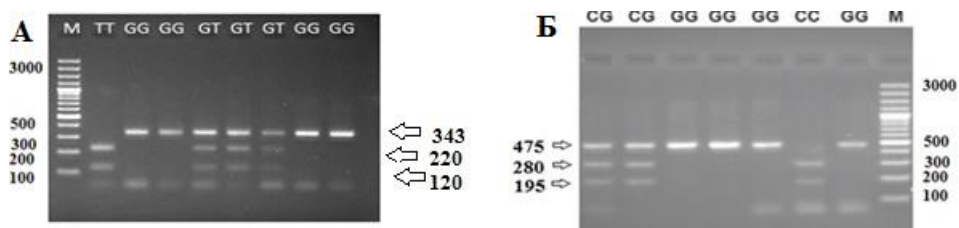


Рисунок 3 – Примеры ПЦР-ПДРФ анализа для SNP rs43745234 гена *fshr* (А) и SNP ss52050737 гена *lhcgr* (Б) крупного рогатого скота

Заключение. Нами разработаны методы генотипирования SNP rs43745234 гена *fshr* и ss52050737 гена *lhcgr* крупного рогатого скота на основе ПЦР в реальном времени с использованием аллель-специфичных флуоресцентно-меченых зондов. Разработанные методы позволяют проводить крупномасштабное генотипирование популяций крупного рогатого скота (до 480 образцов ДНК за 1,5 часа) с целью отбора перспективных коров-доноров эмбрионов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России № 121052600344-8.

Литература. 1. Bó, G. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle / G. A. Bó, R. J. Mapletoft // *Theriogenology*. – 2014. – Vol. 81. – P. 38–48. 2. Бригида, А. В. Факторы, влияющие на реакционный ответ яичников коров-доноров эмбрионов при введении экзогенных гонадотропинов (обзор) / А. В. Бригида, С. А. Бурсаков, О. А. Скачкова // *Достижения науки и техники АПК*. – 2018. – Т. 32. – № 6. – С. 56-63. 3. Baruselli, P. S. Intrinsic and extrinsic factors that influence ovarian environment and efficiency of reproduction in cattle / P. S. Baruselli, E. O. S. Batista, L. M. Vieira // *Animal Reproduction*. – 2017. – Vol. 14. – № 1. – P. 48-60. 4. Fauser, B. Predictors of ovarian response: Progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation / B. Fauser, K. Diedrich, P. Devroey // *Human Reproduction Update*. – 2008. – Vol. – 14. – № 1. – P. 1-14. 5. Sharifiyazdi, H. Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on some reproductive indices in dairy cows / H. Sharifiyazdi, A. Mirzaei, Z. Ghanaatian // *Animal Reproduction Science*. – 2018. – Vol. 188. – P. 45-50. 6. Cory, A. T. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine follicle-stimulating hormone receptor and effects of genotypes on superovulatory response traits / A. T. Cory, C. A. Price, R. Lefebvre, M. F. Palin // *Animal Genetics*. – 2013. – Vol. 44. – № 2. – P. 197-201. 7. Hastings, N. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits / N. Hastings, S. Donn, K. Derecka, A. P. Flint, J. A. Woolliams // *Animal genetics*. – 2006. – Vol. 37. – № 6. – P. 583-585. 8. Yang, W. C. Polymorphisms of the bovine luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR) gene and its association with superovulation traits / W. C. Yang, K. Q. Tang, S. J. Li, L. M. Chao, L. G. Yang // *Molecular biology reports*. – 2012. – Vol. 39. – № 3. – P. 2481-2487. 9. Yu, Y. Association of a missense mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin

receptor gene (*LHCGR*) with superovulation traits in Chinese Holstein heifers / Y. Yu, Y. Pang, H. Zhao, X. Xu, Z. Wu, L. An, J. Tian // *Journal of animal science and biotechnology*. – 2012. – V. 3. – P.35. 10. Babii, A. V. A TaqMan PCR assay for detection of *DGAT1* K232A polymorphism in cattle / A. V. Babii, A. L. Arkhipova, I. N. Andreichenko, A. V. Brigida, S. N. Kovalchuk // *AIMS Agriculture and Food*. – 2018. – V. 3. – N. 3. – P. 306-312.

УДК 602.6

ОПЫТ ПОДБОРА ЦЕЛЕВЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОВЕЦ С НОКАУТИРОВАННЫМ ГЕНОМ *MSTN* И ФЕНОТИПОМ ДВОЙНОЙ МУСКУЛАТУРЫ

Криворучко А.Ю., Яцык О.А.

ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ», г. Михайловск, Россия

*В статье приводятся сведения об опыте подбора целевых последовательностей при конструировании системы CRISPR/Cas9 для редактирования гена *MSTN* овец с использованием инструментов биоинформатического анализа, размещенных в свободном доступе. Для снижения риска получения низкоэффективных редактирующих конструкций при подборе целевых последовательностей рекомендуем использовать сразу несколько ресурсов для комплексной оценки специфичности и предварительного прогноза эффективности гомологичных направляющих РНК. **Ключевые слова:** миостатин, CRISPR/Cas9, геномное редактирование, целевая последовательность, овца.*

EXPERIENCE IN THE SELECTION OF TARGET SEQUENCES IN THE DESIGN OF THE CRISPR/CAS9 SYSTEM FOR OBTAINING SHEEP WITH KNOCKED OUT *MSTN* GENE AND DOUBLE MUSCLE PHENOTYPE

Krivoruchko A.Yu., Yatsyk O.A.

North Caucasian Federal Scientific Agrarian Center, Mikhailovsk, Russia

*The article provides information on the experience of selecting target sequences when constructing a CRISPR / Cas9 system for editing the sheep *MSTN* gene using publicly available bioinformatics analysis tools. To reduce the risk of obtaining low-efficiency editing constructs when selecting target sequences, we recommend using several resources at once for a comprehensive assessment of the specificity and preliminary prediction of the effectiveness of homologous guide RNAs. **Keywords:** myostatin, CRISPR / Cas9, genomic editing, target sequence, sheep.*

Введение. Ген миостатина (*MSTN*, *GDF-8*) – один из ключевых регуляторов мышечного роста, ограничивающий дифференцировку и пролиферацию миосателлитов, миобластов и некоторых других видов клеток. При блокировании белкового продукта гена *MSTN* наблюдается увеличение мышечной массы и повышение силовых характеристик скелетных мышц (A. Ahad et al., 2017). Животные нуль-мутанты по гену *MSTN*, как правило, имеют фенотип двойной мускулатуры и отличаются высоким уровнем мясной продуктивности. В связи с этим для сельского хозяйства, в том числе овцеводческой отрасли, большой интерес представляет разведение продуктивных животных с нокаутом гена миостатина. С развитием технологий геномного редактирования появилась возможность направленного получения животных с нокаутом гена *MSTN* (Aiello et al., 2018). Как показывает мировая практика, наиболее перспективной, относительно простой и экономически выгодной является стратегия редактирования генома сельскохозяйственных животных с использованием системы CRISPR/Cas9 (Lino et al., 2018).