

Применение полногеномной амплификации для генетической оценки эмбрионов коров

К.С. Пантюх¹, И.В. Рукин¹, С.М. Портнов¹, А. Хатиб², С.Л. Пантелеев³, А.М. Мазур¹ 

¹ ООО «Мой Ген», Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ООО «Ион Сервис», Москва, Россия

 e-mail: alexander.mazur@genoanalytica.ru

В странах с развитым животноводством в последнее десятилетие активно происходит интеграция наукоемких технологий в племенное животноводство. В первую очередь речь идет о репродуктивных технологиях (ЭКО) и геномных технологиях (оценка носительства летальных гаплотипов и геномная оценка племенной ценности). Комбинирование репродуктивных и геномных технологий – перспективный подход, который позволит получать племенной скот высокого качества в кратчайшие сроки. В основе предлагаемой технологии ускоренного воспроизводства высокоценного племенного скота лежит получение информации о геноме эмбриона для проведения геномной оценки. Так как необходимо сохранить эмбрион живым, то количество генетического материала, который можно получить для исследований, крайне ограничено. Чтобы получить ДНК высокого качества и в достаточном количестве, при проведении генотипирования на чипах вводится этап полногеномной амплификации ДНК. Основной целью работы была оценка возможности использования биоптата (бп) эмбрионов для генотипирования и предсказания носительства летальных гаплотипов на основе результатов генотипирования. Нами было получено 100 эмбрионов крупного рогатого скота, из которых удалось взять 78 биоптатов. Полученные биоптаты были использованы для проведения полногеномной амплификации и генотипирования с применением микроматрицы. Качество и количество ДНК после проведения полногеномной амплификации всех 78 образцов были удовлетворительными для дальнейшего генотипирования. Результаты генотипирования позволили провести расчет пола животного и определение статуса носительства семи основных летальных гаплотипов голштинской породы. Из 78 протестированных животных по результатам анализа генотипа были найдены 3 носителя летальных гаплотипов – НН0 (брахиспина), НН5 и НСD. Носительство летальных гаплотипов НН0 и НН5 было подтверждено тестированием мутации, влияющей на потерю фертильности (казуальной) с помощью ПЦР-анализа. Статус носительства гаплотипа НСD после тестирования казуальной мутации не был подтвержден. Отсутствие казуальной мутации НСD у животного-носителя гаплотипа НСD можно объяснить тем, что предположительным родоначальником гаплотипа НСD является бык НОCAN00000334489 WILLOWHOLME MARK ANTHONY (год рождения – 1975), в то время как казуальная мутация, связанная с появлением заболевания, возникла в этом гаплотипе уже у его потомка, быка НОCAN000005457798 MAUGHLIN STORM (год рождения – 1991). Полученные данные подтверждают важность тестирования казуальной мутации у животных-носителей летальных гаплотипов.

Ключевые слова: крупный рогатый скот (КРС); молочное направление; племенное разведение; геномная оценка; племенные животные.

Для цитирования: Пантюх К.С., Рукин И.В., Портнов С.М., Хатиб А., Пантелеев С.Л., Мазур А.М. Применение полногеномной амплификации для генетической оценки эмбрионов коров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):489-495. DOI 10.18699/VJ19.518

The use of whole genome amplification for genomic evaluation of bovine embryos

K.S. Pantiukh¹, I.V. Rukin¹, S.M. Portnov¹, A. Khatib², S.L. Pantelev³, A.M. Mazur¹ 

¹ I Gene, LLC, Moscow, Russia

² Moscow M.V. Lomonosov State University, Moscow, Russia

³ Ion Service, LLC, Moscow, Russia

 e-mail: alexander.mazur@genoanalytica.ru

The integration of high technologies into livestock production has been actively occurring in the last decade in the countries with a developed animal breeding. First of all, we are talking about reproductive technologies (IVF) and genomic technologies (general genomic evaluation of animal and genomic evaluation of breeding value). Combining reproductive and genomic technologies is a promising approach that allows receiving high-quality breeding cattle in the shortest possible time. The basis of the proposed technology for accelerated reproduction of high-value breeding cattle is to obtain information about the genome of the embryo for genomic evaluation. The amount of genetic material that can be obtained for research is extremely limited, as it is necessary to preserve the viability of the embryo. The

stage of the whole genome amplification was introduced to obtain a high quality of genetic material in a sufficient quantity. The main purpose of this work is to assess the possibility of using embryo biopsy specimens (bsp) for embryo genotyping using microarray chips and predicting the carrier status of lethal haplotypes at the embryo stage. We obtained 100 cattle embryos, of which 78 biopsy specimens were taken to analysis. For the biopsies obtained we performed the whole genome amplification. The quality and quantity of DNA for all the 78 samples after the whole genome amplification were satisfactory for further genotyping. The quality of the performed genotyping was satisfactory and allowed the assessment of lethal haplotype carriers (determining the sex of the animal and identification of the carrier status for seven Holstein lethal haplotypes). We tested 78 embryos. From the genotyping analysis, there was detected one carrier status for three lethal haplotypes, HH0 (Brachyspina), HH5, and HCD. The carrier status of HH0 and HH5 was confirmed by testing the causal mutation using PCR analysis. The carrier status for HCD has not been confirmed by casual mutation analysis. The situation in which an animal is an HCD carrier, but not the carrier of a casual mutation, can be explained. The putative ancestor of the haplotype is the bull HOCAN00000334489 WILLOWHOLME MARK ANTHONY (year of birth is 1975), but a causal mutation associated with this disease has arisen only in his descendant HOCAN00000545798 MAUGHLIN STORM (year of birth is 1991). The results obtained confirm the importance of testing the casual mutation in the animals that are carriers of lethal haplotypes according to the genotyping data.

Key words: cattle; dairy direction; breeding; genomic evaluation; breeding animals.

For citation: Pantiukh K.S., Rukin I.V., Portnov S.M., Khatib A., Pantelev S.L., Mazur A.M. The use of whole genome amplification for genomic evaluation of bovine embryos. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(4):489-495. DOI 10.18699/VJ19.518 (in Russian)

Введение

Основным продуктом промышленного скотоводства является цельное молоко и молочные продукты. В Российской Федерации молочные продукты относятся к группе социально значимых продуктов питания. В 2008 г. производство молока в стране составило около 32.3 млн т, а в 2015 г. надой молока уменьшился на 4.7 % – до 30.8 млн т. Сокращение производства молока происходит на фоне нехватки молока и молочных продуктов для большинства социальных групп граждан. По данным Всемирной организации здравоохранения, минимально допустимый уровень потребления молока и молочных продуктов – 359 кг в год на душу населения, однако в Российской Федерации эта цифра составляет только 249 кг. Отсутствие в стране современной независимой селекции животных в племенном молочном животноводстве – основная причина сложившейся драматической ситуации.

Увеличение промышленного производства молока возможно за счет направленной селекции племенного скота по признакам молочной продуктивности. Эффективность селекции измеряется в ежегодном генетическом прогрессе популяции племенных животных (ΔG). Генетический прогресс популяции, в свою очередь, зависит от варибельности признака, по которому ведется селекция, интенсивности селекции, точности оценки племенной ценности и генерационного интервала. Внедрение геномной оценки племенной ценности может улучшить три из четырех этих факторов (Boicharda et al., 2016), а именно – увеличить точность оценки племенной ценности на 40 % (по сравнению с традиционной оценкой по родителям) и в два-три раза сократить генерационный интервал – минимальное время, необходимое для получения племенного стада высокопродуктивных быков-производителей, и увеличить интенсивность селекции за счет возможности выбирать быков-производителей из большего количества животных (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007). Внедрение геномной оценки позволит увеличить ежегодный генетический прогресс популяции в три раза по сравнению с традиционной оценкой по потомству. При этом затраты на проведение геномной оценки в пересчете

на единицу генетического прогресса в сто раз меньше, чем при проведении традиционной оценки по потомству (Кузнецов, 2015).

Еще одной важной проблемой современного животноводства является снижение показателей фертильности коров. Перед тем как признаки фертильности были включены в систему селекции (вошли в состав геномного индекса племенной ценности), племенное животноводство фокусировалось на признаках продуктивности, что привело к неблагоприятному снижению репродуктивных качеств животных (Ma et al., 2018). Одним из возможных объяснений этой тенденции может быть генетический фактор, а именно: отрицательная корреляция между факторами увеличения молочной продуктивности и показателями фертильности. Быстрая и интенсивная селекция скота на увеличение молочной продуктивности, таким образом, неминуемо приводит к снижению фертильности. В последние несколько лет были определены рецессивные дефекты, связанные с потерей фертильности, которые обуславливают эмбриональную и раннюю постэмбриональную смертность в гомозиготном состоянии. Для обнаружения большинства из них использовали новый подход, разработанный P.M. VanRaden с коллегами (2011), который предполагает поиск гаплотипов, ассоциированных с казуальной мутацией среди большого количества накопленных генотипов животных. Найденные таким образом генетические дефекты получили общее название «летальные гаплотипы, связанные с потерей фертильности». Для голштинской породы на сегодняшний день известно семь летальных гаплотипов: HH1, HH2, HH3, HH4, HH5, HCD, HH0 (брахиспина). Проходит проверку еще один новый гаплотип – HH6 (Fritz et al., 2018). Статус носительства летальных гаплотипов не включается в геномную оценку племенной ценности животного. Проводить генетический мониторинг для выявления животных-носителей моногенных заболеваний и гаплотипов крайне важно. Всесторонний генетический мониторинг животных на статус носительства моногенных заболеваний, летальных гаплотипов, аллельный состав генов белков молока и других хозяйственно полезных признаков проводится в рамках геномного паспорта животного.

Возможность проводить геномную оценку племенной ценности и генетический мониторинг для жизнеспособных эмбрионов животных позволят создать систему ускоренного воспроизводства высокоценного племенного скота за счет выбора и подсадки эмбрионов с наивысшей племенной ценностью и отсутствием носительства летальных гаплотипов.

Материалы и методы

Получение эмбрионов. Для получения эмбрионов в качестве быков-отцов были предварительно отобрано 17 быков-производителей голштинской или черно-пестрой голштинизированной породной группы.

От каждого быка было получено семя объемом 250 мкл. После анализа происхождения быков-производителей, племенной ценности их предков и доступности семени от разных быков-производителей для реализации проекта было отобрано шесть быков из ОАО «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных», три быка из ОАО «Московское» по племенной работе» и три быка из ООО «Альга Дженетикс Раша». Сперматозоиды от быков транспортировались в жидком азоте в сосудах Дьюара и были предоставлены либо станцией искусственного осеменения, либо хозяйством, где производилась аспирация яичников коров-доноров.

Отбор коров-доноров проводился из голштинской популяции живых коров племенных предприятий Пермского края. Отбор потенциальных коров-доноров яйцеклеток проводили внутри выбранного хозяйства по возрасту, высокой воспроизводительной способности и их показателям продуктивности с учетом селекционного плана хозяйства. Для отбора в популяцию коров-доноров не допускаются животные, больные инфекционными заболеваниями, находящиеся в состоянии отрицательного энергетического баланса, т. е. в периоде прогрессирующей потери массы тела после отёла, чрезмерно истощенные или ожиревшие. Для получения большего количества яйцеклеток при аспирации эмбрионов от каждой коровы-донора было проведено исследование, направленное на прогнозирование эмбриопродуктивности коров-доноров эмбрионов на основании эхографической характеристики яичников.

После аспирации яичников коров-доноров осуществлялся поиск ооцитов под бинокулярной лупой после промывки аспирированной жидкости раствором буфера Дульбекко и визуально оценивалась пригодность найденного ооцита для постановки на дозревание. На дозревание ставились только ооциты, отвечающие следующим требованиям: ооцит должен быть жизнеспособным, содержать кумулюсные клетки, равномерно окружающие ооцит; ооплазма должна быть мелкозернистой и равномерно заполнять прозрачную оболочку; прозрачная оболочка в свою очередь должна быть однородной по толщине и округлой по форме. Отобранные ооциты необходимого качества ставились на созревание в течение 22 ч в среде IVM. После завершения инкубации ооциты отмывали от среды IVM и переносили в среду для оплодотворения. Сперму от быков промывали в градиенте Перколлы (45:90) и переносили в среду для оплодотворения к заранее подготовленным на предыдущем этапе для постановки на IVF ооцитам. Среду с поставленными на IVF ооцитами

инкубировали в инкубаторе для оплодотворения в течение 24 ч. После инкубации поставленные на IVF ооциты промывали троекратно и переносили в буфер для культивирования. Культивировали на планшетном инкубаторе при постоянной температуре, влажности и в регулируемой газовой среде. На 6-й день культивирования в планшетном инкубаторе проводили оценку качества полученных эмбрионов и перенос незамерзших эмбрионов высокого качества для дальнейшего осуществления биопсии. Биопсию делали на стадии бластоцисты с помощью иглы. Количество отобранных клеток трофобласта доводили до 30–50. Подсчет велся в момент движения оторванных клеток в канале биопсийной пипетки. Биоптат из полости пипетки выдавливали в приготовленную каплю буфера PBS × 2 объемом 2 мкл. Каплю, содержащую клетки эмбриотрофобласта, соединяли на дне пробирки LoBind с предварительно помещенной на дно капель буфера PBS × 2 объемом 2.5 мкл. После процедуры биопсии эмбрион переносили в среду для культивирования в индивидуальную каплю и маркировали необходимым для идентификации образом.

Контроль жизнеспособности эмбриона проводили через 8–24 ч непосредственно перед криоконсервацией. Замороженный эмбрион, кроме необходимой информации о происхождении, сохранял идентификационный номер биопсии.

Полногеномная амплификация ДНК и генотипирование. Для проведения полногеномной амплификации (ПГА) использовали метод изотермической амплификации с множественным вытеснением. Полногеномную амплификацию осуществляли с помощью набора IlluminaPhi V2 DNA Amplification Kit (Illumina, США), согласно стандартным рекомендациям, указанным в наборе. Амплификацию проводили для 78 полученных образцов биоптата. Для каждого образца после проведения ПГА были выполнены количественная оценка ДНК на спектрофотометре NanoDrop ND1000-Technologies-Inc (Wilmington, DE, США) и качественная оценка методом гель-электрофореза. Для проведения генотипирования брали 4 мкл образца с концентрацией ДНК 50 нг/мкл и использовали микроматрицы ДНК BovineSNP50 V3 DNA Analysis BeadChip (Illumina, США), согласно инструкции к этим микроматрицам Infinium® HD Assay Ultra, Manual Experienced User Card (Part # 11328095 Rev. B, Illumina, США).

Оценка носительства летальных гаплотипов. Для последующего анализа использовали только генотипы высокого качества (процент генотипированных однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) более 95 % (call rate > 95 %)). Для каждого тестируемого животного были определены статусы носительства семи основных летальных гаплотипов голштинской породы путем анализа значений аллелей на наличие полиморфизмов, входящих в гаплотип. Если по каждому ОНП, входящему в гаплотип, хотя бы один из аллелей имел значение, имеющееся в летальном гаплотипе, животное получало статус носителя летального гаплотипа. Все остальные животные получали статус неносителя летального гаплотипа.

Амплификация индивидуальных фрагментов ДНК. Все образцы были протестированы на HCD при помощи метода, описанного в (Menzi et al., 2016), с ис-

пользованием трех пар праймеров. Праймер WF отжигался на последовательности геномной ДНК *Bos taurus* 5'-GGTGACCATCCTCTCTGTC-3', независимо от наличия делеции. Два других праймера позволяли отличить последовательность геномной ДНК с делецией и без делеции. Праймер к последовательности геномной ДНК *B. taurus* без делеции (WR) 5'-AGTGGAACCCAGCTCCATTA-3' обеспечивал амплификацию продукта размером 249 п. н., Праймер (MF) 5'-CACCTTCCGCTATTCGAGAG-3' к последовательности геномной ДНК *B. taurus* с делеции обеспечивал амплификацию продукта размером 436 п. н.

Амплификацию индивидуальных фрагментов ДНК осуществляли методом ПЦР в следующих условиях: 94 °C 3 мин; 94 °C 30 с, 58 °C 30 с, 72 °C 30 с – 35 циклов; финальная элонгация – 72 °C 5 мин. Реакционная смесь содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0,4 мкл праймера HCD WF 2.5 пмоль/мкл, 0,4 мкл праймера HCD WR 2.5 пмоль/мкл, 6,2 мкл MQ H₂O. Вторая реакционная смесь объемом 10 мкл, содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0,4 мкл праймера HCD MF 2.5 пмоль/мкл, 0,4 мкл праймера HCD WR 2.5 пмоль/мкл, 6,2 мкл MQ H₂O.

Образцы тестировали на мутацию брахиспина (HH0) с помощью метода, описанного в (Charlier et al., 2012), с использованием аллель-специфической ПЦР. Для проведения анализа использовали четыре праймера. Первая пара праймеров – маркирующие вариант аллеля без делеции: прямой – Across_UP1 5'-TCACAAAAGGGTAG GAGACTACCTG-3', обратный – Across_DN1 5'-GCTTA TTGTTTACCSTTGACAGTGG-3' – обеспечивали амплификацию продукта размером 551 п. н. Вторая пара праймеров – маркирующие вариант аллеля с делецией: прямой – BY Within_F1 5'-GCTCAAGTAGTTAGTTGC TCCACTG-3', обратный – BY Within_R1 5'-ATAAATAAA TAAAGCAGGATGCTGAAA-3' – обеспечивали амплификацию продукта размером 421 п. н. (Charlier et al., 2012).

Амплификацию индивидуальных фрагментов ДНК осуществляли методом ПЦР в следующих условиях: 94 °C 3 мин; 94 °C 30 с, 58 °C 30 с, 72 °C 30 с – 35 циклов; финальная элонгация – 72 °C 5 мин. Первая реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0,4 мкл праймера Across_UP1 2.5 пмоль/мкл, 0,4 мкл праймера BY Across_DN1 2.5 пмоль/мкл, 6,2 мкл MQ H₂O. Вторая реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0,4 мкл праймера BY Within_F1 2.5 пмоль/мкл, 0,4 мкл праймера BY Within_R1 2.5 пмоль/мкл, 6,2 мкл MQ H₂O.

Все образцы были протестированы на HH5 с помощью ПЦР с использованием трех пар праймеров: прямой праймер (HH5_F) отжигался на последовательности геномной ДНК *B. taurus*, независимо от наличия мутации 5'-AGATATGCTAAAGTTTACSTAGAAGAA-3', и два праймера, позволяющих отличить последовательность, содержащую делецию и не содержащую ее. Праймер к последовательности геномной ДНК *B. taurus* без делеции (HH5_WT_R) 5'-CTGAAGCTCCAGTCTGAGTCAT-3' обеспечивал амплификацию продукта размером 442 п. н., праймер к последовательности геномной ДНК *B. taurus* с делецией (HH5_Del_R) 5'-TGCTCTATGAATTTG

TGAATGGT-3' обеспечивал амплификацию продукта размером 256 п. н.

Амплификацию индивидуальных фрагментов ДНК осуществляли методом ПЦР в следующих условиях: 94 °C 3 мин; 94 °C 30 с, 58 °C 30 с, 72 °C 30 с – 35 циклов; финальная элонгация – 72 °C 5 мин. Первая реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0,4 мкл праймера HH5_F 2.5 пмоль/мкл, 0,4 мкл праймера HH5_WT_R 2.5 пмоль/мкл, 6,2 мкл MQ H₂O. Вторая реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 2 мкл 5 × Mix (набор ПЦР-микс 5 × MasCFETaq MIX-2025), 0,4 мкл праймера HH5_F 2.5 пмоль/мкл, 0,4 мкл праймера HH5_Del_R 2.5 пмоль/мкл, 6,2 мкл MQ H₂O.

Анализ продуктов амплификации проводили при помощи электрофореза в 4 % TAE агарозном геле с бромидом этидия (EtBr) в течение 40 мин под напряжением 120 В, в качестве размерного маркера использовали ДНК Лэддер М-50 (ДИАЛАТ Лтд. кат. № MWM-50RL). В качестве буфера для электрофореза использовали 1 × TAE (0.04 М Trisbase, 0.02 М уксусная кислота, 0.5 М ЭДТА).

Результаты

Выбор породы животных для получения эмбрионов.

Для получения эмбрионов была выбрана голштинизированная черно-пестрая порода крупного рогатого скота (КРС). В настоящее время в мире существует более 300 пород *B. taurus* (Дуров и др., 2013). На молочное направление продуктивности приходится около 120 пород, причем наибольшее распространение получили не более 30. Самой высокопродуктивной молочной породой КРС в мире на сегодняшний день является голштинская порода (Дунин и др., 2013). Наиболее распространенные молочные породы коров в Российской Федерации – черно-пестрая, симментальская, холмогорская, красно-пестрая, голштинская, красная степная, айрширская и ярославская. Количество животных черно-пестрой породы в России приближается к 58 % от общего поголовья, наибольшее количество этих животных сосредоточено в европейской части. В племенном поголовье примерно такая же ситуация – доля племенных животных черно-пестрой породы от общего поголовья племенных животных составляет 59.2 % (939.5 тыс. голов из 1587). С учетом динамичного развития и широкого распространения этой породы на территории Российской Федерации она является лучшей среди существующих пород в России для разработки и апробирования технологии предимплантационной геномной оценки племенной ценности.

Однако из-за масштабного улучшения черно-пестрой породы быками голштинской породы у многих племенных быков доля кровности по голштинской породе превышает 50 % (Тихонова и др., 2015). Это обстоятельство говорит о высокой степени голштинизации российской черно-пестрой породы.

Выбор быков для получения эмбрионов. При оценке качества семени проводился учет концентрации сперматозоидов (количество миллионов сперматозоидов в 1 мл) и их подвижности (в %), учитывали долю прогрессивно подвижных, непрогрессивно подвижных и неподвижных сперматозоидов.

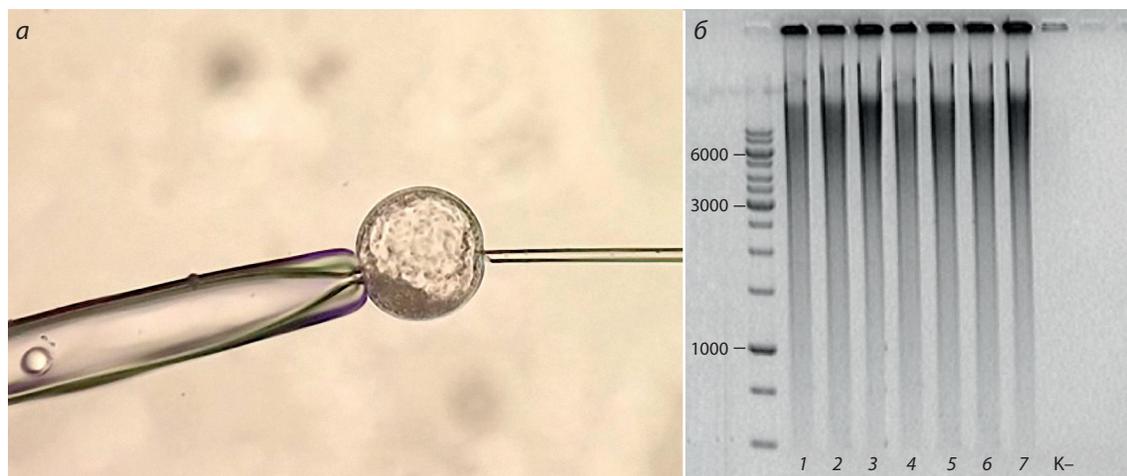


Рис. 1. Биопсия эмбриона и гель-электрофорез результатов ПГА.

a – биопсия эмбриона из третьего раунда с помощью иглы; *б* – гель-электрофорез результатов ПГА (1 % гель, 120 В, 1 ч, маркер – GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, США).

Получение эмбрионов. Было проведено пять аспираций яичников у 36 коров-доноров. В результате было получено 379 ОКК (ооцит-кумулюсный комплекс), из которых 322 было поставлено на IVM. Все ОКК после IVM были далее использованы на IVF. Из 322 ОКК после IVF было получено 100 эмбрионов, достигших стадии бластоцисты (7-й день развития эмбриона). После проведения качественного анализа 80 эмбрионов было перенесено в индивидуальные чашки Петри для дальнейшего проведения биопсии. При этом удалось получить биоптаты из 78 эмбрионов. Для всех них была проведена полногеномная амплификация ДНК (рис. 1).

Результаты генотипирования после ПГА. Средняя концентрация ДНК после проведения амплификации составляла 288.16 нг/мкл (минимальная 39.3 нг/мкл, максимальная 567.4 нг/мкл). Один из 78 образцов имел концентрацию меньше 50 нг/мкл. Концентрации ДНК после полногеномной амплификации ДНК сопоставимы с данными, полученными в подобных исследованиях (Polissen et al., 2010; Shojaei et al., 2014), и достаточны для проведения генотипирования на микроматрицах ДНК.

Генотипирование проводили на микроматрицах ДНК BovineSNP50 BeadChip V3 (Illumina, США). Все генотипы для 78 образцов были удовлетворительного качества (call rate образца > 95 %). Из 78 образцов биоптата 46 были определены как образцы мужского пола и 33 – как образцы женского пола. Распределение значений концентраций ДНК и качества генотипирования образцов показано на рис. 2.

Оценка носительства летальных гаплотипов. На первом этапе для всех 78 образцов биоптатов эмбрионов были проанализированы генотипы для поиска потенциальных носителей летальных гаплотипов. Присутствие носителей гаплотипов HH0 (брахиспина), HH5 и HCD ожидаемо с учетом того, что частота встречаемости этих гаплотипов в популяции выше, чем у остальных гаплотипов. Частота встречаемости гаплотипа HH0 (брахиспина) во французской популяции голштинского скота составляет 7.4 %. Частота встречаемости гаплотипа

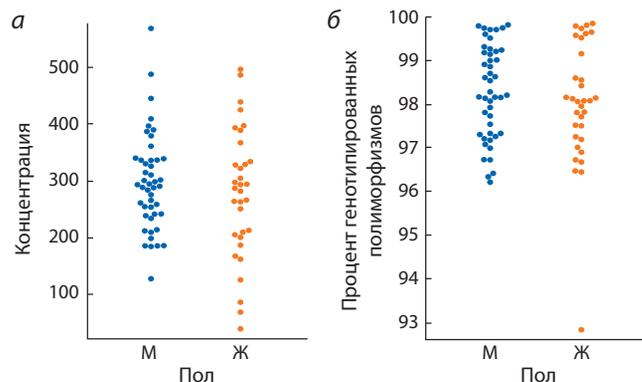


Рис. 2. Распределение значений концентраций ДНК и показателей генотипированных полиморфизмов (call rate).

a – концентрация ДНК образцов биоптата после проведения ПГА; *б* – качество генотипирования образцов биоптата после проведения ПГА.

HH5 – 3.9 % (Fritz et al., 2013), а гаплотипа HCD – 6.7 % в немецкой популяции голштинского скота (Schütz et al., 2016).

Среди 78 исследованных эмбрионов было обнаружено по одному носителю гаплотипов HH0, HH5 и HCD (бп14, бп5 и бп72 соответственно).

На втором этапе все носители летальных гаплотипов, по данным генотипирования на микроматрицах, были проанализированы на наличие казуальных мутаций, влияющих на потерю фертильности, с помощью ПЦР-анализа с последующим гель-электрофорезом. Это необходимо, так как зонды на микроматрице не содержат последовательностей ДНК для непосредственной детекции делеций, связанных с летальными гаплотипами (рис. 3).

Для подтверждения статуса носителя гаплотипа, но не казуальной мутации HCD, нами были проверены родители на носительство казуальной мутации. В качестве биологического материала были использованы волосаяной выщип матери (донора яйцеклеток) и сперма отца. Как и ожидалось, ни мать, ни отец не являлись носителями казуальной мутации (рис. 4).

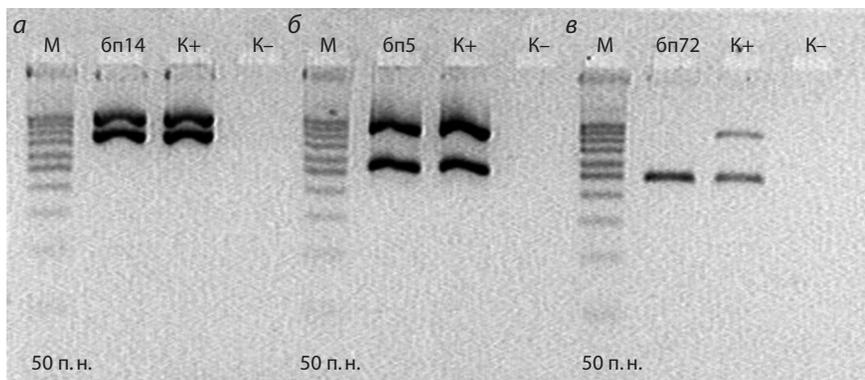


Рис. 3. Гель-электрофорез ПЦР продуктов ДНК носителей летальных гаплотипов, по данным генотипирования на микроматрице.

а – НН0 (брахиспина); б – НН5; в – НСD. М – маркер 50 п. н.; «К+» – положительный контроль; «К-» – отрицательный контроль; бп14, бп5 и бп72 – анализируемые образцы.

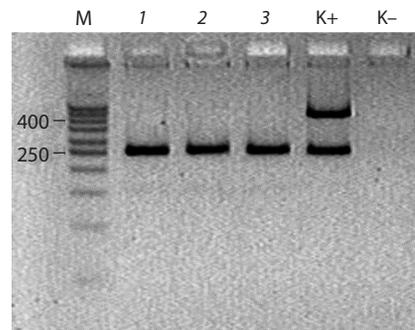


Рис. 4. Гель-электрофорез ПЦР продуктов на казуальную мутацию HCD.

1 – мать; 2 – отец; 3 – образец бп72. М – маркер 50 п. н., «К+» – положительный контроль; «К-» – отрицательный контроль.

После проведения генотипирования и анализа генотипов на наличие летальных гаплотипов образцы проверяли на наличие казуальных мутаций методом ПЦР (рис. 5).

Обсуждение

Для образцов, имеющих статус носителя казуальной мутации, по данным генотипирования на микроматрице, НН0 (брахиспина) и НН5, статус носительства подтвердился методом ПЦР. Для образца, имеющего статус носителя казуальной мутации, НСD, по данным генотипирования на микроматрице, статус носительства не подтвердился методом ПЦР (см. рис. 3).

Отсутствие казуальной мутации НСD у животного, являющегося носителем гаплотипа НСD, ожидаемо и не связано с низким качеством генотипирования (call rate генотипа составлял 96.7%). Широкомасштабные популяционные исследования показали, что животные, гомозиготные по гаплотипу НСD, могут как иметь нарушения синтеза холестерина, так и быть полностью здоровыми. Изучение происхождения таких животных показало, что предположительным родоначальником гаплотипа НСD является бык НОСАН000000334489 WILLOWHOLME MARK ANTHONY (год рождения – 1975), в то время как

казуальная мутация, связанная с появлением заболевания, возникла в этом гаплотипе уже у его потомка, быка НОСАН000005457798 MAUGHLIN STORM (год рождения – 1991). Таким образом, бык НОСАН000005457798 MAUGHLIN STORM считается родоначальником дефектного гаплотипа, и его потомки несут казуальную мутацию. Тогда как потомки быка НОСАН000000334489 WILLOWHOLME MARK ANTHONY, в роду у которых не встречался бык НОСАН000005457798 MAUGHLIN STORM, являются носителями гаплотипа НСD, но не казуальной мутации, вызывающей заболевание (Kipp et al., 2015; Duff et al., 2016).

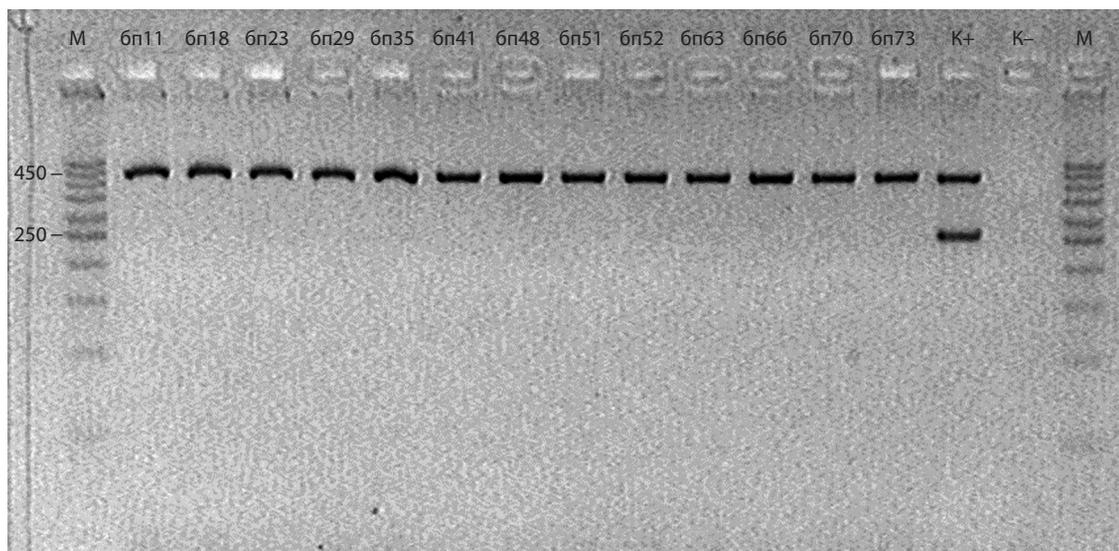


Рис. 5. Гель-электрофорез ПЦР продуктов из биопатов после постановки ПЦР на казуальную мутацию НН5.

бп11, бп18, бп23, бп29, бп35, бп41, бп48, бп51, бп52, бп63, бп66, бп70, бп73 – анализируемые образцы. М – маркер 50 п. н.; «К+» – положительный контроль; «К-» – отрицательный контроль. По результатам ПЦР-анализа, носители казуальной мутации НН5 не были выявлены.

Заключение

Наши результаты – высокая концентрация ДНК после полногеномной амплификации и хорошее качество генотипирования – говорят о возможности генетической оценки животного еще на стадии эмбриона. Достоверность результатов, полученных на основании анализа генотипа, подтверждается молекулярно-генетическим тестированием с помощью ПЦР-анализа казуальной мутации – классическим методом для определения статуса носительства животным моногенных заболеваний и летальных гаплотипов. Показанное в настоящей работе высокое качество генотипирования генетического материала эмбриона позволяет предположить возможность расчета геномной оценки племенной ценности на основании генотипов, полученных с использованием данной методики. Однако это утверждение требует проведения дальнейших исследований. Эмбрионы, от которых был взят и проанализирован генетический материал, были подсажены суррогатным матерям. После рождения животных планируются дальнейшие работы по проверке результатов анализа эмбрионов (пол, статус носительства моногенных заболеваний), проведение повторного генотипирования животных для сравнения генотипов из биоптата на этапе эмбриона и после рождения животного и расчет племенной ценности животных.

Список литературы / References

Дунин И.М., Аджибеков К.К., Лозовая Г.С., Чекушкин А.М. Красно-пестрая порода крупного рогатого скота и перспективы ее разведения. *Farm Animals*. 2013;1:56-61.
[Dunin I.M., Adzhibekov K.K., Lozovaya G.S., Chekushkin A.M. Red-pied of dairy cattle in Russia. *Farm Animals*. 2013;1:56-61. (in Russian)]

Дуров А.С., Гамарник Н.Г., Деева В.С. Оценка быков-производителей в популяции симментальской породы, разводимой в условиях Хакасии. *Вестн. Алт. гос. агр. ун-та*, 2013;1:79-85.
[Durov A.S., Gamarnik N.G., Deeva V.S. Assessment of stud bulls in the population of the Simmental breed bred in the conditions of Khakassia. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University*. 2013;1:79-85. (in Russian)]

Кузнецов В.М. Исторические тренды в молочном скотоводстве России и США. Киров: НИИСК Северо-Востока, 2015.
[Kuznetsov V.M. Historical Trends in Dairy Cattle Breeding in Russia and the USA. *Kirov: North-East Research Institute of Agriculture Publ.*, 2015. (in Russian)]

Тихонова Т.Н., Жаров И.Н., Никитина С.В. ..., Харитонов С.Н., Сацук В.Ф., Ковалюк Н.В. Генетические ресурсы ОАО «Московское» по племенной работе. 3-е изд., М. 2015;12.
[Tikhonova T.N., Zharov I.N., Nikitina S.V., ..., Kharitonov S.N., Satsuk V.F., Kovalyuk N.V. Genetic Resources of Moskovskoe Enterprise for Breeding Work. Third Edition. Moscow, 2015;12. (in Russian)]

Boichard D., Ducrocq V., Croiseau P., Fritz S. Genomic selection in domestic animals: Principles, applications and perspectives. *C. R. Biol.* 2016;339(7-8):274-277. DOI 10.1016/j.crv.2016.04.007.

Charlier C., Agerholm J.S., Coppeters W., Karlakov-Mortensen P., Li W., de Jong G., Fasquelle C., Karim L., Cirera S., Cambisano N., Ahariz N., Mullaart E., Georges M., Fredholm M. A deletion in the bovine FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. *PLoS One*. 2012;7(8):e43085. DOI 10.1371/journal.pone.0043085.

Duff J.P., Passant S., Wessels M., Charlier C., Hateley G., Irvine R.M. Cholesterol deficiency causing calf illthrift and diarrhoea. *Vet. Rec.* 2016;178:424-425. DOI 10.1136/vr.i2265.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2007; 4:381-427.

Fritz S., Capitan A., Djari A., Rodriguez S.C., Barbat A., Baur A., Grohs C., Weiss B., Boussaha M., Esquerré D., Klopp C., Rocha D., Boichard D. Detection of haplotypes associated with prenatal death in dairy cattle and identification of deleterious mutations in GART, SHBG and SLC37A2. *PLoS One*. 2013;8(6):e65550. DOI 10.1371/journal.pone.0065550.

Fritz S., Hoze C., Rebours E., Barbat A., Bizard M., Chamberlain A., Escoufflaire C., Vander Jagt C., Boussaha M., Grohs C., Allais-Bonnet A., Philippe M., Vallée A., Amigues Y., Hayes B.J., Boichard D., Capitan A. An initiator codon mutation in SDE2 causes recessive embryonic lethality in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 2018;101:1-12. Pubmed reference: 29680649. DOI 10.3168/jds.2017-14119.

Kipp S., Segelke D., Schierenbeck S., Reinhardt F., Reents R., Wurmsler C., Pausch H., Fries R., Thaller G., Tetens J., Pott J., Piechotta M., Grünberg W. A new Holstein haplotype affecting calf survival. *Interbull Bull.* 2015;49:49-53.

Ma L., Cole J.B., Da Y., VanRaden P.M. Symposium review: Genetics, genome-wide association study, and genetic improvement of dairy fertility traits. *J. Dairy Sci.* 2018 Sep. 26. pii: S0022-0302(18)30906-8. DOI 10.3168/jds.2018-15269.

Menzi F., Besuchet-Schmutz N., Fragnière M., Hofstetter S., Jagannathan V., Mock T., Raemy A., Studer E., Mehinagic K., Regenscheit N., Meylan M., Schmitz-Hsu F., Drögemüller C. A transposable element insertion in APOB causes cholesterol deficiency in Holstein cattle. *Anim. Genet.* 2016;47(2):253-257. DOI 10.1111/age.12410.

Polissen J., Sá W.F., Guerra Mde O., Machado M.A., Serapião R.V., Carvalho B.C., Camargo L.S., Peters V.M. Post-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Fertil. Steril.* 2010;93(3):783-788. DOI 10.1016/j.fertnstert.2008.10.023.

Schütz E., Wehrhahn C., Wanjek M., Bortfeld R., Wemheuer W.E., Beck J., Brenig B. Correction: 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. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157618. DOI 10.1371/journal.pone.0157618.

Shojaei Saadi H.A., Vigneault C., Sargolzaei M., Gagné D., Fournier É., de Montera B., Chesnais J., Blondin P., Robert C. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. *BMC Genomics*. 2014;15:889. DOI 10.1186/1471-2164-15-889.

VanRaden P.M., Olson K.M., Null D.J., Hutchison J.L. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J. Dairy Sci.* 2011;94(12):6153-6161. DOI 10.3168/jds.2011-4624.

ORCID ID

K.S. Pantikh orcid.org/0000-0002-2595-0673
I.V. Rukin orcid.org/0000-0003-4093-3254
S.M. Portnov orcid.org/0000-0001-9192-6164

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации проекта по Соглашению № 14.579.21.0147 о предоставлении субсидии (уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEFI57917X0147).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.12.2018. После доработки 28.03.2019. Принята к публикации 19.04.2019.