

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА МАННОЗА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЛЕКТИНА 1 (MBL₁) В ПОПУЛЯЦИИ ГОЛШТИНСКОГО СКОТА РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

САФИНА Наталья Юрьевна, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
ФИЦ КазНЦ РАН

ЗИННАТОВА Фарида Фаттыховна, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
ФИЦ КазНЦ РАН

ШАКИРОВ Шамиль Касымович, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
ФИЦ КазНЦ РАН

ГАЙНУТДИНОВА Эльза Равилевна, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
ФИЦ КазНЦ РАН

ФАГТАХОВА Зилия Фидаилевна, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
ФИЦ КазНЦ РАН

В последние годы растет интерес к использованию генетических методов для создания более устойчивого к болезням поголовья сельскохозяйственных животных. В таких исследованиях ген манноза-связывающего лектина 1 (MBL₁) является одним из перспективных генов из-за его важной роли в иммунной системе. Исследование было направлено на изучение полиморфизма (с.2569 T > C) гена MBL₁- Haе III методом ПЦР-ПДРФ в популяции голштинского скота Республики Татарстан. В ходе ДНК-диагностики 1059 голов коров СХПК «ПЗ им. Ленина» Атнинского района были идентифицированы аллели С (0,637) и Т (0,363) и генотипы – СС (42,3%), ТС (42,8%) и ТТ (14,9%). Вариабельность между наблюдаемым и ожидаемым распределением генотипов составила 5,98. Тестирование методом хи-квадрат показало, что генетическое равновесие в исследуемой популяции не нарушено. Анализ генетической структуры различных популяций и пород крупного рогатого скота демонстрирует изменения частоты встречаемости того или другого генотипа в зависимости от породы. Результаты, полученные в исследовании, дают важную информацию, которая может быть использована в будущих программах разведения и селекции с помощью маркеров для групп крупного рогатого скота голштинской породы, устойчивого к заболеваниям.

Введение. Инфекционные болезни являются одним из основных источников заболеваемости, смертности и экономических потерь в животноводстве. Подход к управлению воздействия инфекционного заболевания традиционно заключается в контроле за патогеном, в значительной степени игнорируя потенциальный вклад иммунологически дефицитного хозяина [12]. Однако с развитием ДНК-технологий сфера внимания расширилась, в нее были включены генетические факторы хозяина, которые способствуют восприимчивости к инфекционным заболеваниям [6]. В последнее время широкое распространение получил подход, основанный на улучшении генетической устойчивости посредством селекции по молекулярным маркерам [19].

Мастит – это воспалительное и сложное заболевание молочной железы, которое остается наиболее распространенным. Оно связано с продуктивностью животных и является причиной снижения надоев и качества молока, сокращения продолжительности лактации и ранней выбраковки [2, 3]. Наиболее частыми причинами мастита являются интрамаммарные инфекции, вызванные такими экзогенными или заразными патогенными бактериями, как *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* [11].

Врожденная иммунная система представляет собой первую линию защиты от инфекционных заболеваний. Коллагеновые лектины представляют собой подмножество мембраносвязанных и растворимых циркулирующих лектинов С-типа, которые функционируют как паттерн-распознающие рецепторы (PRR), опознавая остатки углеводов на поверхности бакте-

рий, вирусов и грибов [9]. Семейство коллагеновых лектинов включает в себя коллектины и фиколины, которые имеют общие структурные и функциональные сходства. У *Bos taurus* было выявлено 11 генов коллагеновых лектинов, включая гены, кодирующие манноза-связывающие лектины (MBL₁ и MBL₂). Они идентифицируются у крупного рогатого скота и некоторых травоядных [6, 8].

MBL₁ (манноза-связывающий лектин 1) является центральным звеном в ответной реакции врожденного иммунитета [14]. Это лектин сыворотки С-типа, продуцируемый печенью, выступает как реагент острой фазы [15]. MBL связывает поверхностные углеводы микробов и напрямую опосредует опсонофагоцитоз, активизирует путь лектинового компонента, а также связывает большое количество клинических изолятов бактерий, грибов, вирусов и паразитов [11, 13].

Ген *bovine* манноза-связывающего лектина 1 локализован на хромосоме 28, содержит четыре интрона и пять экзонов, кодирующих белок из 248 аминокислотных остатков [7].

С помощью методов секвенирования ДНК, ПЦР-ПДРФ (с.1252G>A – Ava II и с.2569T>C – Haе III) и CRS-ПЦР (с.2534G>A – Mae II) Liu et al. 2011 были идентифицированы 3 SNP гена MBL₁ крупного рогатого скота (контрольные последовательности GenBank No. AC_000185.1, NM_00110994.2 и NP_001010994.1) [10]. Однонуклеотидный полиморфизм (с.2569T > C) был идентифицирован во втором экзоне гена MBL₁ [17]. Эта миссенс-мутация в экзоне 2 и мутация в области промотора гена MBL₁ одинаково связаны как с изменениями классического пути активации компонента, так и с оценкой количества соматических кле-



ток (SCS) – показателем содержания воспалительных клеток в молоке и индикатором мастита [10, 17, 18].

Цель данной работы – изучение полиморфизма гена MBL1 (манноза-связывающего лектина 1) в популяции голштинского скота, выращенного в Республике Татарстан.

Методика исследований. Исследования проводили на племенном поголовье голштинского скота местной селекции СХПК «ПЗ им. Ленина» Атнинского района Республики Татарстан. В ходе опыта было отобрано 1059 проб биологического материала от полновозрастных коров и телок случного возраста. Молекулярно-генетические опыты выполняли в лаборатории отдела агробиологических исследований ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН.

Выделение ДНК из образцов цельной крови осуществляли посредством комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ИнтерЛабСервис, Россия). Амплификация очищенной ДНК в составе реакционной смеси конечным объемом 20 мкл, содержащей деионизированную H_2O , TaqDNA-полимеразу и поставляемый с ней SE-буфер, dNTPs и пара олигонуклеотидных праймеров с последовательностью: MBL1f:5'-GTGGTGCAAATGTTGGCTAAAC - 3' и MBL1r:5'-TGGCTCTCCSTTTTCTCCSTT - 3' (СибЭнзим, Россия), проводилась на программируемых термоциклерах T100 Thermal Cycler и My Cycler (Bio-RAD, США) [18]. Для реакции были подобраны оптимальные температурно-временные режимы: предварительная денатурация при 95 °C в течение 3 мин, денатурация при 95 °C в течение 30 с, отжиг при 63 °C в течение 45 с, элонгация при 72 °C в течение 45 с; финальная элонгация при 72 °C в течение 5 мин.

Ампликоны для выявления изучаемого полиморфизма обрабатывали эндонуклеазой рестрикции, полученной из штамма *E. coli*, несущего клонированный ген *Hae III* из *Haemophilus aegyptius* в течение 16 ч (ночи) при температуре 37 °C (табл. 1) в суховоздушном термостате Hotline (BLINDER, Китай). Для выявления полиморфизма гена MBL1 (с.2569 T > C) конечные фрагменты ПЦР-ПДРФ подвергались электрофоретическому разделению в агарозном геле (2,6 %) в присутствии бромида этидиума.

Визуализация, видеофиксация и документирование полученных результатов идентификации осуществлялись при помощи геля документирующей системы (Bio-Rad, США).

Частоту встречаемости аллелей и генотипов рассчитывали согласно методическим рекомендациям по биометрии в селекции и генетике [4]. Для определения генетического равновесия в исследуемой популяции согласно закону Харди-Вайнберга использовали метод хи-квадрата Пирсона.

Результаты исследований. В конечном итоге ДНК-тестирования SNP 2569T > C методом ПЦР был

получен цельный фрагмент 255 п.о., последующая рестрикция которого ферментом *Hae III* позволила идентифицировать у опытных животных 3 генотипа (табл. 2).

Генотипирование показало, что в популяции голштинского скота СХПК «ПЗ им. Ленина» преобладают носители гетерозиготного генотипа ТС – 42,8 % от общего поголовья. Немного меньше особей с генотипом СС – 42,3 % и небольшая группа (14,9 %) гомозиготных ТТ-животных. Частота встречаемости аллелей С и Т составила 0,637 и 0,363 соответственно.

Тестирование методом хи-квадрат установило, что генетическое равновесие в исследуемой популяции не нарушено. Вариабельность между наблюдаемым и ожидаемым распределением генотипов составила 5,98, что ниже критического значения ($\chi^2_{крит} = 5,99; p < 0,05$). В ожидаемом (экспериментальном) распределении генотипов прослеживается тенденция в сторону нарастания гетерозиготности на 7,6 % по сравнению с наблюдаемым количеством голов.

Ранние исследования гена MBL1 среди различных популяций голштинского скота имеют довольно противоречивые сведения, полученные в ходе идентификации полиморфизма 2569 T > C, о вариабельности аллелей и генотипов. X. Wang и др. установили в оцениваемом поголовье наивысшую, описанную в литературе, частоту встречаемости аллеля Т равную 0,986 и минимальную для аллеля С – 0,014 [17]. Также высокие значения аллеля Т были в результатах генотипирования голштинского скота у Z. Zhao и др. и Z. Yuan и др. – 0,797 и 0,668 соответственно [18, 20]. Отечественные авторы зафиксировали данные, схожие с нашими относительно распределения аллелей. По сообщению Л. Абдуллиной и др., частота встречаемости для аллеля С была равна 0,630, а для аллеля Т – 0,370 [1]. Преобладание аллеля С (0,570) над аллелем Т (0,430) также отмечалось в работе С. Wang и др., проводивших ДНК-детекцию китайской популяции голштинского скота [16].

В разрезе различных пород крупного рогатого скота, как местных аборигенных, так и привозных, в целом наблюдается незначительный перевес в сторону аллеля С (0,520) по сравнению с аллелем Т (0,480) на 7,7 %.

Анализ генетической структуры различных популяций и пород крупного рогатого скота, представленный на рисунке, наглядно демонстрирует, что в зависимости от породы изменяется частота встречаемости того или другого генотипа. В популяции китайского скота желтый люкси отсутствуют особи с гомозиготным генотипом ТТ [10, 16]. Также менее 20 животных пород турецкий серый, бурый швейцарский, бохайский черный являются носителями этого генотипа в локусе MBL1-*Hae III* [5]. Однако скот сахнэ характеризуется большим количеством гомозиготных ТТ-

Таблица 1

Фрагменты, получаемые в ходе ПЦР-ПДРФ-анализа

Изучаемый полиморфизм	ПЦР-фрагмент	Эндонуклеаза рестрикции	Сайт узнавания	ПДРФ-фрагменты
с.2569T > C (экзон II)	255	<i>Hae III</i>	GG↑CC CC↓GG	СС - 255 ТС - 255, 178, 77 ТТ - 178, 77



Частота встречаемости аллелей и генотипов гена MBL1 (n = 1059)

Распределение	Генотип						Аллель		χ^2
	СС		ТС		ТТ		С	Т	
	n	%	n	%	n	%			
Наблюдаемое	448	42,3	453	42,8	158	14,9	0,637	0,363	5,98
Ожидаемое	429	40,6	490	46,3	140	13,2			

особей, насчитывающих 41,8 % в поголовье этой породы [18]. По всем остальным породам крупного рогатого скота, за исключением бохайского черного, численный перевес находится на стороне гетерозиготных животных, имеющих генотип ТС – от 35,0 до 58,0 % от общего поголовья исследуемых популяций [10, 16].

У южно-анатолийского красного скота генотип СС встречается с частотой 11,0 %, что на 37,0 и 30,0 % реже частоты генотипов ТС и ТТ соответственно. В популяции восточно-анатолийского скота наблюдается увеличение числа СС-особей до 38,0 % [5].

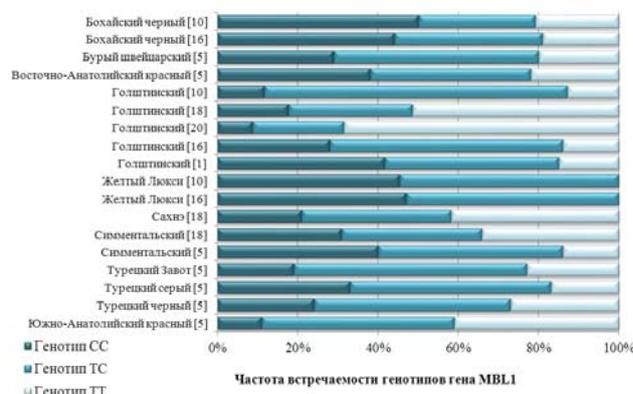
Закключение. Вариабельность генов врожденного иммунитета может существенно повлиять на резистентность животных к инфекционным заболеваниям. Ген манноза-связывающий лектин 1 (MBL1) является многообещающим косвенным маркером для улучшения характеристик устойчивости к маститу у молочного скота.

Проведенное исследование свидетельствует о том, что изучаемая популяция голштинского скота Республики Татарстан является полиморфной по гену манноза-связывающего лектина 1. Полиморфизм этого гена требует дальнейшего изучения как на уровне частот аллелей и генотипов в различных популяциях и породах крупного рогатого скота, так и с точки зрения его биологических механизмов действия во взаимосвязи с восприимчивостью к болезням.

Статья подготовлена в рамках государственного задания: Мобилизация генетических ресурсов растений и животных, создание новаций, обеспечивающих производство биологически ценных продуктов питания с максимальной безопасностью для здоровья человека и окружающей среды. Номер регистрации: АААА-А18-118031390148-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдуллина Л.В., Юсупова Г.Р. Ген манноза-связывающего лектина (MBL) и влияние его полиморфизма на устойчивость коров к маститу // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2019. – Т. 238 (II). – С. 4–9.
- Анализ полиморфизма гена лактоферрина (LTF) в популяциях голштинского скота / Н.Ю. Сафина [и др.] // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2019. – № 2. – С. 88–94.
- К вопросу влияния субклинического мастита на качество молочной продукции // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством: сб. науч. тр. / Е.Г. Лазарева [и др.]. – М.: ВНИМИ, 2020. – Вып. 1. – С. 331–336.
- Меркурева Е.К., Шангин-Березовский Г.Н. Генетика с основами биометрии. – М.: Колос, 1983. – 400 с.
- Aksel E.G., Arslan K., zdemir F., Aky z B. Investigation of MBL-1 gene polymorphism in some cattle breeds raised in Turkey // Mediterranean Agricultural Sciences., 2019, No. 32(1), P. 25–30.



Распределение генотипов гена MBL1 в разных породах крупного рогатого скота

6. Fraser R.S., Lumsden J.S., Lillie B.N. Identification of polymorphisms in the bovine collagenous lectins and their association with infectious diseases in cattle // Immunogenetics, 2018, No. 70, P. 533–546.

7. Gjerstorff M., Hansen S., Jensen B., Dueholm B., Horn P., Bendixen C., Holmskov U. The genes encoding bovine SP-A, SP-D, MBL-A, conglutinin, CL-43 and CL-46 form a distinct collectin locus on Bos taurus chromosome 28 (BTA28) at position q.1.8-1.9 // Anim Genet., 2004, No. 35, P. 333–337.

8. Hansen S., Holmskov U. Lung surfactant protein D (SP-D) and the molecular diverged descendants: conglutinin, CL-43 and CL-46 // Immunobiology, 2002, No. 205, P. 498–517.

9. Janeway C.A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology // Cold Spring Harb Symp Quant Biol., 1989, No. 54 (Pt 1), P. 1–13.

10. Liu J., Ju Z., Li Q., Huang J., Li R., Li J., Ma L., Zhong J., Wang C. Mannose-binding lectin 1 haplotypes influence serum MBL-A concentration, complement activity, and milk production traits in Chinese Holstein cattle // Immunogenetics, 2011, No. 63, P. 727–742.

11. Mason C. Basic mastitis bacteriology: untangling the pathogens // Irish Veterinary Journal, 2006, No. 59, P. 453–459.

12. Miles D.G. Overview of the North American beef cattle industry and the incidence of bovine respiratory disease (BRD) // Anim Health Res Rev., 2009, No. 10, P. 101–103. Htt

13. Neth O., Jack D.L., Dodds A.W., Holzel H., Klein N.J., Turner M.W. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition // Infect Immun., 2000, No. 68, P. 688–693.

14. Super M., Thiel S., Lu J., Levinsky R.J., Turner M.W. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation // Lancet., 1989, No. 2, P. 1236–1239.

15. Thiel S., Holmskov U., Hviid L., Laursen S.B., Jensenius J.C. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response // Clin Exp Immunol., 1992, No. 90, P. 31–35.

16. Wang C., Liu M., Li Q., Ju Z., Huang J., Li J., Wang H., Zhong J. Three novel single-nucleotide polymorphisms of MBL1 gene in Chinese native cattle and their associations with milk performance traits // Veterinary Immunology and Immunopathology, 2011, No. 139, P. 229–236.

17. Wang X., Ju Z., Huang J., Hou M., Zhou L., Qi C.,



Zhang Y., Gao Q., Pan Q., Li G., Zhong J., Wang C. The relationship between the variants of the bovine MBL2 gene and milk production traits, mastitis, serum MBL-C levels and complement activity // *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2012, No. 148, P. 311–319.

18. Yuan Z., Li J., Li J., Gao X., Xu S. SNPs identification and its correlation analysis with milk somatic cell score in bovine MBL1 gene // *Mol Biol Rep.*, 2013, No. 40, P. 7–12.

19. Zhang H., Wei Y., Zhang F., Liu Y., Li Y., Li G., Han B., Wang H., Zhao W., Wang C. Polymorphisms of MASP2 gene and its relationship with mastitis and milk production in Chinese Holstein cattle // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2019, P. 1–8.

20. Zhao Z.L., Wang C.F., Li Q.L., Ju Z.H., Huang J.M., Li J.B., Zhong J.F. and Zhang J.B. Novel SNPs of the mannan-binding lectin 2 gene and their association with production traits in Chinese Holsteins // *Genetics and Molecular Research.*, 2012, No. 11 (4), P. 3744–3754.

Сафина Наталья Юрьевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.

Зиннатова Фарида Фаттыховна, канд. биол. наук, зам. руководителя по науке, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.

Шакиров Шамиль Касымович, д-р с.-х. наук, проф., главный научный сотрудник, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.

Гайнутдинова Эльза Равилевна, младший научный сотрудник, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.

Фаттахова Зиля Фидаилевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства ФИЦ КазНЦ РАН. Россия.

420059, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, 48.
Тел.: (843) 277-18-17.

Ключевые слова: ген; генотип; полиморфизм; манноза-связывающий лектин 1 (MBL1); мастит; крупный розатый скот.

POLYMORPHISM OF MBL1 GENE IN HOLSTEIN CATTLE OF REPUBLIC OF TATARSTAN

Safina Natalia Yurevna, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Tatar Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Russia.

Zinnatova Farida Fattihovna, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Tatar Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Russia.

Shakirov Shamil Kasimovich, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Chief Researcher, Tatar Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Russia.

Gaynutdinova Elza Ravilevna, Junior Researcher, Tatar Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Russia.

Fattakhova Zilya Fidailevna, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Tatar Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Russia.

Keywords: gene; genotype; polymorphism; mannose-binding lectin 1 (MBL); mastitis; cattle.

In recent years, there has been a growing interest in using genetic techniques to create more disease-resistant livestock herds. In such studies, the mannose-binding lectin 1 (MBL1) gene is one of the promising genes because of its important role in the immune system. The study was aimed at studying the polymorphism (p. 2569 T> C) of the MBL1-Hae III gene by PCR-RFLP in the Holstein cattle population of the Republic of Tatarstan. In the course of DNA diagnostics 1059 cows of Integrated Agricultural Production Centre "Stud farm named after Lenin" of the Atninsky district were identified alleles C (0.637) and T (0.363), and genotypes CC (42.3%), TC (42.8%) and TT (14.9%). The variability between the observed and expected distribution of genotypes was 5.98. Chi-square testing found that the genetic balance in the study population was not disturbed. Analysis of the genetic structure of various populations and breeds of cattle demonstrates that, depending on the breed, the frequency of occurrence of one or another genotype changes. The results obtained in the study provide important information that can be used in future breeding and breeding programs using markers for groups of Holstein cattle resistant to diseases.

