РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 842 541** (13) **C1**

(51) МПК
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/68 (2025.01); C12Q 1/6876 (2025.01)

(21)(22) Заявка: **2024125745, 03.09.2024**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.09.2024

Дата регистрации:
30.06.2025

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **03.09.2024**

(45) Опубликовано: **30.06.2025** Бюл. № **19**

Адрес для переписки:
420029, Респ. Татарстан, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35, ФГБОУ ВО Казанская государственная академия ветеринарной медицины, Равилов Рустам Хаметович

(72) Автор(ы):
Зиннатов Фарит Фатихович (RU),
Якупов Талгат Равилович (RU),
Ахметов Тахир Мунавирович (RU),
Равилов Рустам Хаметович (RU),
Волков Ренат Алиевич (RU),
Хисамов Рифат Ринатович (RU),
Садыков Нияз Фидаилевич (RU),
Николаева Карина Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Пестис В.К. и др. Применение ДНК-тестирования крупного рогатого скота по генам LTF и MBL1 для повышения эффективности производства молока. Доклады Национальной академии наук Беларуси, 2022, т. 66, N1, с. 122-128. Абдуллина Л.В. Юсупова Г.Р. Ген манноза-связывающего лектина (MBL), и влияние его полиморфизма на устойчивость коров к маститу. Ученые** (см. прод.)

(54) СПОСОБ ОТБОРА ДОЙНЫХ КОРОВ ПО КОМПЛЕКСНЫМ ГЕНОТИПАМ ГЕНОВ LTF И MBL1, ЗАДЕЙСТВОВАННЫХ В УСТОЙЧИВОСТИ К ВОЗНИКНОВЕНИЮ МАСТИТА, С ПОМОЩЬЮ ПЦР-ПДРФ АНАЛИЗА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описан способ отбора дойных коров-первотелок голштинской породы по комплексному генотипу генов *LTF* и *MBL1*, задействованных в устойчивости к возникновению мастита, с помощью ПЦР-ПДРФ анализа. Способ включает выделение ДНК из проб крови, амплификацию с использованием праймеров, рестрикционный анализ ампликонов, установление и отбор коров путём выявления сочетания комплексного генотипа $LTF^{AB}MBL1^{CC}$. Технический результат заключается в отборе дойных коров по комплексному генотипу генов *LTF* и *MBL1* с помощью ПЦР-ПДРФ анализа. 2 ил., 7 табл.

RU 2842541 C1

RU 2842541 C1

(56) (продолжение):
записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, 2019, т. 238, N2, с. 4-9. Сафина Н.Ю. и др. Характеристика молочной продуктивности и качественного состава молока голштинского скота с разными генотипами гена лактоферрин (LTF). Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, 2018, т. 236, N4, с. 164-169. RU 2673746 C1, 29.11.2018.

RU 2842541 C1

RU 2842541 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 842 541** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12Q 1/68 (2025.01); C12Q 1/6876 (2025.01)

(21)(22) Application: **2024125745, 03.09.2024**

(24) Effective date for property rights:
03.09.2024

Registration date:
30.06.2025

Priority:
(22) Date of filing: **03.09.2024**

(45) Date of publication: **30.06.2025** Bull. № **19**

Mail address:
420029, Resp. Tatarstan, g. Kazan, ul. Sibirskij trakt, 35, FGBOU VO Kazanskaya gosudarstvennaya akademiya veterinarnoj meditsiny, Ravilov Rustam Khametovich

(72) Inventor(s):
Zinnatov Farit Fatikhovich (RU),
Iakupov Talgat Ravilovich (RU),
Akhmetov Takhir Munavirovich (RU),
Ravilov Rustam Khametovich (RU),
Volkov Renat Alievich (RU),
Khisamov Rifat Rinatovich (RU),
Sadykov Niiaz Fidailevich (RU),
Nikolaeva Karina Iurevna (RU)

(73) Proprietor(s):
Federalnoe gosudarstvennoe biudzhetnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniia "Kazanskaia gosudarstvennaia akademiia veterinarnoi meditsiny imeni N.E. Baumana" (RU) (RU)

(54) METHOD OF MILKING COWS SELECTION BY COMPLEX GENOTYPES OF LTF AND MBL1 GENES INVOLVED IN RESISTANCE TO MASTITIS, USING PCR-RFLP ANALYSIS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: described is a method of selecting dairy cows-heifers of Holstein breed based on complex genotype of *LTF* and *MBL1* genes, involved in resistance to mastitis, using PCR-RFLP analysis. Method includes DNA recovery from blood samples, amplification using primers, restriction analysis of amplicons, establishment and selection of cows by identifying a combination of $LTF^{AB}MBL1^{CC}$ complex genotype.

EFFECT: selection of milking cows by complex genotype of *LTF* and *MBL1* genes by means of PCR-RFLP analysis.

1 cl, 2 dwg, 7 tbl

RU 2842541 C1

RU 2842541 C1

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способу повышения качества молока и молочной продуктивности, а также для снижения случаев маститов при отборе животных, повышения экономической эффективности и рентабельности молочного скотоводства, путем снижения затрат на лечение животных от мастита, тем самым улучшая качество молока, состояние животных и здоровье людей.

Предлагаемое изобретение направлено на повышение экономической эффективности и рентабельности ведения молочного скотоводства путем отбора дойных коров методом ДНК-тестирования по комплексным генотипам генов *LTF* и *MBL1* задействованных в устойчивости к возникновению мастита, что приведет к увеличению количества животных имеющих более высокие показатели устойчивости к маститу, повышению качества молока и молочной продуктивности.

Главной задачей молочного скотоводства является получение молока высокого качества, которое зависит от состояния здоровья коров. Молоко является одним из полноценных продуктов питания, занимает одно из главных мест среди продуктов питания человека. Оно сбалансировано по соотношению белков, жиров, органических и неорганических солей, молочных сахаров и др. Составляющие молока усваиваются организмом на 95-98%. Данный продукт является не только продуктом питания, но и сырьем для выпуска огромного ассортимента, как молочной, так и других отраслей промышленности.

Молочное направление считается главной из отраслей животноводства на территории Российской Федерации. Одним самым распространенным и проблемным заболеванием в данном направлении животноводства является мастит. Мастит коров - воспаление молочной железы, связанное с инфицированием микроорганизмами вымени у коров. Возбудителем этого заболевания являются микроорганизмы: *Streptococcus agalactiae*, *St. uberis*, *St. Disgalactia*, *St. aureus*. Заболевание характеризуется патологическими изменениями в тканях и в секрете молочной железы, при попадании инфекции через сосок в вымя животного. Мастит является причиной уменьшения уровня молочной продуктивности. По статистике, известно, что только в 8% случаях поражаются одновременно 3-4 доли вымени, и 92% это поражение 1-2 долей вымени. Главный ущерб приносит субклинический мастит, так как он проходит без каких либо видимых признаков. Данное заболевание является одним из самых убыточных для экономики молочного животноводства.

Заболевание вымени у коров является одним из самых распространенных. Возникает досрочная выбраковка высокопродуктивных коров, полученные средства от передачи животных на скотобойню не покрывают трат на содержание и выращивание. Таким образом, производитель недополучает молоко и высокопродуктивного потомства, тем самым несет большие затраты на диагностику, лечение. Это заболевание, которое наносит колоссальный экономический ущерб сельскому хозяйству. По статистике известно, что из всего количества выбракованных животных - 25% коров от общего дойного стада болеют маститом различной формы. Хозяйства несут экономические потери в виде расходов на лечение, недополучение молока. Данное заболевание несет экономический и социальный вред, так как патогенные микроорганизмы присутствующие в молоке, могут вызывать заболевания у людей.

Главный показатель здорового вымени является уровень соматических клеток в молоке. Эти клетки всегда присутствуют в молоке, но количество клеток зависит от многих факторов. Их содержание составляет 60-70% от общего количества, так как происходит постоянное обновление эпителиальных тканей, старые клетки отмирают и попадают в молоко. К ним добавляются лейкоциты, которые выполняют защитные

функции в организме. Содержание в молоке соматических клеток является индикатором бактериальной обсемененности при приеме на молокоперерабатывающие предприятия. Повышение количества соматических клеток на 1 мл секрета молока выше нормы, говорит о заболевании молочной железы одной из форм мастита, и о присутствии в нем патогенной микрофлоры. Уровень соматических клеток зависит от индивидуальных особенностей коровы, у здоровых коров данный показатель колеблется от 10000 до 100000 в 1 $см^3$. Соматические клетки в молоке связаны с воспалительным процессом, и являются хорошей диагностикой для раннего выявления как субклинического, так и клинического мастита.

Молоко от больных маститом коров изменяет свои физико-химические показатели вследствие протекающих воспалительных процессов в молочной железе под влиянием жизнедеятельности микроорганизмов. При изменении органолептических и физико-химических свойств, молоко, полученное от маститных коров, становится голубоватым иногда желтоватым, запах становится неприятным, вкус прогорклый, часто может быть консистенция водянистая или слизистая. Рост инфекции в молочной железе и увеличение количества соматических клеток приводит к нарушению секреции молока, снижается кислотность молока, увеличивается pH, уменьшается плотность и вязкость молока, увеличивается массовая доля белка и его электропроводность. Также снижается содержание кальция и фосфора в молоке на 25%, а содержание натрия и хлора увеличивается на 25-30%. Таким образом, снижается качество молочных продуктов.

Биологическая ценность и качество молока тесно связана с ее показателями, как физико-химическими, так и органолептическими. Важным показателем является количество соматических клеток. В норме у здоровых коров в молоке содержится от 100 до 500 тыс./мл соматических клеток. Когда их количество увеличивается, то молоко считается некачественным. Большое количество соматических клеток, можно наблюдать в первые дни после отела, в стародойном молоке, в молоке с молозивом или в сухостойный период или же при заболевании коров маститом. Несмотря на это, низкое содержание соматических клеток в молоке также не является нормой, может свидетельствовать о том, что молоко фальсифицировано.

При оценке молока, согласно ветеринарно-санитарным правилам, полученное молоко от больных клиническим маститом коров подлежит кипячению с последующей утилизацией. Если заболевание ограничено на 1-2 долях вымени, тогда утилизируют молоко, полученное из пораженных частей молочной железы. Из здоровых долей вымени, молоко кипятят и используют для корма животным.

В первую очередь при поражении молочной железы возрастает количество вредоносных бактерий, молоко становится насыщенным болезнетворной микрофлорой. Патогенные микроорганизмы и их токсины, содержащиеся в молоке, являются причиной заболеваний у человека. Некоторые случаи отравления могут привести к летальному исходу.

Большинство патогенных микроорганизмов являются термоустойчивыми, поэтому в процессе технологической обработки молока невозможно уничтожить в нем присутствующие токсины и споровую микрофлору.

Таким образом, исследование молока на содержание соматических клеток считается главной процедурой, как на фермах, так и на молокоперерабатывающих предприятиях. Качество и количество получаемого молока во многом зависит от технологии содержания, кормления, доения, а также генетического потенциала животных.

Современная молекулярная генетика позволяет определять гены, которые контролируют хозяйственно-полезные признаки. Преимущество ДНК-технологий

заключается в том, что можно установить генотип животного независимо от пола, возраста и уровня функционирования организма и его систем, это позволяет повысить эффективность селекционно-племенной работы и соответственно уровень животноводческой продукции. Главное условие увеличения производства молока и роста эффективности молочного скотоводства это качественное совершенствование породы и наращивание генетического потенциала продуктивности. Ускорить данный процесс позволяет совершенствование и внедрение в животноводческую практику методов молекулярной биологии.

ДНК - технологии позволяют использовать результаты исследований для составления селекционно-племенных программ в племенных хозяйствах и предприятиях для сохранения ценных комбинаций генов и совершенствование имеющегося генофонда. Нахождение в стадах животных, которые несут в своем геноме желательные аллельные варианты генов-кандидатов хозяйственно - полезных признаков, это приведет к увеличению молочной продуктивности, а также повысит желательные качества животных.

Генетические маркеры - это последовательность нуклеотидов ДНК, для определения гена или другого участка хромосом. Использование генетических маркеров в животноводстве позволяет более точно оценивать генетический потенциал популяций, пород, отдельно взятых особей, их линий, есть возможность корректировать их направленность.

В качестве потенциальных генов-кандидатов, которые связаны с показателями продуктивности, а также связаны с изменениями количественного содержания соматических клеток в молоке, и соответственно, с устойчивостью к маститу у крупного рогатого скота, могут рассматриваться аллели гена лактоферрина (*LTF*) и маннозосвязывающего лектина (*MBL1*).

Лактоферрин (от лат. Lac (*lactis*) - молоко и *ferrum* - железо) - относится к семейству трансферрина и является железосвязывающим гликопротеином. Факторами защиты молочной железы от инфекции являются система лактопероксидазы, лизоцим, полиморфноядерные лейкоциты, лактоферрин, система комплемента. Лактоферрин (*LTF*) обладает широким спектром противомикробного действия в молоке.

Это многофункциональный протеин, который стимулирует рост лимфоцитов, играет большую роль в регуляции абсорбции железа, также обладает противогрибковыми, антибактериальными, антиоксидантными, антивирусными, противопаразитическими, регенеративными свойствами. Кроме того, он обладает каталитическим эффектом в некоторых ферментативных реакциях. Также может принимать участие во внутриклеточном разрушении бактерий, путем индуцирования образования гидроксильных радикалов, который катализируется железом.

Лактоферрин появляется в инфицированных областях в связи с его способностью к локальному синтезу. Например, инфекция молочной железы может привести к 30-кратному увеличению лактоферрина в данной области. В норме концентрация лактоферрина составляет от 20-200 мкг/мл. Лактоферрин к тому же стимулирует иммунную систему и служит природным антиоксидантом, принимает активное участие в модуляции и регуляции макрофагов, лимфоцитов и нейтрофилов. Это свойство является одним из главных факторов, в предотвращении заболеваемостью маститом у коров.

Впервые, лактоферрин был идентифицирован и зарегистрирован в 1939 году в молочной сыворотке. Это предположило возможность стать геном-кандидатом устойчивости коров против инфекций молочной железы.

Ген лактоферрин расположен в районе 22 хромосомы, в локусе 22q24. Структура

этого гена состоит из 17 экзонов (85-225 пар оснований),1122 пар оснований промотор и охватывает приблизительно 34,5 т.п.н. геномной ДНК, представляет собой белок с молекулярной массой 80 кДа состоящего из 708 аминокислот с 19 сигнальными пептидами аминокислот и с высокой степенью гомологии среди видов. Ген лактоферрина развился во время эволюционных мутаций в трансферрине. Существует 60-65% идентичности нуклеотидных последовательностей между этими двумя генами. Аналогичная гомология в последовательности генов существует среди различных видов млекопитающих - гены человека, быка, мыши и свиньи идентичны в 65% и почти до 100%.

Лактоферрин может служить геном-кандидатом к устойчивости на мастит. Устойчивость к маститу является низконаследуемым признаком. Резистентность определяется гуморальными и клеточными механизмами защиты, морфологическими и функциональными свойствами вымени. Важным из признаков может быть оценка быков производителей по средней частоте заболеваемости семейств и потомства, с учетом генетических и биохимических маркеров. Соматические клетки в молоке тесно связаны с величиной воспалительного процесса, и является хорошим диагностическим инструментом, который позволяет раньше выявить как субклинический, так и клинический мастит.

Аллель А гена *LTF* связан с заболеваемостью маститом. Ученые установили частоту встречаемости генетических вариантов *AA*, *BB*, *AB* у коров 32,5%, 10%, 57,5%. В качестве ДНК маркера, авторы рекомендуют использовать генетические варианты лактоферрина для прогнозирования содержания соматических клеток в молоке и заболеваемости маститом.

Коэффициент наследуемости концентрации лактоферрина колеблется от 0,15 до 0,44.

Таким образом, ген лактоферрин может быть потенциальным генетическим маркером у крупного рогатого скота, связанным с устойчивостью к маститу у коров. Данный критерий можно использовать в селекции при отборе и подборе родительских пар.

Маннозосвязывающий лектин (*Mannose binding lectin - MBL*) - кальций зависимый коллагеновый белок, который принимает участие в активации комплемента через лектиновые пути. Относится к системе врожденного иммунитета и активно участвующий в элиминации широкого круга патогенных микроорганизмов посредством активации системы комплемента и опсонизации.

Данная функция характеризуется секрецией опсонизирующих компонентов, которые покрывают патогенные микроорганизмы или иммунные комплексы, увеличивая фагоцитоз. Также принимает участие в воспалительных процессах организма.

Данный белок вырабатывается в печени под влиянием цитокинов воспаления. Вырабатывается в качестве ответной реакции на инфекцию, попадая в кровь становится частью механизма антиген-специфического иммунитета.

MBL1 является частью многих факторов, определяемые как белки острой фазы, играет роль во врожденном иммунитете. Недостаточность данного белка связано с низкой выживаемостью новорожденных в возрасте до года, в связи с незрелостью иммунитета чувствительны к инфекционным заболеваниям. *MBL1* связывается на поверхности апоптозных клеток, что облегчает их поглощение фагоцитами. Лектиновый путь активации врожденного иммунитета, обусловлен связыванием данного белка с углеводными остатками - маннозой и фукозой, которые на поверхности патогенов.

MBL1 крупного рогатого скота локализован на 26 хромосоме, состоит из 3 интронов и 4 экзонов, кодирует 249 аминокислот. Мутации данного гена проявляются клинически повышенной восприимчивостью к инфекционным агентам. Данные мутации, которые

происходят в гене, могут влиять на структуру белка, таким образом, уменьшая уровень концентрации *MBL1* в сыворотке крови и восприимчивы к инфекциям различного рода. Некоторые исследования показали, что у коров, у которых вымя поражено клиническим маститом, более высокая экспрессия гена *MBL1*, в сравнении со здоровыми животными. Эти исследования могут свидетельствовать о том, что белок маннозосвязывающий лектин может служить молекулярным маркером устойчивости коров к маститу.

Таким образом, гены маннозосвязывающего лектина могут использоваться в качестве потенциальных маркеров устойчивости коров к маститу. Необходимо проводить селекционно-племенную работу в раннем возрасте у крупного рогатого скота, направляя на увеличение в стаде животных с резистентностью к маститу. Но необходимо помнить, что данные исследования проводились на ограниченном количестве животных, поэтому нужно проводить подробный анализ относительно других пород.

Гены лактоферрина и маннозосвязывающего лектина могут служить генетическими маркерами у крупного рогатого скота, связанными с изменениями количественного содержания соматических клеток в молоке, и устойчивостью к маститу.

Применение современных методов генетической оценки групп по соматическим клеткам молока, снизит затраты на лечение, тем самым улучшит качество молока коров их состояние и здоровье людей.

При правильном подходе к проблеме, использовании последних разработок в области молекулярно-генетических исследований можно добиться улучшения физиологического состояния поголовья и улучшения генетики коров с помощью ПЦР-ПДРФ анализа. Преимущество ДНК - технологий заключается в том, что определить генотип можно независимо от возраста, пола, физиологического состояния это считается необходимым фактором в селекционной работе.

Известен способ повышения продуктивности дойных коров различных генотипов гена PON1 (Патент на изобретение RU 2775569 C1), который обеспечивает повышение молочной продуктивности популяций коров с генотипами GA и GG. Также известен способ повышения продуктивности дойных коров различных генотипов гена FGF21 (Патент на изобретение RU 2812476 C1), позволяет оптимизировать физиолого-биохимические процессы в организме, снижать отрицательное влияние энергетического стресса на генном уровне и обеспечивает повышение молочной продуктивности коров с генотипами CC и TC.

Ближайшим аналогом заявленного изобретения является способ диагностики устойчивости коров к маститу (RU 2673746 C1), где описан способ диагностики полиморфизма гена CARD15, включающий оценку животных на основании результатов ПЦР.

Научно-хозяйственные эксперименты проводились в условиях СХПК племзавод им. Ленина Атнинского района РТ на 1130 голов коров-первотелок голштинской породы. За период проведения исследований все опытное поголовье крупного рогатого скота СХПК им. Ленина находились в одинаковых условиях кормления, технологического содержания, ветеринарного обслуживания.

Кровь отбирали у животных из хвостовой вены, при помощи вакуумных пробирок с 100 мМ ЭДТА.

Выделение ДНК осуществлялось в ПЦР-боксе *UVC/T-M-AR* (*BioSan*, Латвия) с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (НекстБио, Россия), вортекса *Vortex V-1* (*BioSan*, Латвия), термостата Гном (ДНК-Технология, Россия), миницентрифуги *MiniSpin* (*Eppendorf*,

Германия), дозаторов автоматических (*Thermo Fisher*, США), микропробирок и наконечников разных объемов.

Амплификацию фрагментов ДНК проводили в амплификаторе *T100 ThermalCycler* (*BioRad*, США).

Компоненты ПЦР-смеси: вода дистиллированная, буферный раствор Taq-полимеразы, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, праймеры, Taq-полимераза, анализируемый ДНК-образец (таблицы 1 и 3).

Для амплификации фрагментов *LTF* и *MBL1* использовали следующие праймеры:

l7LTF F: 5'-CAG-GTT-GAC-ACA-TCG-GTT-GAC-3'

l7LTF R: 5'-GCC-TCA-TGA-CAA-CTC-CCA-CAC-3'

l6MBL1 F: 5'-GTG-GTG-GCA-AAT-GTT-GGC-TAA-AC-3'

l6MBL1 R: 5'-TGG-CTC-TCC-CTT-TTC-TCC-CTT-3'

ПЦР проводили с 2 мкл ДНК-образца, общий объем реакционной смеси в одной пробирке составлял 20 мкл (таблицы 2 и 4). В таблицах 1 и 3 представлены составы смеси для реакции и количество ее компонентов, а также режимы амплификации для генов *LTF* и *MBL1*.

Таблица 1. Состав реакционной смеси для амплификации фрагментов гена *LTF*

Реагенты	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	На 1 пробу (мкл)
dH_2O			13,6
dNTPs	2,5мМ	0,25 мМ	2
Буфер Taq	$10^{\times}$	$1^{\times}$	2
Taq ДНК pol	5 ед.	1 ед.	0,2
l7LTF F	100 мкМ	0,5 мкМ	0,1
l7LTF R	100 мкМ	0,5 мкМ	0,1
Проба ДНК			2
Всего			20

Таблица 2. Режим амплификации для гена *LTF*

Стадия ПЦР	Температура °С	Длительность стадии	Количество циклов
Первоначальная денатурация ДНК	95	7 мин	1
Денатурация ДНК	95	30 сек	35
Отжиг праймеров	61	45 сек	35
Элонгация	72	45 сек	35
Элонгация	72	7 мин	1
Хранение	4		

Таблица 3. Состав реакционной смеси для амплификации гена *MBL1*

Реагенты	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	На 1 пробу (мкл)
dH_2O			13,6
dNTPs	2,5мМ	0,25 мМ	2
Буфер Taq	$10^{\times}$	$1^{\times}$	2
Taq ДНК pol	5 ед.	1 ед.	0,2
l6MBL1 F	100 мкМ	0,5 мкМ	0,1
l6MBL1 R	100 мкМ	0,5 мкМ	0,1
Проба ДНК			2
Всего			20

Таблица 4. Режим амплификации для гена *MBL1*

Стадия ПЦР	Температура °С	Длительность стадии	Количество циклов
Первоначальная денатурация	95	3 мин	1

ДНК			
Денатурация ДНК	95	30 сек	35
Отжиг праймеров	61	45 сек	35
Элонгация	72	45 сек	35
Элонгация	72	5 мин	1
Хранение	4		

Для проведения рестрикционного гидролиза гена *LTF* и *MBL1* использовались следующие компоненты (таблицы 5 и 6).

Таблица 5. Состав смеси для рестрикции гена *LTF*

Реагенты	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	На 1 пробы (мкл)
dH_2O			1,75
SE-буфер H	$10^{\times}$	$1^{\times}$	2,5
EcoR I	20 ед.	10 ед.	0,5
BSA	100 ед.	1 ед.	0,25
ПЦР-проба			20
Итого			25

Таблица 6. Состав смеси для рестрикции гена *MBL1*

Реагенты	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	На 1 пробы (мкл)
dH_2O			2
SE-буфер G	$10^{\times}$	$1^{\times}$	2
Hae III	10 ед.	10 ед.	1
ПЦР-проба			20
Итого			25

Молекулярный вес продуктов ПЦР-ПДРФ анализа определяли методом горизонтального электрофореза в 2-2,5% агарозном геле.

Для приготовления агарозного геля использовали: агарозу, трис-боратный буфер (*TBE*-буфер), 10%-ный бромистый этидий 5 мкл.

В качестве маркера молекулярных масс использовали ДНК-маркеры 100 bp + 50 bp (11 фрагментов от 50 до 1000 bp) (СибЭнзим, Россия). В первую лунку геля вносили маркер, в оставшиеся лунки предварительно окрашенные исследуемые ПЦР-ПДРФ-пробы.

Электрофорез вели при 200 мА, 150 В, 20 Вт (Эльф-8, ДНК-Технология, Россия). Полученные результаты фиксировали и определяли с помощью видео документирующей системы *GelDoc* (*BioRad*, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы *Microsoft Excel*. Уровень достоверности полученных результатов определяли по критерию Стьюдента.

Частоту встречаемости генотипов определяли по формуле:

$p = n / N$,

где p - частота определения генотипа;

n - количество особей, имеющих определенный генотип;

N - число особей.

Частоту отдельных аллелей определили по формуле максимального правдоподобия:

$P(A) = 2nAA + nAB / 2n$; $q(B) = 2nBB + nAB / 2n$,

p - частота аллеля A,

q - частота аллеля B,

n - общее число аллелей.

Статистическую ошибку для обеих частот определяли по формуле

mp=mq=√p×q/2n,

p - частота аллеля A,

q - частота аллеля B,

n - общее число аллелей.

Анализ продуктивности был произведен с помощью программного пакета «Селекс» (АРМ Плинор, Санкт- Петербург).

В ходе изучения полученных данных, было выяснено, что средний удой коров за 305 дней лактации составляет 6149 кг молока, среднее содержание жира - 3,77%, среднее содержание белка составляет 2,79%.

В результате амплификации ДНК лейкоцитов крови коров в ПЦР и последующего анализа продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза, были получены специфически фрагменты гена *LTF* длиной 301 пар нуклеотидов, было выявлено два аллеля лактоферрина - A и B и два генотипа AA и AB. Гомозиготному генотипу AA соответствует 100/201 п.н., гетерозиготному генотипу AB 100/201/301 п.н. (Фигура 1. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ гена лактоферина крупного рогатого скота с праймерами LTFf+LTFr и эндонуклеазным расщеплением ферментом EcoRI. Обозначения: M) ДНК-маркеры 1000-100 п.н. (СибЭнзим); 1, 2, 3, 4, 7,8, 10, 11 - генотип AA (301/100 п.н.); 5, 6,9 - генотип AB (301/201/100 п.н.)).

Частота встречаемости гомозиготного генотипа AA составила 71%, гетерозиготного генотипа AB - 29%.

В результате амплификации ДНК лейкоцитов крови коров в ПЦР и последующего анализа продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза, были получены специфически фрагменты гена *MBL1* длиной 255 пар нуклеотидов, было выявлено два аллеля C и T и три генотипа CC, CT, TT. Гомозиготному генотипу TT соответствует 255 п.н., гетерозиготному генотипу TC 77/178/255 п.н., гомозиготному генотипу CC 77/178 (Фигура 2. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ гена маннозосвязывающий лектин крупного рогатого скота с праймерами MBL1+MBL2 и эндонуклеазным расщеплением ферментом HaeIII. Обозначения: M) ДНК-маркеры 1000-50 п.н. (СибЭнзим); 1, 2, 3 - генотип TC (255/178/77 п.н.); 4, 5 - генотип CC (178/77 п.н.); 6 - генотип TT (255 п.н.)).

Из 1130 исследуемых коров, 210 коров оказались носителями гомозиготного генотипа TT, 480 коров имели гетерозиготный генотип TC, 440 коров имели гомозиготный генотип CC.

Частота встречаемости гомозигонтого генотипа TT составила 18% (210 голов), гетерозиготного генотипа CT 43% (480 голов), гомозиготного CC 39% (440 голов).

Далее по результатам анализа встречаемости комплексных вариантов генотипов среди 1130 коров было выявлено 6 комплексных генотипов: $LTF^{AA}MBL1^{CC}$, $LTF^{AA}MBL1^{TC}$, $LTF^{AA}MBL1^{TT}$, $LTF^{AB}MBL1^{CC}$, $LTF^{AB}MBL1^{TC}$, $LTF^{AB}MBL1^{TT}$ (таблица 7).

Встречаемость комплексных генотипов генов *LTF* и *MBL1* у коров голштинской породы была следующей - $LTF^{AA}MBL1^{CC}$ - 280 голов (25%), $LTF^{AA}MBL1^{TC}$ - 330 голов (29%), $LTF^{AA}MBL1^{TT}$ - 190 голов (17%), $LTF^{AB}MBL1^{CC}$ - 160 голов (14%), $LTF^{AB}MBL1^{TC}$ - 150 голов (13%), $LTF^{AB}MBL1^{TT}$ - 20 голов (2%).

Такие генотипы $LTF^{BB}MBL1^{TC}$, $LTF^{BB}MBL1^{TC}$, $LTF^{BB}MBL1^{TC}$ у исследованных животных не встречалось, это связано с отсутствием особей с генотипом LTF^{BB}.

Таблица 7. Продуктивность коров и количество соматических клеток в зависимости

от комплексных генотипов генов *LTF* и *MBL1*

Генотип	n	%	Удой, кг	Белок, %	Жир, %	Содержание соматических клеток, тыс./мл
$LTF^{AA}MBL1^{CC}$	280	25	6240,2±169,3	2,74±0,06	3,75±0,04	259,3±34,4
$LTF^{AA}MBL1^{TC}$	330	29	6086,5±221,2	2,86±0,06	3,77±0,05	271,2±25,1
$LTF^{AA}MBL1^{TT}$	190	17	6090,1±288,1	2,68±0,10	3,76±0,05	315±49,7
$LTF^{AB}MBL1^{CC}$	160	14	5844,4±288,7	2,84±0,09	3,76±0,05	244±28,4
$LTF^{AB}MBL1^{TC}$	150	13	6567,9±457,1	2,9±0,10	3,78±0,06	289,6±41,96
$LTF^{AB}MBL1^{TT}$	20	2	5771,5±328,8	2,68±0,43	3,89±0,36	279±77,78

Проведенным ПЦР-ПДРФ анализом при исследовании генов *LTF* и *MBL1* - было выявлено 6 различных комплексных генотипов, самыми распространенными из них оказались: $LTF^{AA}MBL1^{CC}$, $LTF^{AA}MBL1^{TC}$, $LTF^{AA}MBL1^{TT}$. Частота их встречаемости составила 25%, 29%, 17% соответственно.

По содержанию белка превосходили особи с комплексным генотипом $LTF^{AB}MBL1^{TC}$ (2,90%). Преимущество над коровами с другими комплексными генотипами составляет 0,01-0,21%. По содержанию жира в молоке отличались животные с генотипом $LTF^{AB}MBL1^{TT}$ (3,89%). Они превосходили по этому показателю коров с другими комплексными генотипами на 0,11-0,14%. Коровы с генотипом $LTF^{AB}MBL1^{TC}$ имели наибольший удой 6567,9 кг.

Однако по результатам проведенного анализа можно сделать вывод, что экономически целесообразно выращивать животных с комплексным генотипом $LTF^{AB}MBL1^{CC}$, данные особи занимали наилучшее положение по содержанию соматических клеток в молоке.

При современных технологиях производства молока, заболевание вымени у крупного рогатого скота является одним из самых распространенных. Одним из таких заболеваний является мастит, это заболевание относят к убыточным заболеваниям. Скрытая форма мастита наносит весомый удар по экономике молочного скотоводства. Известно, что мастит у коров может возникать в различные функциональные периоды молочной железы.

Известно, что воспаление молочной железы у коров широко распространено и часто регистрируется при однократном исследовании у 5-6% животных.

Проведение лечения целесообразно для предприятия и экономически оправдано, оно способно предотвратить большие убытки при внезапной вспышке болезни.

При заболевании коров маститом, происходит снижение качества молока. Для этого необходимо определять экономический ущерб от снижения продуктивности животных, ($У_2$) определяют сопоставлением продуктивности здоровых и больных животных в одном стаде:

$У_2=М_з*(В_з - В_б)*Т*Ц$,

где $М_з$ - количество заболевших животных;

$В_з$ и $В_б$ - среднесуточная продуктивность здоровых и больных животных или благополучного и неблагополучного стада, кг;

Т - средняя продолжительность наблюдения за изменением продуктивности животных, дни.

Ущерб, предотвращенный в результате профилактики и ликвидации заразных и

незаразных болезней животных в хозяйстве ($П_у$), определяется как разница между потенциальным и фактическим экономическим ущербом по формуле:

$П_у=М_0$* Кп.*Ц-У,

где $М_0$ - общее поголовье восприимчивых или наличие животных в хозяйстве;

Кп.- удельная величина потерь основной продукции в расчете на одно заболевшее животное, кг Т.;

Ц-средняя цена единицы продукции, руб.;

У- суммарный экономический ущерб.

Экономический эффект, получаемый в результате проведения профилактических, оздоровительных и лечебных мероприятий ($Э_в$), определяют по формуле:

$Э_в = П_у - З_в$,

$П_у$ - экономический ущерб, предотвращенный в результате проведения ветеринарных мероприятий, руб.;

$З_в$ - затраты на проведение ветеринарных мероприятий, руб.

Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на 1 руб. затрат ($Э_р$) определяется путем деления экономического эффекта на затраты по осуществлению указанных мероприятий:

$Э_р= Э_в : З_в$,

$Э_в$ - экономический эффект, руб.;

$З_в$ - затраты на проведение ветеринарных мероприятий.

Скотоводческим хозяйствам рекомендуется для повышения качества молока и молочной продуктивности, а также для снижения случаев маститов при отборе животных, проводить молекулярно-генетическое тестирование поголовья по локусам генов *MBL1* и *LTF* с целью накопления в стадах животных, имеющих желательные генотипы. Нами установлено, что по содержанию соматических клеток в молоке лучшее положение занимали животные с комплексным генотипом $LTF^{AB}MBL1^{CC}$. Их насчитывается всего 14% из числа исследованных. Животных-носителей желательных аллелей, рекомендуется использовать при подборе родительских пар для получения наилучшего потомства с высокими показателями молочной продуктивности.


```
<?xml version="1.0" encoding="ISO-8859-1"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing SYSTEM "ST26SequenceListing_V1_3.dtd"
PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN">
<ST26SequenceListing productionDate="2025-02-03"
softwareVersion="2.3.0" softwareName="WIPO Sequence"
fileName="Нуклеотидные последовательности праймеров для генов LTF и
MBL1.xml" dtdVersion="V1_3" nonEnglishFreeTextLanguageCode="ru"
originalFreeTextLanguageCode="en">
<ApplicationIdentification>
<IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
<ApplicationNumberText>2024125745/10(057118)</ApplicationNumberText>
<FilingDate>2024-09-03</FilingDate>
</ApplicationIdentification>
<ApplicantFileReference>2024125745</ApplicantFileReference>
<ApplicantName languageCode="ru">Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Казанская
```

государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана"</ApplicantName>
<ApplicantNameLatin>Federal State Budgetary Educational Institution higher education "Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman"</ApplicantNameLatin>
<InventionTitle languageCode="ru">Способ отбора дойных коров по комплексным генотипам генов LTF и MBL1 задействованных в устойчивости к возникновению мастита с помощью ПЦР-ПДРФ анализа</InventionTitle>
<SequenceTotalQuantity>4</SequenceTotalQuantity>
<SequenceData sequenceIDNumber="1">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q9">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Bos taurus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caggttgacacatcggttgac</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q10">

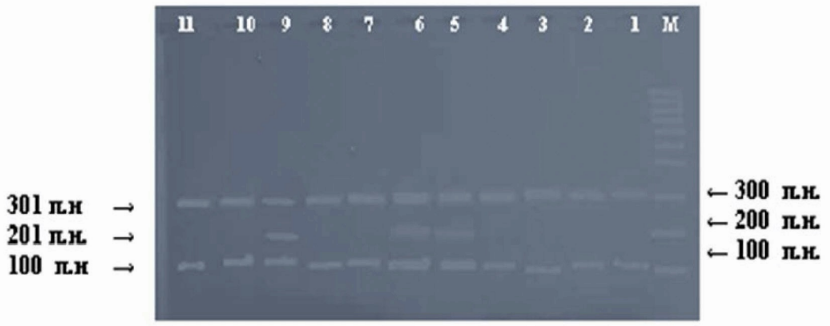
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Bos taurus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gcctcatgacaactcccacac</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q11">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Bos taurus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gtggtggcaaatgttggctaaac</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q12">

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Bos taurus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tggctctccctttctccctt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

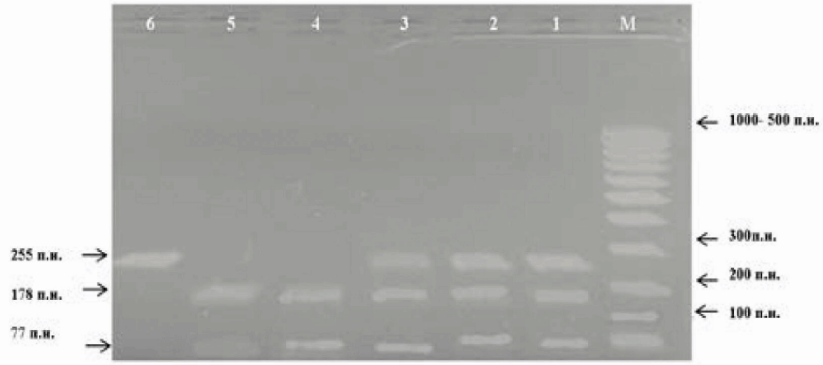

(57) Формула изобретения

Способ отбора дойных коров-первотелок голштинской породы по комплексному генотипу генов *LTF* и *MBL1*, задействованных в устойчивости к возникновению мастита, с помощью ПЦР-ПДРФ анализа, включающего выделение ДНК из проб крови, амплификацию с использованием праймеров *17LTF F: 5'-CAGGTTGACACATCGGTTGAC-3'*, *17LTF R: 5'-GCCTCATGACAACTCCCACAC-3'*, *16MBL1 F: 5'-GTGGTGGCAAATGTTGGCTAAAC-3'*, *16MBL1 R: 5'-TGGCTCTCCCTTTTCTCCCTT-3'*, рестрикционный анализ ампликонов, установление и отбор коров с устойчивостью к маститу и наилучшим показателем по содержанию соматических клеток в молоке, отличающийся тем, что результатом ПЦР-ПДРФ анализа является выявление сочетания в геноме животных комплексного генотипа $LTF^{AB}MBL1^{CC}$.

1



Фигура 1



Фигура 2