DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-7-5
УДК 636.082.2

Влияние аллелей гена пролактина коров чёрно-пестрой голштинизированной породы на лечение мастита

Нефедова Е.В.
Nefedova E.V.

Нефедова Е.В., старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук
Черепушкина В.С., младший научный сотрудник
Бушмелева П.В., старший научный сотрудник, кандидат биологических наук
Донченко Н.А., руководитель подразделения, член-корреспондент РАН, доктор ветеринарных наук
Шкиль Н.Н., ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук
Сибирский Федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук. 630501, Новосибирская область, п. Краснообск

Ключевые слова: ген PRL, мастит, крупный рогатый скот, ДНК-диагностика, Арговит, спектромаст, цефтиофур.

Резюме. Достижения современной молекулярной генетики позволяет проводить селекцию на геномном уровне с заранее заданными хозяйственными признаками. Широкое использование голштинской породы крупного рогатого скота оказывает влияние на увеличение молочной продуктивности, качественный состав молока и изменение генетической структуры улучшаемой породы. Изучено влияние аллельного варианта гена пролактина на количество соматических клеток (свидетельствующих о повышении резистентности к маститу) крупного рогатого скота голштинизированной чёрно-пестрой породы одного из хозяйств Западно-Сибирского региона. В тоже время лечение коров препаратами против мастита, показывает разную эффективность лечения внутри стада. Сравнительный анализ эффективности препарата Арговит, содержащего высокодисперсные частицы кластерного серебра и противомаститного средства спектромаст, содержащего антибактериальный препарат цефтиофур, показал наличие наименьшего лечебного эффекта у гетерозиготных особей в обоих случаях, о чем свидетельствует наибольший уровень соматических клеток в молоке у обеих групп животных с данным генотипом, в сравнении с генотипом AA. Наличие положительной корреляции ($r=0.999$) свидетельствует об однотипности механизмов влияния генотипа коров по гену PRL на патогенез

The effect of alleles of the prolactin gene of cows of the black-motley holstein breed on the treatment of mastitis

Nefedova E.V., senior researcher, candidate of sciences in veterinary

Cherepushkina V.S., junior research fellow

Bushmeleva P.V., senior researcher, candidate of sciences in biology

Donchenko N.A., head of division, corresponding member of RAS, doctor of veterinary sciences

Shkil N.N., leading researcher, candidate of sciences in veterinary

Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, 630501, Novosibirsk Region, Krasnoobsk

Key words: PRL gene, mastitis, cattle, DNA diagnostics, Argovit, spectromast, ceftiofur.

Abstract. Achievements of modern molecular genetics allows selection at the genomic level with predetermined economic characteristics. The widespread use of Holstein cattle has an impact on increasing milk production, the quality of milk and changing the genetic structure of the improved breed. The effect of the allelic variant of the prolactin gene on the number of somatic cells (indicating an increase in mastitis resistance) of cattle from Holstein black-and-white breed of one of the farms of the West Siberian region was studied. At the same time, treatment of cows with anti-mastitis drugs shows different treatment efficiencies within the herd. A comparative analysis of the effectiveness of Argovit containing highly dispersed particles of cluster silver and the anti-mastitis agent spectromast containing the antibacterial drug ceftiofur showed the smallest therapeutic effect in heterozygous individuals in both cases, as evidenced by the highest level of somatic cells in milk in both groups of animals with this genotype, in comparison with the genotype AA. The presence of a positive correlation ($r = 0.999$) indicates that the mechanisms of the influence of the cow genotype according to the PRL gene on the pathogenesis of mastitis and the treatment process associated with the use of Argovit and spectromast drugs are of the same type.

мастита и лечебный процесс, связанный с применением препаратов Арговит и спектромаст.

Достижения современной молекулярной генетики позволяют исследовать гены, связанные с хозяйственно полезными признаками сельскохозяйственных животных. Определение аллельных вариантов генов позволяет дополнительно к традиционному отбору животных проводить селекцию непосредственно на уровне ДНК. Преимущество ДНК-анализа заключается в том, что можно определить генотип животного независимо от пола, возраста и физиологического состояния, что является важным фактором в селекционной работе [1].

Для цитирования / For citation

Влияние аллелей гена пролактина коров чёрно-пестрой голштинизированной породы на лечение мастита / Нефедова Е.В. [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2019. - №7 - С.19-21

The effect of alleles of the prolactin gene of cows of the black-motley holstein breed on the treatment of mastitis / Nefedova E.V. [et. al.] // Veterinaria I kormlenie. - 2019. - № 7 - P.19-21

Одним из самых важных и дорогостоящих производственных болезней в молочной промышленности является мастит. Основными факторами, способствующими возникновению и развитию этой болезни, считают техническое состояние доильных установок, нарушение технологии и правил машинного доения коров [2].

Диагностика мастита основана на косвенных признаках заболевания, прежде всего на изменении физико-химических свойств молока и концентрации в нем соматических клеток [3].

Современные исследования в молекулярной генетике указывают на возможность взаимосвязи по аллелям А и В гена пролактина (PRL) и частотой возникновения мастита у коров [4-6].

У крупного рогатого скота ген PRL расположен на 23-хромосоме и состоит из пяти экзонов кодирующих 199 аминокислот и четыре интрона [7]. Отбор животных для улучшения характера молочной продуктивности и снижения количества соматических клеток (свидетельствующих о повышении резистентности к маститу) может быть усовершенствован посредством идентификации локусов, связанных с этими, интересующими признаками [8].

Российские породы крупного рогатого скота, а особенно разводимые в Сибирском регионе не достаточно изучены. Кроме того, широкое использование голштинской породы оказывает влияние не только на увеличение молочной продуктивности, улучшения экстерьера и формы вымени, но и влияет на качественный состав молока и изменение генетической структуры улучшаемой породы, что представляет научный и практический интерес [9]. В тоже время лечение коров препаратами против мастита, показывает разную эффективность лечения внутри стада. В связи с этим возникла необходимость изучить взаимосвязь по аллелям А и В гена пролактина с эффективностью лечения препаратами Арговит и спектромаст против мастита чёрно-пестрой голштинизированной породы крупного рогатого скота.

Цель исследований - изучить влияние разных генотипов коров по гену пролактина на эффективность лечения маститов перепаратом серебра Арговит и антибиотиком - спектромаст.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы крови и молока 82 голов Сибирской черно-пестрой голштинизированной породы крупного рогатого скота, одного из хозяйств Новосибирской области леченых от мастита перепаратом серебра Арговит и антибиотиком - спектромаст.

Препарат Арговит представляет собой комплекс высокодисперсных частиц кластерного серебра, поливинилпирролидона и водного раствора, полученного электролучевым способом. Препарат обладает широким спектром антимикробного действия в отношении грамположительных и грамотрицательных, аэробных и анаэробных, спорообразующих и аспорогенных бактерий в виде монокультур и микробных ассоциаций.

Спектромаст - антибактериальный препарат, содержащий в своем составе: цефтиофура гидрохлорид; микрокристаллический воск, олеил полиоксилглицериды, хлопковое масло. Цефтиофура гидрохлорид, входящий в состав лекар-

ственного препарата - цефалоспориновый антибиотик третьего поколения, широкого спектра действия, оказывающий бактерицидное действие на грамотрицательные и грамположительные бактерии, включая штаммы, продуцирующие β-лактамазу и некоторые анаэробные бактерии. Препарат вводят интрацестерально 10 мл, двукратно с интервалом 24 часа до восьми дней.

В пробирки ЭДТА из хвостовой вены коров были отобраны пробы крови, для дальнейшего выделения ДНК при помощи набора "ДНК Сорб В".

Компьютерный подбор праймеров делали с использованием программы UGENE с последующей проверкой на гомологию с неспецифической ДНК в программе BLAST, оценкой вторичной структуры ампликонов с использованием алгоритма MFold. На основе выравнивания нуклеотидных последовательностей изучаемого гена (GenBank), были выделены наиболее вариабельные области позволяющие отличить аллельные варианты А и В гена PRL. Для детектирования аллельных вариантов гена PRL предложена система праймеров и двух зондов. Температура отжига 60-62 °C.

Для амплификации фрагментов генов PRL использовали следующие праймеры и зонды:

PRL- 3 F5' - CGAGTCCTTATGAGCTTGATTCT -3

PRL- 3 R5' - 5-CTCTATGGCCCTCGATAGGATA -3

PRLAFAM- 5' CACTTCGGTGACTAGGTGATACAGAG3' - BHQ1(генотип А - больше молочности)

PRLBHEX-5' TACTTCGGTGACTAGGTGATACAGAG3' - BHQ1(генотип В - меньше молочности).

ПЦР в режиме реального времени с Taqman зондом проводили на реалтайм-амплификаторе "CFX" (BioRad) и LightCycler (Roche). ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл, содержащем 67 мМ трис.-HCl (pH 8,9), 16 мМ сульфат аммония; 2,4 мМ MgCl₂; 0,01% Твин 20; 0,2 мМ дНТФ; 0,5 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров, 1х, Taq-ДНК полимеразы 1-2 ед.

Рестрикцию проводили путем инкубирования 10 мкл ПЦР-продукта с 5 единицами рестриктазы RsaI (37°C). Фрагменты рестрикции разделяли в вертикальном 9% полиакриламидном геле в TBE-буфере. Визуализировали на приборе GelDoc в проходящем УФ-свете с помощью бромистого этидия, в растворе которого выдерживали гель после проведения фореа. Получаемые спектры рестрикции анализировали с помощью программного обеспечения фирмы BioRad.

Для получения основных показателей внутрипопуляционной изменчивости использовали надстройку для MS Excel - GenAlEx (Peakall and Smouse, 2012).

Частоту встречаемости аллелей определяли по формуле:

$$P = \frac{AA + \frac{AB}{2}}{N}$$

где AA - число гомозигот по исследуемому аллелю; AB - число гетерозигот; N - объем выборки.

Частоту встречаемости генотипов определяли по формуле Харди-Вайнберга.

Таблица 1 - Частота встречаемости генотипов и аллелей гена PRL у коров, Сибирской черно-пестрой голштинизированной породы, больных маститами

Table 1 - Frequency of occurrence of genotypes and alleles of the PRL gene in cows, Siberian black-and-white Holstein breed, with mastitis

Показатели	Частота генотипов						Частота аллелей		χ^2
	AA		BB		AB		A	B	
	n	%	n	%	n	%			
Больные маститом коровы, n=82	8	9,8	10	12,2	64	78,0	0,487	0,512	25,89
Ожидаемые частоты генотипов по Харди-Вайнбергу	19.5	23.78	21.5	26.22	41	50.0			(P<0.0001)

Таблица 2 – Эффективность лечения маститов в зависимости от генотипа коров по гену PRL на эффективность лечения
Table 2 - The effectiveness of the treatment of mastitis depending on the genotype of cows in the PRL gene on the effectiveness of treatment

Аллели	Содержание соматических клеток при лечении препаратами, тыс./мл	
	Арговит	Спектромаст
AA n=8	289,4±8,4	320,9±7,6
BB n=10	326,7±10,4	374,8±9,2
AB n=62	342,1±9,7	398,4±6,1

Диагностику мастита коров определяли по результатам исследований проб молока с подсчётом соматических клеток (в счетной камере Горяева) по Н.М. Хилькевичу (1968), посевов на МПА с целью определения содержания КОЕ микроорганизмов в 1 мл, при одновременном исследовании на Кенотест и пробой отстаивания согласно "Методическим указаниям по диагностике, терапии и профилактике мастита у коров" [10].

Работа выполнена при поддержке проекта КП ФНИ СО РАН II.1 (ГЗ № 0309-2018-0018) "Новые подходы высокопроизводительного типирования структурных вариантов ДНК для селекционных исследований крупного рогатого скота, свиней и кур" (2018-2020 г.).

Результаты и обсуждение

У больных коров сибирской черно-пестрой голштинизированной породы проанализировали частоты аллелей А и В, гена пролактина PRL. Наибольшей частотой в популяции обладал аллель В (0,512). Очевидно, что уровень гетерозиготности составил 78%, что на 28% выше, чем уровень гетерозиготности ожидаемый для распределения Харди-Вайнберга, при наблюдаемой частоте аллелей. Наблюдаемое распределение генотипов статистически - значительно отличается от распределения Харди-Вайнберга. Вероятно, часть популяции, характеризующаяся повышенной восприимчивостью к маститам, существенно отличается по частотам аллельных вариантов изучаемого гена от основной популяции коров (таблица 1).

Наблюдается наименьшая эффективность лечения у коров с генотипом АВ как в случае применения антибактериального препарата, так и в случае применения Арговита, о чем свидетельствует наибольший уровень соматических клеток в молоке у обеих групп животных с данным генотипом, в сравнении с генотипом АА (таблица 2).

У животных с генотипом ВВ, по изучаемому локусу гена PRL, уровень соматических клеток является промежуточным. Факт наличия положительной корреляции ($r=0.999$) свидетельствует об однотипности механизмов влияния генотипа коров по гену PRL на патогенез мастита и лечебный процесс, связанный с применением обоих изучаемых препаратов.

Представляет интерес явная взаимосвязь между избыточной представленностью генотипа АВ в выборке животных с маститом, относительно распределения Харди-Вайнберга и наименьшей эффективностью лечения животных с этим же генотипом.

Заключение

Сравнительный анализ эффективности препарата Арговит и противомаститного средства спектромаст, содержащего антибактериальный препарат цефтиофул, показал наличие наименьшего лечебного эффекта у гетерозиготных особей, что сочетается со статистически значимым превышением частоты данного генотипа, относительно ожидаемой (для распределения по Харди-Вайнбергу). Влияние генотипов коров голштинизированной черно-пестрой породы ($r=0.999$) одного из хозяйств Западно-Сибирского

региона на эффективность лечения разными препаратами с антибактериальной активностью не различается.

Литература

1. Тюлькин, С.В. Полиморфизм по генам соматотропина, пролактина, лептина, тиреоглобулина быков-производителей / С.В. Тюлькин [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2012. - Том 16. - № 4/2. - С. 1008-1012.
2. Рекомендации по диагностике и лечению мастита коров с применением препаратов в сверхмалых дозах: метод. пособие / Рос. акад. с.-х. наук. Сиб. отд.-ние, Ин-т эксперим. вет-и Сибири и Дальнего Востока, ФГБОУ ВПО Новосибирский ГАУ. - Новосибирск, 2012. - 35 с.
3. Джапаридзе, Т. Как повысить качество молока и увеличить доходы / Т. Джапаридзе Т., Л. Зернаева // Аграрный эксперт. - 2006. - №3. - С. 36-40.
4. Рачкова, Е.Н. Ассоциации генов, связанных с молочной продуктивностью и резистентностью к маститу крупного рогатого скота: дис... канд. биол. наук/ Е.Н. Рачкова. - Казань, 2017. - 115с.
5. Павлова, Н.И. Вариабельность генов крупного рогатого скота Якутии и их действие на молочную железу: дис.... канд. биол. наук / Н.И. Павлова. - Якутск, 2017. - С. 27-32.
6. Родионов, Г.В. О генетической устойчивости коров к маститу / Г.В. Родионов, В.А. Солдатов, О.А. Калмыкова // Молочное и мясное скотоводство. - 2002. - № 6. - С. 25-26.
7. Hallerman, E.M. Mapping of bovine prolactin and rhodopsin genes in hybrid somatic cells/ E.M. Hallerman, J.L. Theilmann, J.S. Beckmann [et al.] // Anim Genet. - 1988. - № 19. - P. 123-31.
8. Удина, И.Г. Полиморфизм гена пролактина (микросателлиты, ПЦР-ПДРФ) у крупного рогатого скота/ И.Г. Удина // Генетика. - 2001. - Т. 37. - С. 511- 516.
9. Воронина, Е.Н. Полиморфные варианты генов, ассоциированные со свойствами молока крупного рогатого скота / Е.Н. Воронина, Е.А. Соколова, Н.А. Донченко [и др.] // Вестник АПК Ставрополя. - 2018. - № 4 (32). - С. 59-64.
10. Методические указания по терапии и профилактике мастита у коров / В.Д. Мисайлов. - Воронеж, 2005. - С. 3-27.

References

1. Tyulkin, S.V. Polymorphism for the genes of somatotropin, prolactin, leptin, thyroglobulin in bulls / S.V. Tyulkin [et al.] // Vavilovsky Journal of Genetics and Breeding. - 2012. - Volume 16. - No. 4/2. - P. 1008-1012.
2. Recommendations for the diagnosis and treatment of mastitis in cows with the use of drugs in ultra-low doses: method. allowance / Ros. Acad. agricultural sciences. Sib. Department, Institute of Experiment. Vet. Siberia and the Far East, Novosibirsk SAU. - Novosibirsk, 2012. - 35 p.
3. Dzhabaridze, T. How to improve the quality of milk and increase income / T. Dzhabaridze T., L. Zernaeva // Agricultural expert. - 2006. - No. 3. - P. 36-40.
4. Rachkova, E.N. Associations of genes associated with milk productivity and resistance to mastitis in cattle: dis ... cand. biol. sciences / E.N. Rachkova. - Kazan, 2017. - 115 p.
5. Pavlova, N.I. The variability of the genes of cattle in Yakutia and their effect on the mammary gland: dis cand. biol. sciences / N.I. Pavlova. - Yakutsk, 2017. - P. 27-32.
6. Rodionov, G.V. On the genetic resistance of cows to mastitis / G.V. Rodionov, V.A. Soldatov, O.A. Kalmykova // Dairy and beef cattle breeding. - 2002. - No. 6. - P. 25-26.
7. Hallerman, E.M. Mapping of bovine prolactin and rhodopsin genes in hybrid somatic cells/ E.M. Hallerman, J.L. Theilmann, J.S. Beckmann [et al.] // Anim Genet. - 1988. - № 19. - P. 123-31.
8. Uдина, I.G. Polymorphism of the prolactin gene (microsatellite, PCR-RFLP) in cattle / I.G. Uдина // Genetics. - 2001. - T. 37. - P. 511-516.
9. Voronina, E.N. Polymorphic gene variants associated with the properties of cattle milk / E.N. Voronina, E.A. Sokolova, N.A. Donchenko [et al.] // Bulletin of the agricultural industry of Stavropol. - 2018. - No. 4 (32). - P. 59-64.
10. Guidelines for the treatment and prevention of mastitis in cows / V.D. Misailov. - Voronezh, 2005. - P. 3-27.