

УДК 575.22:636

НОВАЯ СИСТЕМА ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ ДНК-МИКРОЧИПОВ

© 2022 г. Ю. А. Столповский¹, *, С. Б. Кузнецов¹, Е. В. Солоднева¹, И. Д. Шумов²

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии наук, Москва, 119435 Россия

*e-mail stolpovsky@mail.ru

Поступила в редакцию 12.11.2021 г.

После доработки 25.02.2022 г.

Принята к публикации 01.03.2022 г.

Создан прототип тест-системы для выявления генетических маркеров продуктивности, определения чистопородности, моногенных заболеваний крупного рогатого скота в формате ДНК-микрочипа. Разработан метод иммобилизации олигонуклеотидов на полимерную основу, фиксации их при помощи ультрафиолетового облучения и гибридизации на них ДНК с последующим мечением и проявлением генотипов. Генотипирование двух генов, кодирующих казеины молока: *CSN3* – ген каппа-казеина и *CSN2* – ген бета-казеина, у абердин-ангусской породы с помощью реал-тайм ПЦР и созданного ДНК-микрочипа показало идентичные результаты. Рассматриваются потенциальные возможности использования технологии ДНК-микрочипов, ее принцип и возможности применения в животноводстве для генетико-селекционной работы: мониторинга, определения генетического потенциала и разнообразия в породах и популяциях крупного рогатого скота, агробиоразнообразия в целом.

Ключевые слова: ДНК-микрочип, крупный рогатый скот, гены-кандидаты, геномная селекция, генотипирование, генетическое разнообразие.

DOI: 10.31857/S0016675822080094

Сегодня нет информации относительно истинного уровня генетической изменчивости среди большинства видов домашних животных, как нет понимания о количестве генов и их сочетаний, формирующих хозяйственно полезные признаки. Без знания уровня генетической изменчивости невозможно определять генетическую ценность многочисленных пород и популяций, а также принимать научно обоснованные решения по сохранению агробиоразнообразия. Без знания об аллельном разнообразии и взаимодействия генов, влияющих на тот или иной признак, невозможно создавать эффективные генетико-селекционные программы разведения. Сегодня генетика крупного рогатого скота (КРС), как и других доместичированных видов, находится на стадии накопления данных, причем как генотипов, так и фенотипов. Совершенно ясно, что за молочную и мясную продуктивности отвечают сотни, если не тысячи генов. В настоящее время у КРС описано около 200 генов, ответственных за формирование признаков с менделевским наследованием, включая хозяйственно значимые и ряд наследственных заболеваний (<https://omia.org/home>).

Достижения последних лет в молекулярно-биологических исследованиях сельскохозяйственных

видов животных включают: полное секвенирование геномов; разработку технологий оценок полиморфизма по локусам, распространенным по всему геному (например, методы определения однонуклеотидного полиморфизма SNP (single nucleotide polymorphism)); разработку технологий ДНК-биочипов – микроматриц в целях изучения профилей генной экспрессии в разных тканях и в связи с различными внешними воздействиями.

Для производственных селекционных систем поголовное полногеномное секвенирование пока не имеет смысла, дорого, да и с точки зрения селекции слишком много бесполезной информации. При этом существует практический интерес к использованию SNP в качестве генетических маркеров, который обусловлен их чрезвычайно широким распространением в геномах многих организмов, включая одомашненных видов. Внедряя в селекционную практику животноводства ДНК-маркеры данного типа, можно проводить точную идентификацию генотипов животных, несущих желательные фенотипические особенности, и на их основе вести селекцию.

Наиболее востребованы на данном этапе подходы (методы) геномной селекции, которые основаны на использовании плотных чипов, обра-

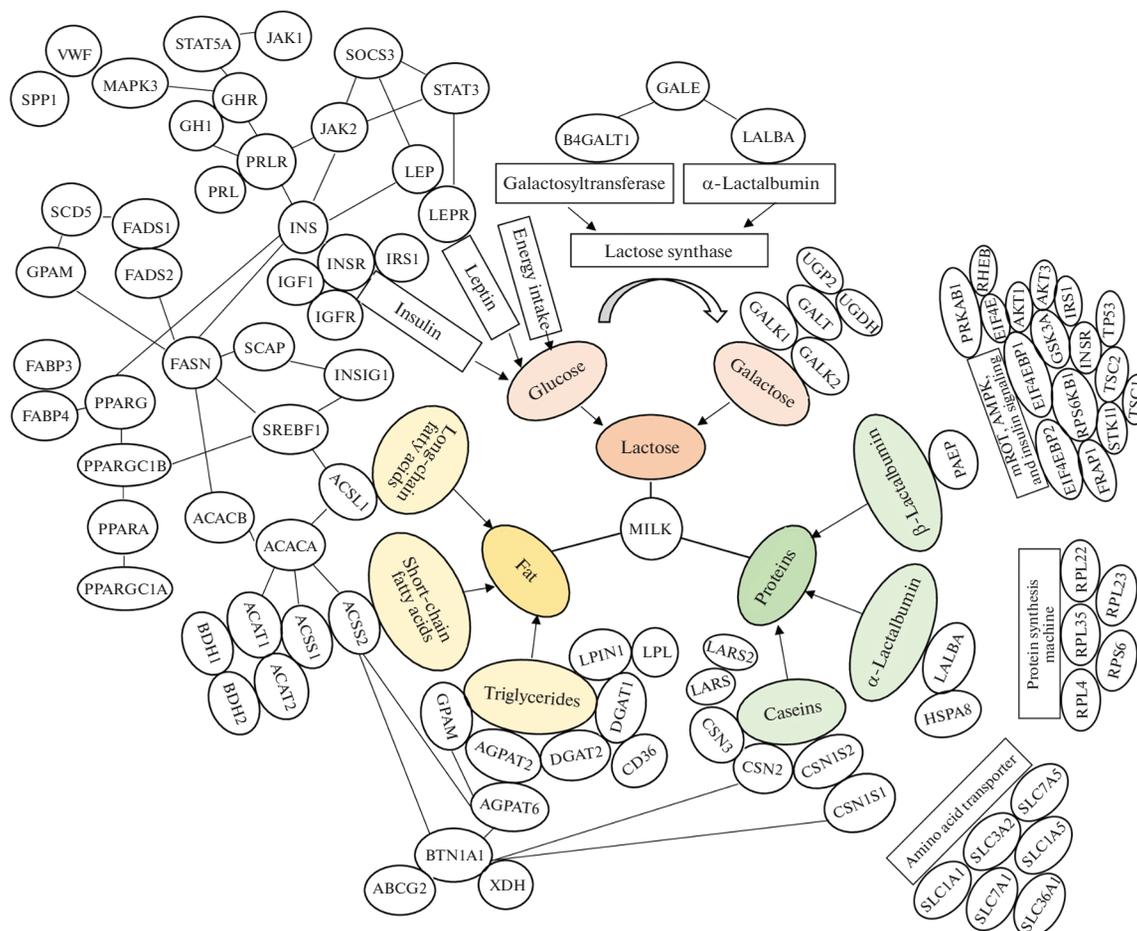


Рис. 1. Гены-кандидаты молочной продуктивности. Схема создана Е.В. Солодновой в программе diagrams.net. Ссылка на ресурс: <https://app.diagrams.net/>.

ботке больших массивов фенотипических и генотипических данных, например у КРС [1], овец [2], лошадей [3] и т.д. Плюсы и минусы геномной селекции подробно описаны [4, 5]. В настоящей статье отметим лишь один факт – для большинства SNP (сотни тысяч, миллионы), расположенных на плотном чипе, неизвестна их функция в геноме, по своей сути они, как правило, анонимны, и только после определенного биометрического анализа референсных выборок с “верными и точными фенотипами” можно сделать вывод об их корреляциях с каким-либо признаком. В настоящее время создаются более выгодные с точки зрения производства и интерпретации данных ДНК-микрочипы с низкой плотностью SNP [6–11].

До широкого внедрения геномной селекции основным фактором, сдерживающим улучшение генетических и продуктивных качеств животных, стала высокая стоимость генотипирования, которое было необходимо для создания эталонной популяции. И главным ограничивающим фактором на данном этапе стал сбор качественных феноти-

пических данных, многие из которых затратно и сложно оценить [12, 13].

Параллельно исследуются SNP в генах-кандидатах, которые связаны с проявлением полигенных признаков и, как правило, тестированием моногенных заболеваний. В данном случае об SNP известно не только место нахождения в геноме, но и функциональная значимость нуклеотидной замены для конкретного гена, большая часть SNP находится в его кодирующей зоне. Идеология геномной селекции основана на знаниях о генотипах, аллельном разнообразии, взаимодействии генов, связанных с хозяйственно полезными признаками, например такими как количественные и качественные показатели продуктивности, резистентности, адаптивности и т.д. На рис. 1 показаны некоторые гены-кандидаты, вовлеченные в формирование молочной продуктивности КРС.

Например, в России одними из первых начались исследования аллельного полиморфизма гена *CSN3* [14]. В Индии проводились работы по генотипированию местного скота по генам *DGAT1*

и *ABCG2* [15]. Также работы по генотипированию различных пород проводятся учеными других стран: Бельгии [16], Ирана [17], Словакии [18], Турции [19] и др. С помощью данного типа маркеров ведутся исследования широко распространенного заболевания КРС – комплексного порока позвоночника (CVM) и BLAD-синдрома КРС [20–22]. Изучаются ассоциации показателей качества мяса у различных сельскохозяйственных животных генами *RORC*, *SCD*, *GH*, *TG* [23–25]. Репродуктивные качества сельскохозяйственных животных оцениваются генотипированием по генам *ESR*, *FSHR*, *FSHB* и др. (см. рис. 1) [26, 27].

Технология ДНК-микрочипов весьма сходна с технологией Саузерн-блоттинга, где меченые фрагменты ДНК или РНК гибридизуют на иммобилизованную на носителе изучаемую ДНК. Впервые набор различных участков ДНК, объединенных в чип, был использован в 1987 г. для определения особенностей регуляции экспрессии генов интерферонами. Использование иммобилизованных на мембране фрагментов ДНК для определения особенностей экспрессии генов было осуществлено в 1995 г., а полногеномный микрочип дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) был создан в 1997 г. [28–30]. Приоритетная российская публикация появилась в печати в журнале *DNA Seq* в 1991 г. [31].

Микрочипы играют важную роль в фундаментальных исследованиях и приобретают все большее значение для практического применения в животноводстве (геномная селекция), в диагностике и прогностике в медицине, например при определении мутаций и экспрессии генов в злокачественных опухолях молочной железы [32], сколиоза [33], генов устойчивости к антибиотикам и вирулентности золотистого стафилококка [34]. Технология ДНК-микрочипов оказала влияние на медицинскую микробиологию, включая обнаружение и идентификацию патогенов, определение устойчивости к противомикробным препаратам, эпидемиологическое типирование штаммов и определение факторов вирулентности [35], а также на анализ профилей экспрессии генов из клеток периферической крови и отделение пациентов с гипертонией от нормотоников [36]. И наконец, создан первый ДНК-микрочип *CovidArray* для выявления вирусных генов в мазках [37].

Сегодня доступны различные форматы микрочипов, режимы выявления и анализа результатов исследований, полученных с их помощью. ДНК-микрочипы стали предпочтительным инструментом для изучения экспрессии генов, секвенирования фрагментов ДНК и выявления в них мутаций. Тем не менее основные производители ДНК-микрочипов до сих пор предлагают на рынке свою продукцию, предназначенную только для исследовательских целей. На микрочипах

высокой плотности, как правило, размещено от нескольких десятков тысяч до нескольких миллионов олигонуклеотидных последовательностей, представляющих полный геном человека, мыши или некоторых домашних животных. В настоящее время применение микрочипов высокой плотности в селекционной практике в России затруднено по нескольким причинам. Дело в том, что такие микрочипы достаточно дороги для массового применения и обеспечивают информацию, превышающую на несколько порядков ту, что необходима для определения, например, племенной ценности животного. Выход из этой ситуации состоит в создании микрочипов низкой плотности (LD – Low density), т.е. специализированных тест-систем, предназначенных для диагностики и прогностики конкретных заболеваний, анализа хозяйственно значимых признаков. Такие ДНК-микрочипы не несут избыточной информации для интерпретации результатов. Однако в настоящее время микрочипы низкой плотности производятся (печатаются) в основном в медицине под каждую новую задачу, что делает дороже их производство и в конечном счете повышает цену анализа для потенциальных потребителей.

За последние десятилетия накопились данные по сотням генам, связанным с продуктивностью и здоровьем сельскохозяйственных животных. К сожалению, многочисленные генетические данные пока слабо систематизированы, слишком много “белых пятен”. Отечественные лаборатории, специализирующиеся на генотипировании домашних животных, способны исследовать небольшое количество генов по достаточно затратным по времени и материальным ресурсам технологиям.

В связи с вышесказанным возникла идея создать на основе методов молекулярной биологии эффективную, недорогую и простую в использовании тест-систему для выявления в геномах КРС функционально значимых SNP, которые являются маркерами известных моногенных заболеваний, а также хозяйственно значимых признаков у КРС. Объединить генотипирование всех известных значимых для селекции генов на одной платформе можно с помощью ДНК-микрочипов – эта технология позволяет определять мутации в сотнях генов одновременно, в том числе исследовать генетические причины аномалий, возникающих в функционировании организмов.

Поэтому в рамках предлагаемого проекта поставлена задача разработать универсальный ДНК-микрочип, пригодный для анализа мелких мутаций – однонуклеотидных замен, делеций, инверсий, инверсий у любых видов млекопитающих, у растений и человека. Пилотный проект ДНК-микрочипа был разработан на примере хозяйственно значимых признаков крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ДНК

Из мышц абердин-ангусской породы КРС была выделена ДНК колоночным методом с помощью набора компании Евроген. Для определения количества и качества ДНК измеряли концентрацию общей ДНК и соотношение поглощения препарата при 260 нм и при 280 нм на приборе NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., США); концентрацию двухцепочечной ДНК измеряли на флуориметре Qubit™ (1.0) (Invitrogen, Life Technologies, США).

Реал-тайм ПЦР

Анализ ДНК методом реал-тайм ПЦР проводили на приборе LightCycler®96 SW 1.1 при условиях: 1 цикл – 3 мин при 95°C, 55 циклов: 95°C – 15 с, 55°C – 15 с, 72°C – 20 с, с последующим анализом пиков плавления полученных ампликонов. Генотипировали образцы с помощью праймеров к генетическим маркерам (мутациям) двух генов, кодирующих казеины молока: *CSN3* – ген каппа-казеина и *CSN2* – ген бета-казеина. Результаты генотипирования методом реал-тайм ПЦР использовали для верификации результатов генотипирования, полученных с помощью разрабатываемого ДНК-микрочипа.

Создание ДНК-чипа

Метод 1. ДНК-микрочип представляет из себя подложку из пластика ПЭТ-А (полиэтилентерефталат аморфный) стандартного размера (25 × 75 × 1 мм), обработанную 10%-ной щелочью для лучшей иммобилизации олигонуклеотидов. На поверхности каждой подложки формировали 16 массивов точек; каждый массив включал в себя 150 точек так, что каждый олигонуклеотид наносили не менее чем в трех повторах. Каждый массив включал также позитивный и негативный контроли.

Олигонуклеотиды, разведенные в карбонатном буфере, наносились на подложку в нанолитровых количествах при помощи роботизированной контактной печати на принтере SpotBot®3 от компании “Arrayit”, США. Последовательности олигонуклеотидов являются искусственными и разрабатывались с тем условием, чтобы они не имели 100% гомологии в геномах млекопитающих. Длина всех олигонуклеотидов – 22 нуклеотида, температура плавления 55°C, количество GC-пар – 50%. Аллель-специфичные праймеры для выделенных генетических маркеров содержали на 5'-конце последовательность, обратную комплементарную одному из олигонуклеотидов, напечатанных на пластиковой подложке. На 3'-конце кроме последнего аллель-специфичного нуклеотида был измененный третий нуклеотид с конца. Прайме-

ры были выровнены по температуре плавления и она составляла 59–60°C. При помощи этих праймеров производилось мечение ампликонов в полимеразной цепной реакции. В реакционную смесь добавлялся меченный биотином уридин. После ПЦР меченые ампликоны гибридизовались на микрочип, затем вносили раствор стрептавидина (имеющего большое сродство к биотину), конъюгированного с пероксидазой хрена и инкубировали 15 мин при 37°C, промывали несколько раз фосфатным буфером и добавляли ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид) – субстрат для пероксидазы хрена. Пероксидаза хрена катализирует окисление ТМБ и дает окрашивание от синего до черного цвета.

Метод 2. Массивы точек (спотов) формировали методом бесконтактного нанесения микрокапель растворов ДНК-олигонуклеотидов в 0.125 М карбонатном буферном растворе (рН 10.4) на поверхность подложек из ПММА (полиметилметакрилат) стандартного размера (25 × 75 × 1 мм) при помощи высокоточной комбинированной роботизированной системы (споттера) iONE-600, оснащенной пьезоэлектрическим дозатором (PD-MD) (M2-Automation GmbH, Берлин, Германия). Объем раствора олигонуклеотида, наносимого в одну точку, составлял ~1 нл. Всего использовали 48 искусственно синтезированных олигонуклеотидов, представлявших собой аллельные варианты генов *CSN2* (бета-казеин) и *CSN3* (каппа-казеин) крупного рогатого скота. На 5'-конце были добавлены 10Т и 10С в качестве якоря и спейсера соответственно. На поверхности каждой подложки формировали 16 массивов точек; каждый массив включал в себя 150 точек так, что каждый олигонуклеотид наносили не менее чем в трех повторах. Каждый массив включал также позитивный и негативный контроли. Расстояние между соседними спотами в одном массиве составляло 300 мкм, диаметр каждого спота составлял ~100 мкм. Расстояние между соседними массивами определялось автоматически с использованием программного обеспечения InDot (M2-Automation GmbH). На массив наносилась денатурированная при 95°C ДНК и гибридизовалась при 55°C в течение 30 мин при шейкировании. Затем вносилась реакционная смесь с нуклеотидами, включая меченный биотином уридин, и полимеразой и инкубировалась при 55°C от 5 до 15 мин. После чего массив промывали фосфатным буфером и проявляли стрептавидин-пероксидазой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы с литературными и геномными базами данных сделан выбор хозяйственно значимых признаков КРС, представляющих интерес для заводчиков и исследователей, как промышленных, так и местных аборигенных пород.

Цель – проанализировать их генофонд при помощи создаваемого ДНК-микрочипа. Признаки разделены на три группы: молочная продуктивность и качество молока, мясная продуктивность и качество мяса, генетически обусловленные заболевания и генетически обусловленная устойчивость к заболеваниям.

Соответственно был разработан дизайн 400 аллель-специфичных праймеров для анализа молекулярных маркеров, ассоциированных с хозяйственно значимыми признаками. Параллельно разработан дизайн олигонуклеотидных последовательностей, выровненных по длине и температуре плавления, не встречающихся со 100%-ной гомологией в геномах млекопитающих, для иммобилизации их на микрочипе. Этого достаточно для создания микрочипа на 200 диаллельных молекулярных маркеров. Кроме того, в список признаков были включены молекулярные маркеры, позволяющие идентифицировать животных (так называемый генетический паспорт). Весь список отобранных признаков составляет на настоящее время 208 маркеров, представленных 81 геном (34 гена ассоциированы с молочной продуктивностью и 47 генов ассоциированы с моногенными заболеваниями). В него входят и 43 маркера для идентификации животных. Большинство молекулярных маркеров представляют из себя однонуклеотидные полиморфные локусы (SNP). Однако в списке есть и маркеры, являющиеся инсерциями и делециями от одного до нескольких сотен нуклеотидов. Практически все молекулярные маркеры двухаллельные, и список всех аллелей составляет 417.

Отобранные и созданные олигонуклеотиды предполагалось иммобилизовать на полимерном субстрате при производстве ДНК-микрочипа по методу 1. Обратные комплементарные этим последовательностям олигонуклеотиды включались в состав аллель-специфичных праймеров. На этом этапе отработки технологии были синтезированы комбинированные праймеры для 20 маркеров. Кроме того, были синтезированы аллель-специфичные праймеры без “якорных” олигонуклеотидов для использования их в реал-тайм ПЦР с целью верификации результатов, полученных на ДНК-микрочипах.

В методе 2 на подложку иммобилизовались сами аллель-специфичные праймеры, и реакция мечения биотином проводилась в формате твердофазной ПЦР.

В нашу задачу входило выбрать наиболее эффективный вариант ДНК-чипа из множества платформ микрочипов, включая напечатанные массивы двухцепочечной ДНК и олигонуклеотидов, массивы, синтезированные *in situ*, массивы гранул высокой плотности, электронные микроматрицы и массивы суспензионных гранул. В

связи с этим был проведен ряд экспериментов по отбору и подбору технических условий и молекулярно-генетических характеристик создаваемого ДНК-чипа.

Подбор полимерных материалов для подложки ДНК-чипа

В ходе эксперимента проведены испытания полимерных материалов с целью использования их в качестве субстрата для производства микрочипов. Испытаны два вида листового пластика – ПЭТ-А (полиэтилентерефталат аморфный) и ПЭТ-Г (полиэтилентерефталат модифицированный гликолем). Проведены пробные печати олигонуклеотидов, меченных биотином, на эти субстраты. Олигонуклеотиды разводились разными буферами: карбонатным, фосфатным, SSC, Трис-НСl. Тесты показали, что оба пластика хорошо связывают на своей поверхности олигонуклеотиды, разведенные в 0.125 М карбонатном буфере pH 10.5. Однако ПЭТ-А без предварительной обработки оказался достаточно гидрофобным и капли растворов олигонуклеотидов на его поверхности формировались плохо. ПЭТ-Г оказался более гидрофильным и капли растворов на его поверхности формировались вполне удовлетворительно. Для повышения гидрофильности подложки из ПЭТ-А были обработаны 10%-ном раствором NaOH, 1%-ным раствором H₂O₂, 0.1%-ным раствором SDS и 0.1%-ным раствором Tween-20. Время обработки составило от 15 мин до двух часов. После обработки субстраты промывали не менее 5 раз в дистиллированной воде, высушивались, и на них наносили одинаковый набор меченных биотином олигонуклеотидов. После печати микрочипы выдерживались не менее одного часа при комнатной температуре и влажности, затем проявлялись. Для этого микрочипы клеивались на двухсторонний скотч в кассеты из тефлона (рис. 2), имеющие ячейки объемом 300 мкл, в которые вносили раствор 2%-ного казеина и 1%-ной сахарозы для блокировки поверхности субстрата вне точек печати.

После инкубации в течение одного часа при комнатной температуре раствор удаляли и субстрат просушивали. Потом в ячейки вносили раствор стрептавидина (имеющего большое сродство к биотину), конъюгированного с пероксидазой хрена, и инкубировали 15 мин при 37°C, промывали несколько раз фосфатным буфером и добавляли ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид) – субстрат для пероксидазы хрена. После инкубации при 37°C в течение 10 мин ячейки промывали водой и высушивали. Пероксидаза хрена катализирует окисление ТМБ и дает окрашивание от синего до черного цвета. Интенсивность окрашивания пятна зависит от количества олигонуклеотида и сте-

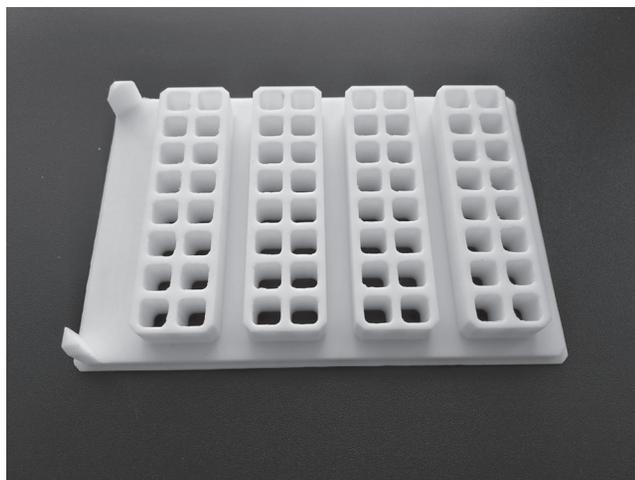


Рис. 2. Кассета для процессинга микрочипов.

пени связывания его с субстратом. На рис. 3 и 4 приведены результаты этих экспериментов.

По результатам проведенного эксперимента лучшие показатели были у субстрата из ПЭТ-А, обработанного 10%-ной щелочью в течение двух часов. Такая обработка давала более четкие пятна и обеспечивала лучшую стабильность печати от субстрата к субстрату. Добавление различных детергентов в буфер для печати также повышало гидрофильность субстрата из ПЭТ-А, но пятна неконтролируемо расплывались, и чтобы они не слились друг с другом приходилось увеличивать между ними расстояние, что увеличивало общий размер массива из точек.

Этот эксперимент показал, что выбранный метод детекции позволяет выявлять точки печати с концентрацией олигонуклеотидов равной 0.1 мМ. Лучшее качество печати, стабильность и размер пятен показал ПЭТ-А, обработанный 10% NaOH, при печати на нем олигонуклеотидов в 0.125 М карбонатном буфере рН 10.5 без добавления детергентов.

В методе 2 использовали подложку из ПММА (оргстекла) без какой-либо предварительной обработки, кроме промывки в воде для удаления пыли, олигонуклеотиды иммобилизовались луч-

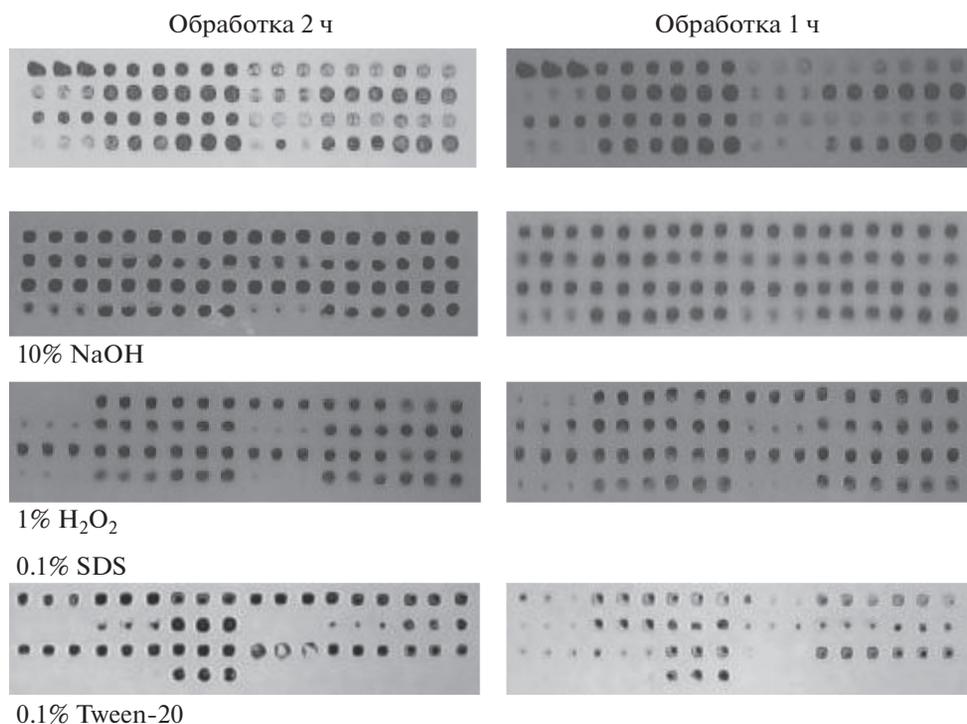


Рис. 3. Результаты обработки субстратов из ПЭТ-А для повышения гидрофильности и улучшения качества печати. Каждый образец напечатан в трех повторах (по 3 точки). Левые 9 столбцов – 10-микромольный олигонуклеотид, меченный биотином. Правые 9 столбцов – 2-микромольный олигонуклеотид, меченный биотином. Перед печатью растворы всех олигонуклеотидов были смешаны с буферами 1 : 1. Последовательность точек: первая линия: первые и четвертые три точки – 1 М карбонатный буфер рН 10.5, вторые и пятые три точки – 0.5 М карбонатный буфер рН 10.5; третьи и шестые три точки – 0.25 М карбонатный буфер рН 10.5; вторая линия: то же, что и в первой линии, но с добавлением во все буферы 0.1% SDS; третья линия: первые и четвертые три точки – 1 М карбонатный буфер рН 11.5, вторые и пятые три точки – 0.5 М карбонатный буфер рН 11.5, третьи и шестые три точки – 0.25 М карбонатный буфер рН 11.5; четвертая линия: то же, что и в третьей линии, но с добавлением во все буферы 0.1% SDS.

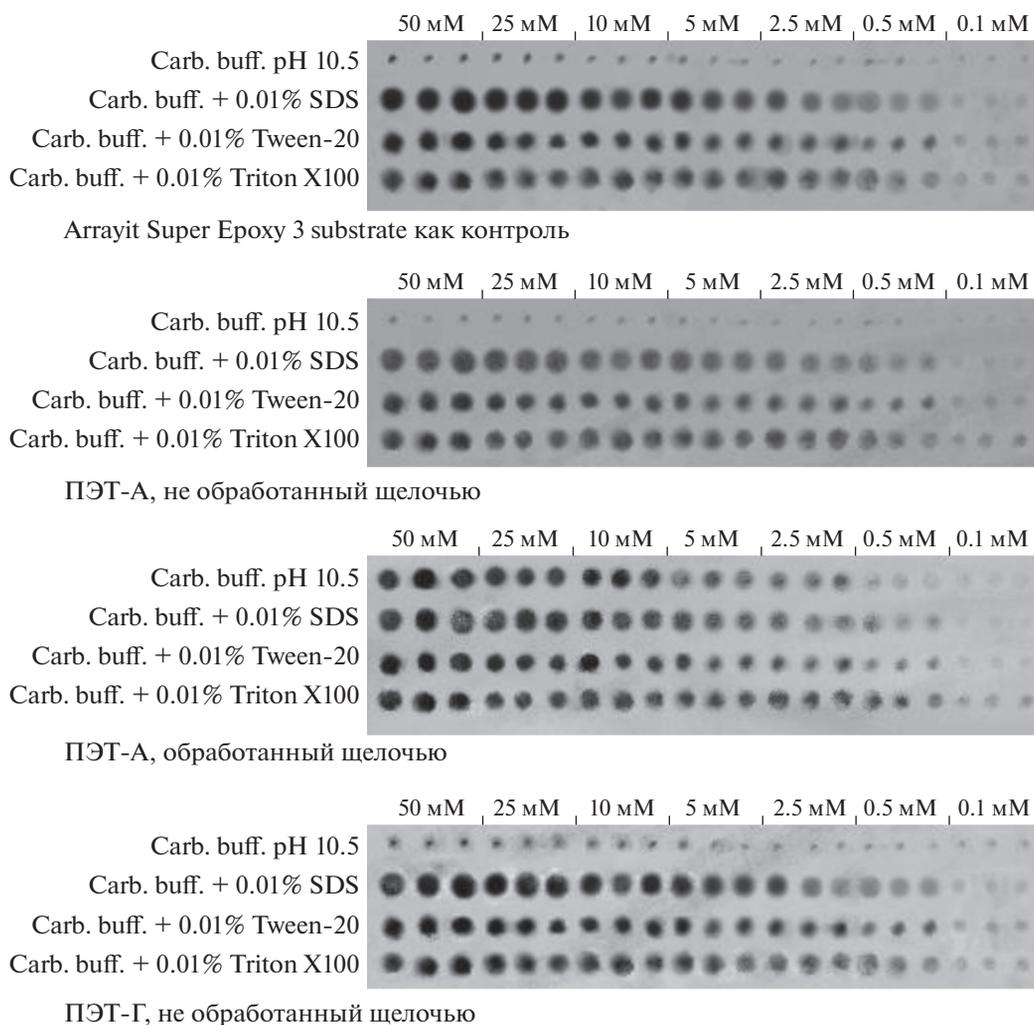


Рис. 4. Результаты эксперимента по чувствительности метода и влиянию различных детергентов на качество печати.

ше, поэтому был использован данный вид пластика толщиной 1 мм с дополнительной защитой от ультрафиолета и пластик толщиной 1.5 мм без таковой защиты. Также разработаны пластины из того же пластика толщиной 3 мм для формирования реакционных камер вокруг массивов из точек нанесения олигонуклеотидов. Опробованы разные методы скрепления подложек и пластин. При таком способе нанесения на одной подложке размером 25 × 75 × 1 мм можно уместить 16 массивов по 650 точек в каждом, что позволит анализировать примерно 110 маркеров. Внешний вид разрабатываемого ДНК-микрочипа представлен на рис. 5.

Полимеразная цепная реакция в методе 1

Для проверки результатов генотипирования при помощи микрочипа были разработаны и синтезированы меченые зонды для проведения TaqMan полимеразной цепной реакции. Эксперименты по

мечению ампликонов были проведены с использованием четырех различных ДНК-полимераз: Taq, Pfu, Tth, SNP-detect. Результаты оказались примерно одинаковыми. Дальнейшие эксперименты проводились с использованием только Taq полимеразы и традиционной реал-тайм ПЦР с Sybr-green в качестве красителя. При небольшом количестве анализируемых маркеров можно ставить моноплексные ПЦР для мечения, однако при большом количестве маркеров выход только в мультиплексных реакциях, т.е. одновременном внесении нескольких десятков аллель-специфичных праймеров в одну реакционную смесь. Проведена серия экспериментов по мечению биотином ампликонов в мультиплексных реакциях, однако в них наблюдалось неспецифическое мечение. В связи с этим дальнейшие эксперименты были направлены на подбор условий проведения мультиплексных реакций со строгой специфичностью мечения биотином.

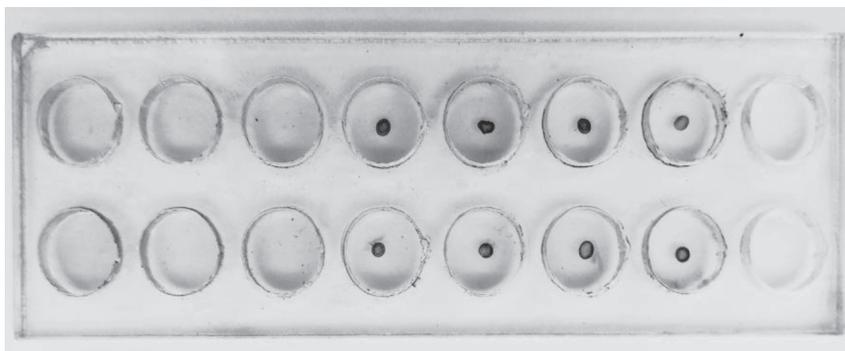


Рис. 5. Внешний вид разрабатываемого ДНК-микрочипа на этапе отработки технологии иммобилизации олигонуклеотидов, мечения и выявления продуктов реакции. Олигонуклеотиды наносились вручную микропипеткой.

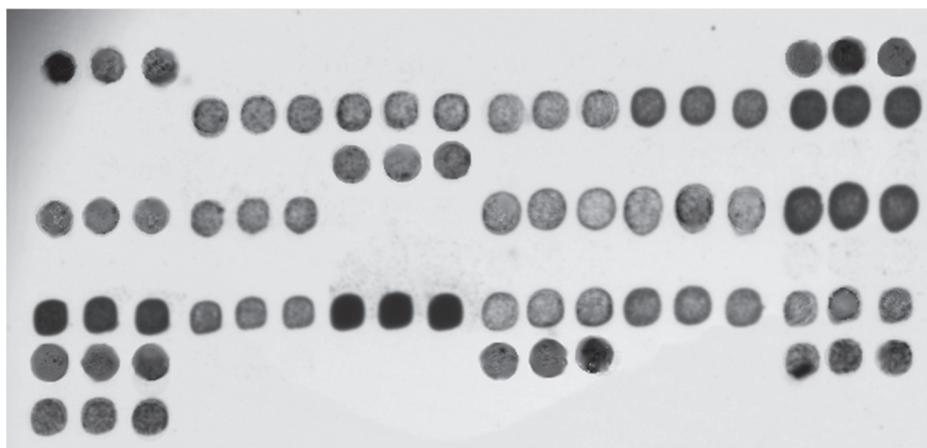


Рис. 6. Результаты мечения и гибридизации ампликонов с аллель-специфичных праймеров на ДНК-микрочип. Последние три точки в седьмом ряду и первые три в восьмом — положительные контроли на процесс окрашивания, предварительно меченные биотином последовательности из генома *E. coli*. Остальные точки в восьмом ряду — те же последовательности, не меченные биотином, они служили негативными контролями процессов гибридизации и окрашивания.

Мечение биотином

Проведены эксперименты по мечению биотинном фрагментов ДНК. Для этого в ПЦР использовали вместо стандартной смеси нуклеотидов смесь, содержащую по 100% аденина, гуанина, цитозина и 90% тимина + 10% меченного биотином уридина. Применяли асимметричную моноплексную ПЦР, т.е. с использованием только аллель-специфичных праймеров в отдельных пробирках. Полученные в результате реакции ампликоны гибридизовали на микрочипах. Для этого их смешивали и разводили в $2\times$ SSC буфере с добавлением 1% казеина, наносили на заблокированные микрочипы и инкубировали при 52°C в течение 30 мин. Далее отмывали в фосфатном буфере и выявляли описанным выше способом. На рис. 6 показаны результаты мечения биотином и гибридизации

полученных ампликонов с базовых и мутантных аллелей маркеров.

Результаты проведенных экспериментов показали, что мечение ампликонов в моноплексных ПЦР (реакция с каждым аллель-специфичным праймером проводится в отдельной пробирке) проходит адекватно, однако при мультиплексных реакциях, т.е. при одновременном внесении нескольких десятков аллель-специфичных праймеров в одну реакционную смесь, в них наблюдалось неспецифическое мечение. Причины этого, по-видимому, в неспецифичном отжиге праймеров друг на друга и ошибках ДНК-полимеразы. Нам не удалось подобрать условия реакции для мультиплексной ПЦР. При большом количестве анализируемых маркеров моноплексные ПЦР становятся трудо- и средствеозатратными.

*Иные способы мечения
ДНК фрагментов в методе 1*

В ходе эксперимента нами были опробованы и другие методы мечения аллель-специфичных олигонуклеотидов. Один из них – это получение меченых фрагментов ДНК при помощи ДНК-лигазной цепной реакции. В этом методе используется термостабильная ДНК-лигаза вместо ДНК-полимеразы и в дополнение в аллель-специфичному праймеру используется меченный биотином зонд, сравнимый по температуре плавления с праймерами. Зонд начинается сразу за последним аллель-специфичным нуклеотидом, и если этот нуклеотид комплементарен нуклеотиду на матрице, то происходит сшивание праймера с зондом. Далее процесс повторяется многократно. Если последний нуклеотид не комплементарен матричному, то сшивания праймера с меченым зондом не происходит. При этом такой метод мечения более специфичен, чем мечение ДНК-полимеразами в обычной ПЦР, потому что даже при ошибке ДНК-лигазы не происходит амплификации ошибочно меченого фрагмента, как при мечении ДНК-полимеразами. Подробно об этом методе можно прочитать в обзоре [38]. Данную реакцию можно проводить с использованием нескольких десятков аллель-специфичных праймеров и меченых зондов в одной пробирке, поскольку даже при неправильном отжиге праймеров или зондов не произойдет их сшивания и соответственно мечения. Далее процесс гибридизации на микрочип и проявление аналогичны описанному выше. Кроме отмеченных достоинств у этого метода есть и недостаток, который заключается в дороговизне используемых реактивов – термостабильной ДНК-лигазы и меченных биотином зондов по сравнению с обычной Taq полимеразой и меченым уридином.

В последние годы активно развиваются методы производства ДНК-микрочипов, которые существенно снижают их стоимость и упрощают их использование [38–42]. В этих статьях описываются методы иммобилизации олигонуклеотидов на необработанный пластик, фиксации их при помощи ультрафиолетового облучения и гибридизации на них меченых зондов с последующим проявлением. Наиболее перспективными (востребованными на практике) выглядят следующие параметры таких микрочипов: легкость, дешевизна производства и простота анализа. Проведя серию экспериментов, обобщив опубликованные результаты, адаптировав их под задачи генотипирования одомашненных видов животных, была предложена следующая схема производства микрочипов и анализа геномов КРС. Олигонуклеотиды, которые являются аллель-специфичными праймерами, должны иметь на 5'-конце “хвост” из 10Т и 10С. Они печатаются на роботизированном

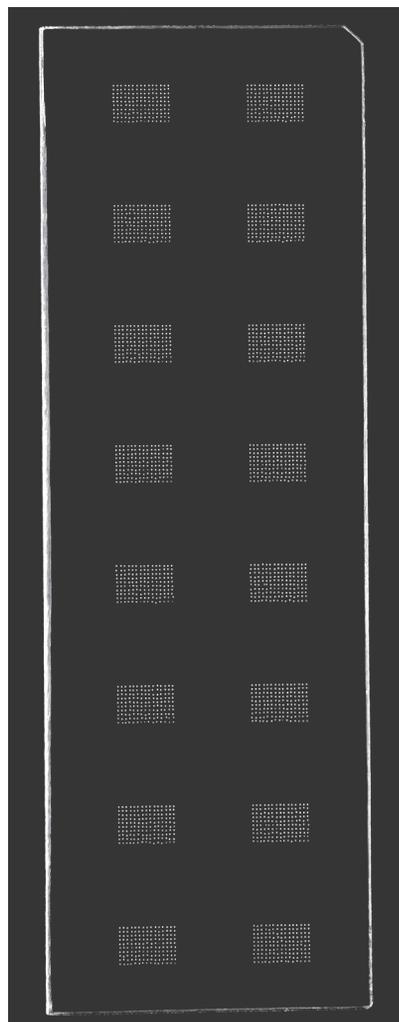


Рис. 7. Общий вид подложки с напечатанными 16 массивами по 150 спотов в каждом.

принтере на подложки из пластика (polymethyl methacrylate – PMMA), известного как оргстекло, толщиной 1 мм и после высыхания закрепляются на нем обработкой в ультрафиолетовой камере с излучением 254 нм и мощностью 3 мВ/см² в течение 10 мин (рис. 7 и 8).

Последовательность из 10Т надежно прикрепляется к подложке, а последовательность из 10С является спейсером между подложкой и собственно праймером. После этого микрочип обрабатывается в блокирующем буфере (можно использовать раствор бычьего сывороточного альбумина или молочного казеина) и промывается в фосфатном буфере. Далее микрочип вставляется в камеру с ячейками, в которые вносятся реакционная смесь для обычной ПЦР с меченым биотином тимином, но без ДНК матрицы и полимеразы. Камера помещается в термостат на 55°C на 5–10 мин прогрева. Это предоставляет возможность праймерам “распрямиться” в жидкой среде, оставаясь прикрепленными

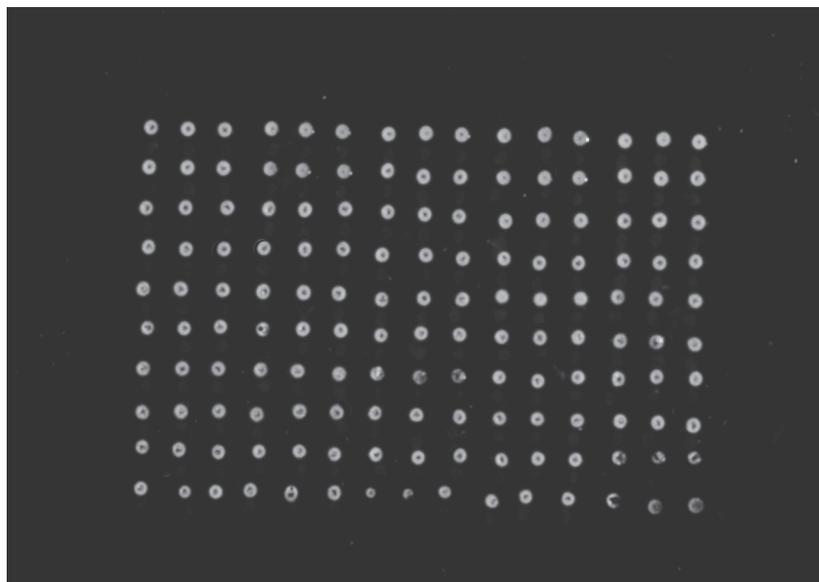


Рис. 8. Массив из 150 спотов после печати на бесконтактном споттере iONE-600.

ми к подложке через 10С спейсер. Тем временем ДНК, термоактивированная полимераза в части реакционной смеси прогреваются в другом термостате на 95°C в течение 5–10 мин и помещаются на лед. После чего эта смесь вносится в ячейки камеры и инкубируется при 55°C в течение 5–30 мин при легком перемешивании. За это время происходит процесс отжига ДНК матрицы на праймеры и элонгации цепи олигонуклеотида с одновременным мечением биотином. После этого ячейки с микрочипами споласкиваются в буфере и проявляются, как было описано выше. В этом методе совмещаются процессы гибридизации и мечения, что уменьшает время анализа. Одновременно все аллель-специфичные праймеры находятся в реакционной смеси, но они не могут взаимодействовать друг с другом как в мультиплексной ПЦР, поскольку иммобилизованы на подложке, а потому не дают неспецифического мечения. Поскольку сама реакция является одноциклической и изотермальной, не происходит умножения неспецифических ампликонов и ложного сигнала.

Разработка праймеров

Аллель-специфичные праймеры для выбранных генетических маркеров содержали на 3'-конце кроме последнего аллель-специфичного нуклеотида измененный третий нуклеотид с конца. Праймеры были выровнены по температуре плавления. Она составляла 59–60°C. Аллель-специфичные праймеры были иммобилизованы на поверхности подложки и методом ПЦР проводилось мечение синтезируемых последовательностей биотином. После чего включенный в ампликоны биотин выявлялся свя-

зыванием с комплексом стрептавидин–пероксидаза хрена и окрашиванием с субстратом для пероксидазы. Подбор некоторых характеристик осуществлялся в программе OligoCalc [43].

В настоящей работе для верификации данных (корректности работы чипа) был исследован полиморфизм двух генов, кодирующих казеины молока: *CSN3* – ген каппа-казеина и *CSN2* – ген бета-казеина у абердин-ангуса. В табл. 1 и 2 представлены генотипы аллелей казеинов согласно международной классификации (<https://www.icbf.com/>).

Количественные результаты ПЦР в реальном времени (рис. 9 и 10) соответствовали результатам данных, полученных с помощью ДНК-микрочипа (рис. 11). Таким образом можно сделать вывод, что разработанный прототип ДНК-чипа и условия для его печати и анализа генотипа соответствуют предъявляемым условиям для генотипирования КРС по известным SNP генов-кандидатов.

В России в начале 90-х гг. прошлого века насчитывалось более 20 млн голов крупного рогатого скота. В настоящее же время численность поголовья составляет около 8 млн (Единая Межведомственная Информационно-Статистическая Система, 2019) [44]. Таким образом, в течение последних двух десятилетий количество КРС уменьшилось более чем на порядок. Резкое снижение численности поголовья крупного рогатого скота (практически во всех видах сельскохозяйственных животных) в конце XX в. не могло не отразиться на уровне генетического разнообразия, в связи с чем необходимо использовать современные подходы для оценки и поддержания высокого уровня аллельного разнообразия известных генов, ассоциируемых с продуктивностью, жизнеспособностью, здоро-

Таблица 1. Реал-тайм ПЦР-анализ ДНК абердин-ангусской породы КРС по гену *CSN3*

Позиция нуклеотида SNP	Аллельные варианты гена												
	A	A1	B	B2	C	D	E	F1	F2	G1	H	I	J
c.92	G								A				
c.342	T			C									
c.352	C									T			
c.353	G				A	A							
c.373	T											G	
c.467	C									T	T		
c.470	C		T	T	T								T
c.498	T							G					
c.506	A		C	C	C			T					C
c.513	A	G											
c.521	T			C									
c.526	A						G						
c.564	T			C									
c.567	A		G	G	G								

Красным выделены аллели, выявленные у конкретного животного.

Таблица 2. Реал-тайм ПЦР-анализ ДНК абердин-ангусской породы КРС по гену *CSN2*

Позиция нуклеотида SNP	Аллельные варианты гена										
	A1	A2	A3	B	C	E	F	G	H1	H2	I
c.118	C								T		
c.151	G				C						
c.154	G					A					
c.245	A	C	C			C				C	C
c.259	C									G	
c.307	C								A		
c.322	A									C	C
c.363	C		A								
c.411	C			G							
c.500	C						T				

Красным выделены аллели, выявленные у конкретного животного.

вьем сельскохозяйственных животных. Информация о генетической структуре пород важна для разведения как в настоящее время, во избежание неблагоприятных последствий инбридинга, эпизоотий, так и в будущем при создании новых пород для различных условий разведения и содержания.

Вопросы изучения генетического потенциала, разнообразия, структуры отечественных пород сельскохозяйственных животных на основе информации, закодированной в их геномах, с целью

использования полученных данных в селекции поддержаны рядом государственных программ. Технология ДНК-микрочипов низкой плотности может стать эффективным инструментом, альтернативным подходом к традиционному пост-ПЦР-саузерн-блоттингу и одной из самых важных технологий последнего времени в отечественном животноводстве.

Новая универсальная система генотипирования крупного рогатого скота позволяет анализировать практически все известные и вновь откры-

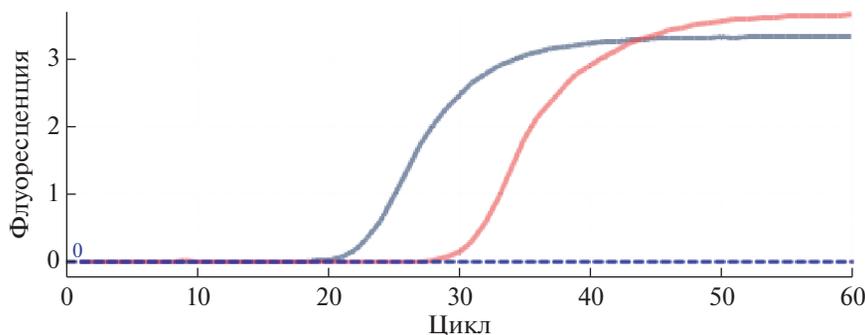


Рис. 9. Графики реал-тайм ПЦР-маркера *CSN3-513*. Серый — аллель G, красный — аллель A.

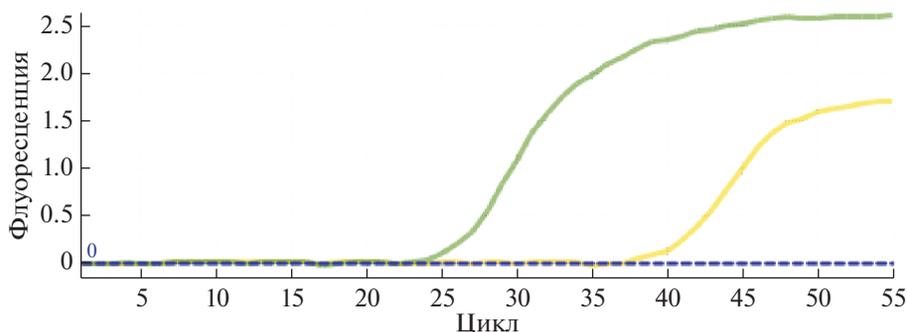


Рис. 10. Графики реал-тайм ПЦР-маркера *CSN2-245*. Зеленый — аллель C, желтый — аллель A.

ваемые SNP с известными функциями. То есть является быстрым, недорогим и эффективным инструментом для тестирования полиморфизма генов. С помощью технология ДНК-чипов открываются новые возможности для генетической паспортизации животных, пород и популяций, определения племенной ценности животных, корреляций между SNP генов и их взаимодействием.

Очевидно, что предлагаемая технология может быть использована на других видах животных, а также растений. Это инструмент для генетико-селекционных экспериментов, мониторинга и сохранения генетического разнообразия в породах, искусственного отбора и подбора пар для скрещивания и т.д. Безусловно, есть некоторые ограничения ДНК-микрочипов, связанные с кинетикой гибридизации, а также трудности при создании массивов для сильно изменчивых геномов.

Мультиплексная амплификация ДНК с аллель-специфичными праймерами с одновременным мечением биотином, гибридизация полученных меченых ампликонов с олигонуклеотидами, иммобилизованными на чип-слайде, и последующая ферментативная окраска гибридизовавшихся молекул с детекцией при помощи автоматического ридера позволят быстро и дешево генотипировать большие массивы животных. Информация о большом количестве генов, ассо-

циированных с различными фенотипическими признаками, потребует разработать программное обеспечение для анализа результатов и формирования селекционных рекомендаций для отечественного животноводства.

Биоинформатика, т.е. использование математических и статистических методов, играет решающую роль на завершающей стадии этой технологии, поскольку позволяет оценивать результаты генотипирования на микрочипах, а также анализировать полученные генотипы, их взаимодействия друг с другом и связь с фенотипами животных и формировать рекомендации для их дальнейшего использования.

Микромассивы олигонуклеотидов можно применять в качестве эффективного альтернативного или дополнительного параллельного подхода в геномной селекции, основанного на данных, полученных с помощью чипов высокой плотности.

В рамках проекта разработан чип-слайд для анализа мутаций в геномах любых видов млекопитающих, связанных с риском развития генетически обусловленных заболеваний, или определяющих хозяйственно значимые признаки на примере генома крупного рогатого скота, обладающий следующими преимуществами по сравнению с аналогами: время на проведение анализа — около трех часов, использование только хорошо изученных SNP —

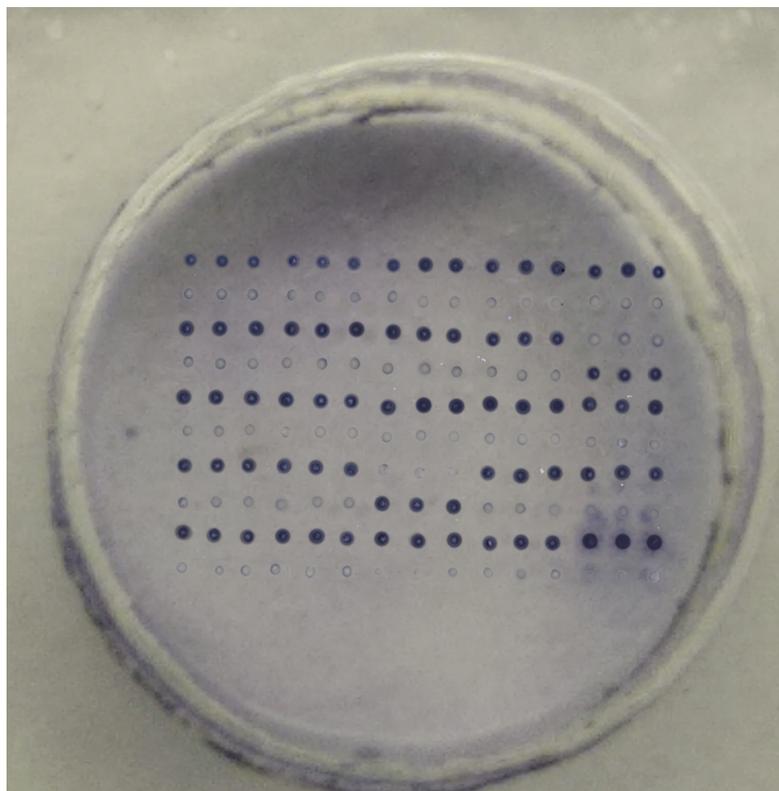


Рис. 11. Один из массивов после гибридизации с ДНК абердин-ангуса, мечения и проявки. В нечетных рядах – базовые аллели, в четных – мутантные аллели. Последние три точки в четвертом ряду – аллель G маркера *CSN3-513*; 7-я, 8-я и 9-я точки в восьмом ряду – аллель C маркера *CSN2-245*. Результат полностью соответствует результату реал-тайм ПЦР.

нет избыточной информации, как нет необходимости в использовании дорогих высокопроизводительных секвенаторов, для проведения анализа не нужен высококвалифицированный персонал – анализ может проводить лаборант. И наконец, созданные на основе анализа данных ДНК-чипа рекомендации помогут селекционерам, ветеринарам и владельцам животных принять правильное решение в диагностике и прогнозировании, разработать точные и эффективные стратегии разведения и сохранения отечественных животных.

Работа выполнена при поддержке гранта 19-76-20061 РФФИ (<http://rscf.ru>).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Matukumalli L.K., Lawley C.T., Schnabel R.D. et al.* Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 4. e5350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005350>
2. *Kijas J.W., Townley D., Dalrymple B.P. et al.* A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 3. e4668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004668>
3. *McCue M.E., Bannasch D.L., Petersen J.L. et al.* A high density SNP array for the domestic horse and extant *Perissodactyla*: utility for association mapping, genetic diversity, and phylogeny studies // *PLoS Genetics*. 2012. V. 8. № 1. e1002451. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002451>
4. *Столповский Ю.А., Пискунов А.К., Свищева Г.Р.* Геномная селекция. I. Последние тенденции и возможные пути развития // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 9. С. 1006–1017. <https://doi.org/10.31857/S0016675820090143>
5. *Столповский Ю.А., Свищева Г.Р., Пискунов А.К.* Геномная селекция. II. Перспективные направления // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 10. С. 1107–1114. <https://doi.org/10.31857/S0016675820100124>
6. *Boichard D., Chung H., Dasonneville R. et al.* Design of a bovine low-density SNP array optimized for imputation // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 3. e34130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034130>
7. *Bolormaa S., Gore K., van der Werf J.H.J. et al.* Design of a low-density SNP chip for the main Australian sheep breeds and its effect on imputation and genomic prediction accuracy // *Animal Genetics*. 2015. V. 46. № 5. P. 544–556. <https://doi.org/10.1111/age.12340>

8. *Aliloo H., Mrode R., Okeyo A.M. et al.* The feasibility of using low-density marker panels for genotype imputation and genomic prediction of crossbred dairy cattle of East Africa // *J. Dairy Sci.* 2018. V. 101. № 10. P. 9108–9127.
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14621>
9. *Шашкова Т.И., Мартынова Е.У., Аюпова А.Ф. и др.* Разработка панели низкой плотности для геномной селекции свиней в России // *Трансляционная наука о животных.* 2020. Т. 4. Вып. 1. С. 264–274.
<https://doi.org/10.1093/tas/txz182>
10. *Reverter A., Hudson N.J., McWilliam S. et al.* A low-density SNP genotyping panel for the accurate prediction of cattle breeds // *J. Animal Sci.* 2020. V. 98. № 11. skaa337.
<https://doi.org/10.1093/jas/skaa337>
11. *Alexandre P.A., Li Y., Hine B.C. et al.* Bias, dispersion, and accuracy of genomic predictions for feedlot and carcass traits in Australian Angus steers // *Genet. Sel. Evol.* 2021. V. 53. P. 77.
<https://doi.org/10.1186/s12711-021-00673-8>
12. *Coffey M.* Dairy cows: in the age of the genotype, phenotypeisking // *Animal Frontiers.* 2020. V. 10. № 2. P. 19–22.
<https://doi.org/10.1093/af/vfaa004>
13. *Solodneva E.V., Piskunov A.K., Stolpovsky Y.A., Kuznetsov S.B.* Digital phenotyping technologies: an emerging tool in genomic selection and animal welfare science? // *E3S Web Conf. EDP Sciences.* 2021. V. 285. P. 04015.
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202128504015>
14. *Sulimova G.E., Sokolova S.S., Semikozova O.P. et al.* Analysis of DNA polymorphisms of clustered genes in cattle: Casein genes and genes of the major histocompatibility complex (BOLA) // *Tsitol. Genetika.* 1992. V. 26. P. 18–26.
15. *Tantia M.S., Vijh R.K., Mishra B.P. et al.* DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds // *BMC Vet. Res.* 2006. V. 2. № 1. P. 1–5.
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-32>
16. *Grisart B., Farnir F., Karim L. et al.* Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition // *PNAS.* 2004. V. 101. № 8. P. 2398–2403.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0308518100>
17. *Mohammadabadi M.R., Torabi A., Tahmourespoor M. et al.* Analysis of bovine growth hormone gene polymorphism of local and Holstein cattle breeds in Kerman province of Iran using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) // *African J. Biotechnol.* 2010. V. 9. № 41. P. 6848–6852.
<https://doi.org/10.5897/AJB10.799>
18. *Moravcikova N., Trakoviccka A., Hazuchova E., Bujko J.* Associations between polymorphisms in the leptin gene and milk production traits in Pinzgau and Slovak Spotted cattle // *Acta Agriculturae Slovenica.* 2012. V. 100. Suppl. 3. P. 259–263.
19. *Akad I.A.Ş., Mengi A., Öztapak K.Ö.* A determination of growth hormone receptor gene polymorphisms in East Anatolian Red cattle, South Anatolian Red cattle, and Turkish Grey cattle // *Turkish J. Vet. and Animal Sci.* 2012. V. 36. № 1. P. 27–33.
20. *Kanae Yu., Endoh D., Nagahata H. et al.* A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis // *J. Vet. Diagnostic Invest.* 2005. V. 17. № 3. P. 258–262.
<https://doi.org/10.1177/104063870501700309>
21. *Thomsen B., Horn P., Panitz F. et al.* A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation // *Genome Res.* 2006. V. 16. № 1. P. 97–105.
<https://doi.org/10.1101/gr.3690506>
22. *Куйко Е., Кургузкин В., Саморуков Ю., Марзанов Н.* Оценка аллелофонда быков-производителей по каппа-казеину и BLAD-синдрому // *Вет. патология.* 2008. № 3. С. 38–40.
23. *Barendse W., Bunch R.J., Kijas J.W., Thomas M.B.* The effect of genetic variation of the retinoic acid receptor-related orphan receptor C gene on fatness in cattle // *Genetics.* 2007. V. 175. № 2. P. 843–853.
<https://doi.org/10.1534/genetics.106.064535>
24. *Matsushashi T., Maruyama S., Uemoto Y. et al.* Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle // *J. Animal Sci.* 2011. V. 89. № 1. P. 12–22.
<https://doi.org/10.2527/jas.2010-3121>
25. *Тюлькин С.В., Нургалиев Ф.М., Ахметов Т.М., Вафин Р.Р.* Идентификация мутаций генов *mstn* и *RyR1*, связанных с мясной продуктивностью животных // *Уч. зап. Казанской гос. академии вет. медицины им. Н.Э. Баумана.* 2012. Т. 212. № 4. С. 390–395.
26. *Szreder T., Zwierzchowski L.* Polymorphism within the bovine estrogen receptor-alpha gene 5'-region // *J. Applied Genet.* 2004. V. 45. № 2. P. 225–236.
27. *Костенко С.А., Сидоренко Е. В.* Влияние полиморфизма гена эстроген-рецептора на спермопродуктивность хряковразных пород // *Зоотехнич. наука Беларуси.* 2011. Т. 46. № 1. С. 105–112.
28. *Kulesh D.A., Clive D.R., Zarlenga D.S., Greene J.J.* Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences // *PNAS.* 1987. V. 84. P. 8453–8457.
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.23.8453>
29. *Lashkari D.A., DeRisi J.L., McCusker J.H. et al.* Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis // *PNAS.* 1997. V. 94. P. 13057–13062.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13057>
30. *Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // *Sci. J.* 1995. V. 270. P. 467–470.
<https://doi.org/10.1126/science.270.5235.467>
31. *Khrapko Yu.P., Lysov A.A., Khorlin I.B. et al.* A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix // *DNA Seq.* 1991. V. 1. № 6. P. 375–388.
<https://doi.org/10.3109/10425179109020793>

32. Prasad A., Mohammad Abid Hasan S., Grouchy S., Gartia M.R. DNA microarray analysis using a smartphone to detect the BRCA-1 gene // *Analyst*. 2019. V. 144. P. 197–205.
<https://doi.org/10.1039/C8AN01020J>
33. Кузнецов С.Б., Михайловский М.В. Создание ДНК-микрочипа для выявления генетической предрасположенности к идиопатическому сколиозу // *Международ. журн. прикл. и фундамент. исследований*. 2018. № 11. С. 67–74.
34. Adebayo O. *Staphylococcus aureus* from Nigeria and South Africa // *PLoS One*. 2021. Publ. online: July 20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237124>
35. Nsofor C.A. DNA microarrays and their applications in medical microbiology // *Biotechnol. and Mol. Biol. Rev.* 2014. V. 9. № 1. P. 1–11.
<https://doi.org/10.5897/BMBR2013.0216>
36. Korkor M.T., Meng F.B., Xing S.Y. et al. Microarray analysis of differential gene expression profile in peripheral blood cells of patients with human essential hypertension // *Int. J. Med. Sci.* 2011. V. 8. № 2. P. 168–179.
<https://doi.org/10.7150/ijms.8.168>
37. Damin F., Galbiati S., Gagliardi S. et al. CovidArray: A microarray-based assay with high sensitivity for the detection of Sars-Cov-2 in nasopharyngeal swabs // *Sensors*. 2021. V. 21. P. 2490.
<https://doi.org/10.3390/s21072490>
38. Gibriel A.A., Adel O. Advances in ligase chain reaction and ligation-based amplifications for genotyping assays: Detection and applications // *Mut. Res.* 2017. V. 773. P. 66–90.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.001>
39. Dufva M. Fabrication of high quality microarrays // *Biomol. Engineering*. 2005. V. 22. № 5–6. P. 173–184.
<https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2005.09.003>
40. Dufva M., Petersen J., Stoltenborg M. et al. Detection of mutations using microarrays of poly(C)10–poly(T)10 modified DNA probes immobilized on agarose films // *Analytical Biochemistry*. 2006. V. 352. P. 188–197.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.008>
41. Kimura N. One-step immobilization of poly(dT)-modified DNA onto non-modified plastic substrates by UV irradiation for microarrays // *Biochem. Biophys. Res. Communications*. 2006. V. 347. P. 477–484.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.130>
42. Sun Y., Perch-Nielsen I., Dufva M. et al. Direct immobilization of DNA probes on non-modified plastics by UV irradiation and integration in microfluidic devices for rapid bioassay // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. P. 741–748.
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5459-4>
43. Kibbe W.A. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator // *Nuc. Ac. Res.* 2007. V. 35. № 2. P. W43–W46.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm234>
44. Фёдорова Е.В. Поголовье скота и птицы в хозяйствах всех категорий // *ЕМИСС. Гос. статистика (база данных)*. 2019.

New Cattle Genotyping System Based on DNA Microarray Technology

Yu. A. Stolpovsky^{a, *}, S. B. Kuznetsov^a, E. V. Solodneva^a, and I. D. Shumov^b

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bOrekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119435 Russia

*e-mail: stolpovsky@mail.ru

A prototype test system has been developed to identify genetic markers of productivity, to determine purebred breeding, monogenic diseases of cattle in the format of a DNA microarray. A method has been developed for immobilizing of oligonucleotides on a polymer base, fixing them using ultraviolet irradiation and hybridizing DNA on it, followed by labeling and determination of genotypes. Genotyping of two genes encoding milk caseins: *CSN3* – gene for kappa-casein and *CSN2* – gene for beta-casein of the Aberdeen Angus breed using a real-time PCR and a created DNA microarray showed identical results. Potential possibilities of using the technology of DNA microarrays, its principle and possibilities of application in animal husbandry for genetic selection work are considered: monitoring, determination of genetic potential and diversity in breeds and populations of cattle, and agrobiodiversity in general.

Keywords: DNA microarray, cattle, candidate genes, genomic selection, genotyping, genetic diversity.