

Р.Р. Вафин
Х.Х. Гильманов ✉
П.Н. Шастин
А.В. Супова

Федеральный научный центр —
Всероссийский научно-исследовательский
институт экспериментальной ветеринарии
им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН,
Москва, Россия

✉ gilmanov.xx@mail.ru

Поступила в редакцию:
22.11.2023
Одобрена после рецензирования:
10.01.2024
Принята к публикации:
30.01.2024

Research article
DOI: 10.32634/0869-8155-2024-379-2-66-70

Ramil R. Vafin
Khamid Kh. Gilmanov ✉
Pavel N. Shastin
Anastasia V. Supova

Federal Scientific Centre VIEV, Moscow,
Russia

✉ gilmanov.xx@mail.ru

Received by the editorial office:
22.11.2023
Accepted in revised:
10.01.2024
Accepted for publication:
30.01.2024

Моделирование способа ПЦР-ПДРФ-генотипирования крупного рогатого скота по полиморфным маркерам гена *iNOS*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Изучение полиморфизма гена *iNOS Bos taurus* и его ассоциативной связи с резистентностью к лейкозу крупного рогатого скота, а также с племенной ценностью по показателям молочной продуктивности является актуальным предметом исследования генетико-селекционной направленности.

Цели исследования — выявление и картирование полиморфных сайтов рестрикции у 4 SNP-маркеров (*AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*) гена *iNOS Bos taurus* с последующим ПЦР-ПДРФ-профилированием встречаемых генотипов и моделированием способа генотестирования крупного рогатого скота по перечисленным полиморфным маркерам анализируемого локуса.

Методы. Действенным инструментом визуализации результата компьютерной симуляции эксперимента, способствовавшим прогнозированию применимости разрабатываемого способа генотестирования, стало *in silico* моделирование генерируемых ПЦР-ПДРФ-профилей встречаемых генотипов полиморфных маркеров гена *iNOS Bos taurus*. При этом сам результат картирования выявленных полиморфных сайтов рестрикции и последующего профилирования встречаемых генотипов свидетельствовал о технической возможности детектирования методом ПЦР-ПДРФ-анализа полиморфных позиций 4 SNP-маркеров гена *iNOS Bos taurus*. Это в свою очередь инициировало моделирование способа генотестирования крупного рогатого скота по перечисленным полиморфным маркерам с предусмотрением последовательных этапов выделения ДНК из цельной консервированной крови крупного рогатого скота, постановки ПЦР с олигонуклеотидными праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R*, проведения ПДРФ с подобранными эндонуклеазами рестрикции (*HinfI*, *Sau96I* (изошизомер *AspS9I*), *HpyAV* и *MluCI* (изошизомер *Sse9I*)), а также выполнения гель-электрофорезной детекции с визуализацией полученных электрофореграмм в УФ-трансиллюминаторе.

Ключевые слова: *iNOS*, *Bos taurus*, SNP-маркеры, ПЦР, ПДРФ, генотипирование

Для цитирования: Вафин Р.Р., Гильманов Х.Х., Шастин П.Н., Супова А.В. Моделирование способа ПЦР-ПДРФ-генотипирования крупного рогатого скота по полиморфным маркерам гена *iNOS*. *Аграрная наука*. 2024; 379(2): 66–70.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-379-2-66-70>

© Вафин Р.Р., Гильманов Х.Х., Шастин П.Н., Супова А.В.

Modeling of PCR-RFLP genotyping of cattle by polymorphic markers of *iNOS* gene

ABSTRACT

Relevance. The study of the *Bos taurus iNOS* gene polymorphism and its association with resistance to bovine leukemia, as well as with breeding value in terms of milk productivity, is a topical subject of genetic selection research.

The purpose of this study was to identify and map polymorphic restriction sites in 4 SNP markers (*AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*) of the *Bos taurus iNOS* gene, followed by PCR-RFLP profiling of the encountered genotypes and modeling of the method of gene testing of cattle by the listed polymorphic markers of the analyzed locus.

Methods. An effective tool for visualizing the result of computer simulation of the experiment, which contributed to predicting the applicability of the developed method of gene testing, was *in silico* modeling of the generated PCR-RFLP profiles of the encountered genotypes of polymorphic markers of the *Bos taurus iNOS* gene. At the same time, the very result of mapping the identified polymorphic restriction sites and subsequent profiling of the encountered genotypes indicated the technical feasibility of detecting polymorphic positions of 4 SNP markers of the *Bos taurus iNOS* gene by PCR-RFLP analysis. This, in turn, initiated the modeling of the method of gene testing of cattle by the listed polymorphic markers with the provision of successive stages of DNA isolation from whole preserved blood of cattle, PCR with oligonucleotide primers *iNOS-F* and *iNOS-R*, RFLP with selected restriction endonucleases (*HinfI*, *Sau96I* (*AspS9I* isoschizomer), *HpyAV* and *MluCI* (*Sse9I* isoschizomer)), as well as performing gel electrophoresis detection with visualization of the obtained electrophoregrams in a UV transilluminator.

Key words: *iNOS*, *Bos taurus*, SNP markers, PCR, RFLP, genotyping

For citation: Vafin R.R., Gilmanov Kh.Kh., Shastin P.N., Supova A.V. Modeling of PCR-RFLP genotyping of cattle by polymorphic markers of *iNOS* gene. *Agrarian science*. 2024; 379(2): 66–70 (in Russian).

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-379-2-66-70>

© Vafin R.R., Gilmanov Kh.Kh., Shastin P.N., Supova A.V.

Введение/Introduction

Индукцибельная синтаза оксида азота — цитоплазматический фермент, кодируемый геном *NOS2* (nitric oxide synthase 2)¹, также известным как *iNOS* (inducible nitric oxide synthase), локализованным в 19-й хромосоме у крупного рогатого скота [1]. Данный фермент катализирует выработку реактивного азотного промежуточного продукта оксида азота — RNINO (от англ. Reactive Nitrogen Intermediate Nitric Oxide), являющегося одной из токсичных молекул иммунной системы, действующей при подавлении микробных патогенов [2–4].

Полиморфизм гена *iNOS Bos taurus* и его ассоциативная связь (как с резистентностью крупного рогатого скота к лейкозу [5–7], так и с племенной ценностью [6] по показателям молочной продуктивности) — актуальный предмет исследования генетико-селекционной направленности.

Одним из стандартизированных подходов к определению генетического полиморфизма является метод, основанный на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК — ПЦР-ПДРФ [8]. На базе данного метода уже разработаны способы генотипирования крупного рогатого скота по аллельным вариантам полиморфного маркера *AH13-1* гена *iNOS* [9, 10], притом что в анализируемом локусе рассредоточены и другие SNP-маркеры [11], детекция которых может быть также диагностически значима в случае установления и их взаимосвязи с хозяйственно ценными признаками.

Цели исследования — выявление и картирование полиморфных сайтов рестрикции у 4 SNP-маркеров (*AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*) гена *iNOS Bos taurus* с последующим ПЦР-ПДРФ-профилированием встречаемых генотипов и моделированием способа генотипирования крупного рогатого скота по перечисленным полиморфным маркерам анализируемого локуса.

Материалы и методы исследований / Materials and methods

Исследование проведено в лаборатории лейкозологии Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук в 2023 г.

Теоретико-аналитическая часть биоинформационного исследования, посвященная выявлению и картированию полиморфных сайтов рестрикции у 4 SNP-маркеров (*AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*) гена *iNOS Bos taurus*, а также последующему ПЦР-ПДРФ-профилированию встречаемых генотипов, выполнена в онлайн-программе NEBcutter V2.0 (New England Biolabs, США).

Для практической реализации экспериментальной части исследования потребуются дальнейшие технологические процедуры выделения ДНК, постановки ПЦР и ПДРФ, а также гель-электрофорезной детекции. При этом экстракция нуклеиновых кислот из цельной консервированной крови крупного рогатого скота может быть осуществлена комплектом реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб В» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, Россия).

Постановка ПЦР с праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R* для амплификации локуса гена *iNOS Bos taurus* длиной 258 bp может быть проведена набором реагентов

Encyclo Plus PCR kit (ЗАО «Евроген», Россия) согласно составленному ПЦР-протоколу (табл. 1).

Последующую процедуру эндонуклеазного расщепления амплифицированных ПЦР-проб следует выполнить с 4 подобранными рестриктазами (New England Biolabs, США) согласно составленным ПДРФ-протоколам (табл. 1).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Ограниченная праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R* референсная нуклеотидная последовательность локуса гена *iNOS Bos taurus*, депонированная в GenBank NCBI (AF465168), представлена 4 SNP-маркерами: *AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*, полиморфные позиции которых обозначены на рисунке 1. При этом полиморфные позиции перечисленных SNP-маркеров могут быть успешно детектированы методом ПЦР-ПДРФ-анализа, что вполне обосновано результатом картирования

Таблица 1. Протоколы ПЦР-ПДРФ-анализа локуса *iNOS Bos taurus*
Table 1. Protocols for PCR-RFLP analysis of the *Bos taurus iNOS* locus

ПЦР-протокол				
Реагенты	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба (мкл)	10 проб (мкл)
Стерильная вода			32	320
5×Encyclo Red буфер	5×	1×	10	100
50×смесь dNTP	50×	1×	1	10
Праймер <i>iNOS-F</i>	50 мкМ	0,5 мкМ	0,5	5
Праймер <i>iNOS-R</i>	50 мкМ	0,5 мкМ	0,5	5
50×Encyclo полимеразы	50×	1×	1	10
Проба ДНК			5	
Итого:			50	

Нуклеотидные последовательности праймеров:

iNOS-F: 5'-AGGCGGGTTTAAGCTCCTAG-3' (20 н.)

iNOS-R: 5'-ACACTGGACCCATCAGCTGC-3' (20 н.)

Режим амплификации:

×1: 95 °C — 4 мин. ×40: 95 °C — 10 сек., 58 °C — 10 сек., 72 °C — 10 сек. ×1: 72 °C — 5 мин.

ПДРФ-протоколы									
Реагенты				Исходная концентрация		Рабочая концентрация			

полиморфных сайтов рестрикции и последующего профилирования встречаемых генотипов (рис. 1).

In silico моделирование генерируемых ПЦР-ПДРФ-профилей встречаемых генотипов полиморфных маркеров гена *iNOS Bos taurus* — действенный инструмент визуализации результата компьютерной симуляции эксперимента, способствующий прогнозированию применимости разрабатываемого способа гено-тестирования.

На рисунке 2 представлен результат *in silico* моделирования *HinfI*-ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфного маркера *AH13-1* гена *iNOS Bos taurus*.

Рассчитанные *HinfI*-ПЦР-ПДРФ-фрагменты ассоциированы с тремя генотип-специфичными профилями SNP-маркера *AH13-1*, среди них два гомозиготных профиля генотипов *CC* (192/66 bp) и *TT* (258 bp), а также гетерозиготный профиль генотипа *CT* (258/192/66 bp) (рис. 2)

Генерация данных фрагментов и ассоциированных с ними профилей опосредована полиморфной позицией маркера *AH13-1* в положении 70, приводящей к созданию участка узнавания рестриктазы *HinfI* (G/ANTC) при SNP с заменой тимина (T) на цитозин (C) (рис. 1).

Результат моделирования *in silico* *Sau96I*-ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфного маркера *AH13-2* гена *iNOS Bos taurus* представлен на рисунке 3.

Sau96I-ПЦР-ПДРФ-фрагменты, ассоциированные с тремя генотип-специфичными профилями SNP-маркера *AH13-2*, формируют два профиля гомозиготных генотипов *AA* (202/47/9 bp) и *GG* (113/89/47/9 bp), а также профиль гетерозиготного генотипа *AG*

Рис. 1. Полиморфные сайты рестрикции SNP-маркеров *AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4* гена *iNOS Bos taurus* и соответствующие ПЦР-ПДРФ-профили генотипов, сгенерированные при рестрикционном картировании анализируемого локуса, фланкируемого праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R*

Fig. 1. Polymorphic restriction sites of SNP markers *AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4* of the *Bos taurus iNOS* gene and the corresponding PCR-RFLP genotype profiles generated by restriction mapping of the analyzed locus, flanked by primers *iNOS-F* and *iNOS-R*

Праймер *iNOS-F*
001 AGCGGGTTT AAGCTCCTAG AGAGCCAGA GAGGAAGAA GTAGAAAGAC CTGGCTTCT
HinfI
061 TCAGGAGT^Y GTCACAGTGA GCCCGCCTCC GTGAGCCTAG TGCCTCATCA GTGRCCCAT^T
HpyAV
121 TCCTTGGTTT CTTTCTGACT TGAAACCATT TGRAGGAGAC AGGGGGGATC TTTAAGAGGT
MluCI
181 AACTTCAGTC TTCGAGGTTA GGGTCCCCAC TTTGTAGAGG GGATGAGA^{AR} TTGGTTT^{GC}
Sau96I
241 AGCTGATGGG TCCAGTGT 258 bp GenBank A/N AF465168

SNP-маркер *AH13-1*, полиморфная позиция 70

HinfI-ПЦР-ПДРФ-профиль (*HinfI*-рестрикционное картирование):

Нуклеотид C, генотип *CC* = 192/66 bp (1-66/67-258 nt)

Нуклеотид T, генотип *TT* = 258 bp (1-258 nt)

Нуклеотид Y, генотип *CT* = 258/192/66 bp

SNP-маркер *AH13-2*, полиморфная позиция 114

Sau96I-ПЦР-ПДРФ-профиль (*Sau96I*-рестрикционное картирование):

Нуклеотид A, генотип *AA* = 202/47/9 bp (1-202/203-249/250-258 nt)

Нуклеотид G, генотип *GG* = 113/89/47/9 bp (1-113/114-202/203-249/250-258 nt)

Нуклеотид R, генотип *AG* = 202/113/89/47/9 bp

SNP-маркер *AH13-3*, полиморфная позиция 152

HpyAV-ПЦР-ПДРФ-профиль (*HpyAV*-рестрикционное картирование):

Нуклеотид A, генотип *AA* = 146/112 bp (1-146/147-258 nt)

Нуклеотид G, генотип *GG* = 258 bp (1-258 nt)

Нуклеотид R, генотип *AG* = 258/146/112 bp

SNP-маркер *AH13-4*, полиморфная позиция 230

MluCI-ПЦР-ПДРФ-профиль (*MluCI*-рестрикционное картирование):

Нуклеотид A, генотип *AA* = 228/30 bp (1-228/229-258 nt)

Нуклеотид G, генотип *GG* = 258 bp (1-258 nt)

Нуклеотид R, генотип *AG* = 258/228/30 bp

(202/113/89/47/9 bp) (рис. 3). Генерация указанных фрагментов и ассоциированных с ними профилей связана не только с наличием полиморфной позиции у маркера *AH13-2* в положении 114, приводящей к образованию сайта рестрикции *Sau96I* (G/GNCC) при SNP с заменой аденина (A) на гуанин (G), но и присутствием двух мономорфных сайтов рестрикции в анализируемом локусе гена *iNOS* (рис. 1).

На рисунке 4 представлен результат *in silico* моделирования *HpyAV*-ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфного маркера *AH13-3* гена *iNOS Bos taurus*.

Рис. 2. Моделирование *HinfI*-ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфного маркера *AH13-1* гена *iNOS Bos taurus* (праймеры *iNOS-F* и *iNOS-R*). Обозначения: 1) ПЦР-продукт (258 bp); 2–4) ПДРФ-профили: 2) генотип *CC* (192/66 bp); 3) генотип *TT* (258 bp); 4) генотип *CT* (258/192/66 bp)

Fig. 2. Modeling of *HinfI*-PCR-RFLP profiles of genotypes of the polymorphic marker *AH13-1* of the *Bos taurus iNOS* gene (primers *iNOS-F* and *iNOS-R*). Designations: 1) PCR-product (258 bp); 2–4) RFLP-profiles: 2) genotype *CC* (192/66 bp); 3) genotype *TT* (258 bp); 4) genotype *CT* (258/192/66 bp)

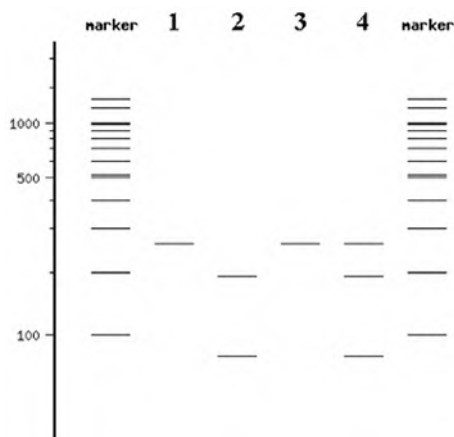


Рис. 3. Моделирование *Sau96I*-ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфного маркера *AH13-2* гена *iNOS Bos taurus* (праймеры *iNOS-F* и *iNOS-R*). Обозначения: 1) ПЦР-продукт (258 bp); 2–4) ПДРФ-профили: 2) генотип *AA* (202/47/9 bp); 3) генотип *GG* (113/89/47/9 bp); 4) генотип *AG* (202/113/89/47/9 bp)

Fig. 3. Modeling of *Sau96I*-PCR-RFLP profiles of genotypes of the polymorphic marker *AH13-2* of the *Bos taurus iNOS* gene (primers *iNOS-F* and *iNOS-R*). Designations: 1) PCR-product (258 bp); 2–4) RFLP-profiles: 2) genotype *AA* (202/47/9 bp); 3) genotype *GG* (113/89/47/9 bp); 4) genotype *AG* (202/113/89/47/9 bp)

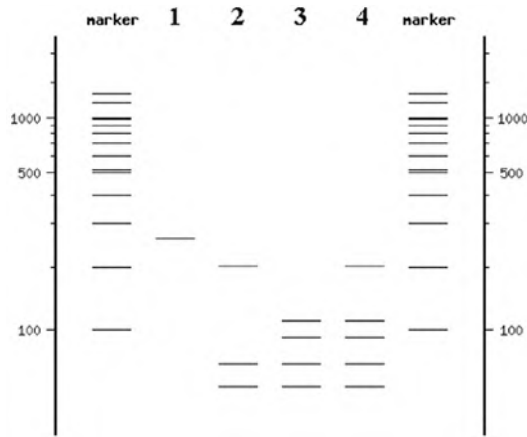
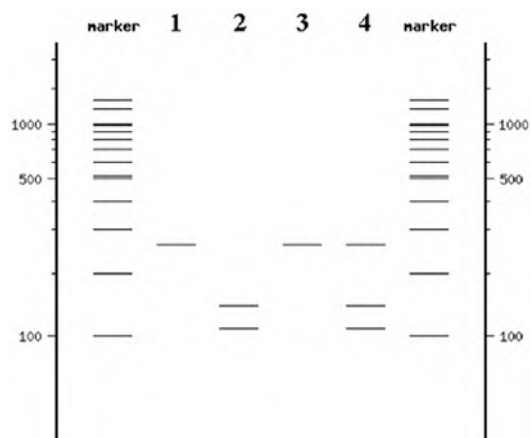


Рис. 4. Моделирование *HpyAV*-ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфного маркера *AH13-3* гена *iNOS Bos taurus* (праймеры *iNOS-F* и *iNOS-R*). Обозначения: 1) ПЦР-продукт (258 bp); 2–4) ПДРФ-профили: 2) генотип AA (146/112 bp); 3) генотип GG (258 bp); 4) генотип AG (258/146/112 bp)
Fig. 4. Modeling of *HpyAV*-PCR-RFLP profiles of genotypes of the polymorphic marker *AH13-3* of the *Bos taurus iNOS* gene (primers *iNOS-F* and *iNOS-R*). Designations: 1) PCR-product (258 bp); 2–4) RFLP-profiles: 2) genotype AA (146/112 bp); 3) genotype GG (258 bp); 4) genotype AG (258/146/112 bp)



Рассчитанные *HpyAV*-ПЦР-ПДРФ-фрагменты формируют три генотип-специфичных профиля маркера *AH13-3*, к которым относятся два гомозиготных профиля генотипов AA (146/112 bp) и GG (258 bp), а также гетерозиготный профиль генотипа AG (258/146/112 bp) (рис. 4). Генерация данных фрагментов и ассоциированных с ними профилей непосредственно связана с полиморфной позицией маркера *AH13-3* в положении 152, приводящей к созданию участка узнавания рестриктазы *HpyAV* (CCTTC(6/5) при SNP с заменой гуанина (G) на аденин (A) (рис. 1).

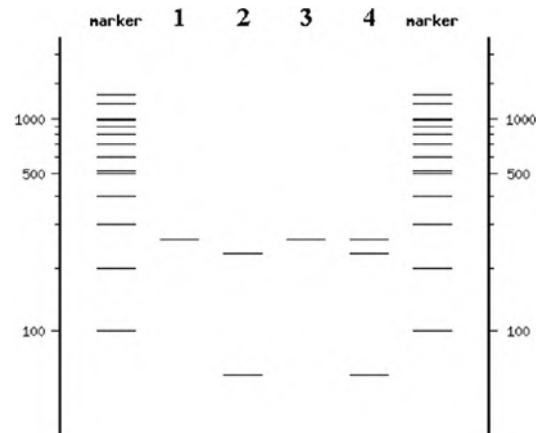
Результат *in silico* моделирования *MluCI*-ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфного маркера *AH13-4* гена *iNOS Bos taurus* представлен на рисунке 5.

MluCI-ПЦР-ПДРФ-фрагменты, ассоциированные с тремя генотип-специфичными профилями SNP-маркера *AH13-4*, формируют два профиля гомозиготных генотипов AA (228/30 bp) и GG (258 bp), а также профиль гетерозиготного генотипа AG (258/228/30 bp) (рис. 5).

Генерация указанных фрагментов и ассоциированных с ними профилей опосредована полиморфной позицией маркера *AH13-4* в положении 230, приводящей к образованию сайта рестрикции *MluCI* (/AATT) при SNP с заменой гуанина (G) на аденин (A) (рис. 1).

Следует отметить, что из четырех подобранных эндонуклеаз рестрикции (*HinfI*, *Sau96I*, *HpyAV* и *MluCI*),

Рис. 5. Моделирование *MluCI*-ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфного маркера *AH13-4* гена *iNOS Bos taurus* (праймеры *iNOS-F* и *iNOS-R*). Обозначения: 1) ПЦР-продукт (258 bp); 2–4) ПДРФ-профили: 2) генотип AA (228/30 bp); 3) генотип GG (258 bp); 4) генотип AG (258/228/30 bp)
Fig. 5. Modeling *MluCI*-PCR-RFLP profiles of genotypes of the polymorphic marker *AH13-4* of the *Bos taurus iNOS* gene (primers *iNOS-F* and *iNOS-R*). Designations: 1) PCR-product (258 bp); 2–4) RFLP-profiles: 2) genotype AA (228/30 bp); 3) genotype GG (258 bp); 4) genotype AG (258/228/30 bp)



упомянутых в данной работе, две могут быть успешно заменены на их прототипы, в частности *Sau96I* на изошизомер *Asp96I* и *MluCI* на изошизомер *Sse9I*. При этом данные изошизомеры и рестриктазы *HinfI* производит и реализует российская компания ООО «СибЭнзайм», что ожидаемо положительно скажется на себестоимости планируемой экспериментальной части исследования.

Выводы/Conclusion

Результат картирования выявленных полиморфных сайтов рестрикции и последующего профилирования встречаемых генотипов свидетельствовал о возможности детектирования полиморфных позиций 4 SNP-маркеров (*AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*) гена *iNOS Bos taurus* методом ПЦР-ПДРФ-анализа. Установленная возможность открыла путь к моделированию способа генотестирования крупного рогатого скота по перечисленным полиморфным маркерам анализируемого локуса, предусматривающего последовательные этапы экстракции нуклеиновых кислот, постановки ПЦР и ПДРФ, а также гель-электрофорезной детекции. При этом доступность отобранных эндонуклеаз рестрикции, в том числе к приобретению их изошизомеров на отечественном (российском) рынке, делает планируемую экспериментальную часть исследования вполне осуществимой.

Все авторы несут ответственность за работу и представленные данные.

Все авторы внесли равный вклад в работу.

Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат. Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-76-10011.
<https://rscf.ru/project/22-76-10011/>

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Lemal P., May K., König S., Schroyen M., Gengler N. *Invited review: from heat stress to disease — Immune response and candidate genes involved in cattle thermotolerance. Journal of Dairy Science.* 2023; 106(7): 4471–4488. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22727>
- Klebanoff S.J. Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: Role of nitrite. *Free Radical Biology and Medicine.* 1993; 14(4): 351–360. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90084-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90084-8)

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors made an equal contribution to the work.

The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism. The authors declare no conflict of interest.

FUNDING

This research was funded by Russian Science Foundation No. 22-76-10011.
<https://rscf.ru/project/22-76-10011/>

REFERENCES

- Lemal P., May K., König S., Schroyen M., Gengler N. *Invited review: from heat stress to disease — Immune response and candidate genes involved in cattle thermotolerance. Journal of Dairy Science.* 2023; 106(7): 4471–4488. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22727>
- Klebanoff S.J. Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: Role of nitrite. *Free Radical Biology and Medicine.* 1993; 14(4): 351–360. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90084-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90084-8)

3. Bogdan C., Rölinghoff M., Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2000; 12(1): 64–76.
https://doi.org/10.1016/s0952-7915(99)00052-7

4. Chakravorty D., Hense M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection*. 2003; 5(7): 621–627.
https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00096-0

5. Чичина С.В. Роль аллельной вариативности генов цитокинов в формировании резистентности крупного рогатого скота к лейкозу. *Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук*. Новосибирск. 2005; 110.

6. Beishova I.S. *et al.* Genetic polymorphism of prolactin and nitric oxide synthase in Holstein cattle. *Veterinary World*. 2023; 16(1): 161–167.
https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.161-167

7. Безбородова Н.А. и др. Оценка распространённости аллельных вариантов гена синтазы оксида азота iNOS в уральской популяции крупного рогатого скота. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2023; (1): 31–36.
https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2023.1.31-36

8. Hashim H.O., Al-Shuhaib M.B.S. Exploring the Potential and Limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP Detection: A Review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2019; 6(4): 137–144.
https://doi.org/10.29252/JABR.06.04.02

9. Гильманов Х.Х., Вафин Р.Р., Каримова Р.Г., Тюлькин С.В. Способ проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллельным вариантам полиморфного маркера AH13-1 гена iNOS. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2018; (4): 22–28.
https://www.elibrary.ru/urblzl

10. Kuzhebaeva U.Z., Donnik I.M., Petropavlovsky M.V., Kanatbaev S.G., Nurgaliev B.E. Nitric oxide as an indicator for assessing the resistance and susceptibility of cattle to leukemia. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2021; (10): 48–54.
https://doi.org/10.32417/1997-4868-2021-213-10-48-54

11. Heaton M.P. *et al.* Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome*. 2002; 13(5): 272–281.
https://doi.org/10.1007/s00335-001-2146-3

3. Bogdan C., Rölinghoff M., Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2000; 12(1): 64–76.
https://doi.org/10.1016/s0952-7915(99)00052-7

4. Chakravorty D., Hense M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection*. 2003; 5(7): 621–627.
https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00096-0

5. Chichina S.V. The role of allelic variability of cytokine genes in the formation of cattle resistance to leukemia. *PhD (Biology) Thesis*. Novosibirsk. 2005; 110 (in Russian).

6. Beishova I.S. *et al.* Genetic polymorphism of prolactin and nitric oxide synthase in Holstein cattle. *Veterinary World*. 2023; 16(1): 161–167.
https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.161-167

7. Bezborodova N.A. *et al.* Assessment of the prevalence of allelic variants of nitric oxide synthase bovine gene iNOS in the Ural population. *Problems of biology of productive animals*. 2023; (1): 31–36 (in Russian).
https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2023.1.31-36

8. Hashim H.O., Al-Shuhaib M.B.S. Exploring the Potential and Limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP Detection: A Review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2019; 6(4): 137–144.
https://doi.org/10.29252/JABR.06.04.022

9. Gilmanov Kh.Kh., Vafin R.R., Karimova R.G., Tyulkin S.V. Method of carrying out PCR-RFLP for cattle genotyping on allelic variants of polymorphic marker of iNOS gene. *Veterinary, Zootechnics and Biotechnology*. 2018; (4): 22–28 (in Russian).
https://www.elibrary.ru/urblzl

10. Kuzhebaeva U.Z., Donnik I.M., Petropavlovsky M.V., Kanatbaev S.G., Nurgaliev B.E. Nitric oxide as an indicator for assessing the resistance and susceptibility of cattle to leukemia. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2021; (10): 48–54.
https://doi.org/10.32417/1997-4868-2021-213-10-48-54

11. Heaton M.P. *et al.* Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome*. 2002; 13(5): 272–281.
https://doi.org/10.1007/s00335-001-2146-3

ОБ АВТОРАХ

Рамиль Ришадович Вафин

доктор биологических наук, профессор РАН, научный консультант
vafin-ramil@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-0914-0053

Хамид Халимович Гильманов

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
gilmanov.xx@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-7053-6925

Павел Николаевич Шастин

кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник
shastin.pasha@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0001-7360-927X

Анастасия Владимировна Супова

младший научный сотрудник
supova.nastya@yandex.ru
http://orcid.org/0000-0003-0728-538X

Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук, Рязанский пр-т, 24, Москва, 109428, Россия

ABOUT THE AUTHORS

Ramil Rishadovich Vafin

Doctor of Biological Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Scientific Consultant
vafin-ramil@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-0914-0053

Khamid Khalimovich Gilmanov

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher
gilmanov.xx@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-7053-6925

Pavel Nikolaevich Shastin

Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher
shastin.pasha@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0001-7360-927X

Anastasia Vladimirovna Supova

Junior Researcher
supova.nastya@yandex.ru
http://orcid.org/0000-0003-0728-538X

Federal Scientific Centre VIEV,
24/1 Ryazansky Prospekt, Moscow, 109428, Russia