

Р.Р. Вафин
Х.Х. Гильманов ✉
П.Н. Шастин

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:
21.02.2024

Одобрена после рецензирования:
02.06.2024

Принята к публикации:
17.06.2024

Research article

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-384-7-74-78

Ramil R. Vafin
Khamid Kh. Gilmanov ✉
Pavel N. Shastin

Federal Scientific Center — All-Russian
Scientific Research Institute of Experimental
Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin
and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy
of Sciences, Moscow, Russia

✉ gilmanov.xx@mail.ru

Received by the editorial office:
21.02.2024

Accepted in revised:
02.06.2024

Accepted for publication:
17.06.2024

Тестирование разработанного способа ПЦР-ПДРФ-генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркерам гена *iNOS*

РЕЗЮМЕ

Воспроизводство высокопродуктивного стада крупного рогатого скота с генетической устойчивостью к лейкозу — одна из важнейших задач племенного животноводства, достижимая комплексным подходом, включающим и генетико-селекционные исследования, в том числе направленные на изучение ассоциативной связи полиморфизма гена *iNOS Bos taurus* с племенной ценностью, а также с восприимчивостью и устойчивостью животных к данному заболеванию.

Цели исследования — картирование выявленных полиморфных сайтов рестрикции у 6 SNP-маркеров (AH13-1, AH13-2, AH13-3, AH13-4, AH13-5 и AH13-6) гена *iNOS Bos taurus* и программный расчет ПЦР-ПДРФ-профилей возможных генотипов с последующим тестированием разработанного способа генотипирования крупного рогатого скота по перечисленным маркерам.

Теоретико-аналитическая часть проведенного биоинформационного исследования расширила знания о полиморфных сайтах рестрикции 6 упомянутых SNP-маркеров и соответствующих ПЦР-ПДРФ-профилей их возможных генотипов, в том числе комплексных генотипов полиморфных маркеров AH13-1 и AH13-6, сгенерированных при рестрикционном картировании анализируемой последовательности ДНК, ограниченной праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R*. Далее теоретическая возможность детектирования перечисленных маркеров анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК была подкреплена экспериментальными данными, полученными в результате тестирования разработанного способа ПЦР-ПДРФ-генотипирования крупного рогатого скота по перечисленным маркерам с 5 отобранными эндонуклеазами рестрикции и изошизомерами (*HinfI*, *AspS9I*, *HpyAV*, *Sse9I* и *Bst4CI*) преимущественно российского производства, что в конечном счете положительно сказалось на себестоимости проведенного исследования.

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

Для цитирования: Вафин Р.Р., Гильманов Х.Х., Шастин П.Н. Тестирование разработанного способа ПЦР-ПДРФ-генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркерам гена *iNOS*. *Аграрная наука*. 2024; 384(7): 74–78.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-384-7-74-78>

© Вафин Р.Р., Гильманов Х.Х., Шастин П.Н.

Testing of the developed method for PCR-RFLP genotyping of cattle using SNP markers of the *iNOS* gene

ABSTRACT

Reproduction of a highly productive herd of cattle with genetic resistance to leukemia is one of the most important tasks of livestock breeding, achievable by an integrated approach, including genetic and selection research, including those aimed at studying the associative relationship between the *iNOS Bos taurus* gene polymorphism and breeding value, and also with the susceptibility and resistance of animals to this disease.

The objectives of the study were to map the identified polymorphic restriction sites in 6 SNP markers (AH13-1, AH13-2, AH13-3, AH13-4, AH13-5 and AH13-6) of the *iNOS Bos taurus* gene and program calculation of PCR-PDRF profiles of possible genotypes, followed by testing of the developed method of cattle genotyping cattle by the listed markers.

The theoretical and analytical part of the conducted bioinformatics study expanded knowledge about the polymorphic restriction sites of the 6 mentioned SNP markers and the corresponding PCR-RFLP profiles of their possible genotypes, including complex genotypes of the polymorphic markers AH13-1 and AH13-6 generated during restriction mapping the analyzed DNA sequence, limited by primers *iNOS-F* and *iNOS-R*. Further, the theoretical possibility of detecting the listed markers by analyzing the length polymorphism of restriction fragments of amplified DNA was supported by experimental data obtained as a result of testing the developed method for PCR-RFLP genotyping of cattle using the listed markers with 5 selected restriction endonucleases and isoschizomers (*HinfI*, *AspS9I*, *HpyAV*, *Sse9I* and *Bst4CI*) predominantly Russian-made, which ultimately had a positive impact on the cost of the research conducted.

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

For citation: Vafin R.R., Gilmanov Kh.Kh., Shastin P.N. Testing of the developed method for PCR-RFLP genotyping of cattle using SNP markers of the *iNOS* gene. *Agrarian science*. 2024; 384(7): 74–78 (in Russian).

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-384-7-74-78>

© Vafin R.R., Gilmanov Kh.Kh., Shastin P.N.

Введение/Introduction

iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), в том числе известный как *NOS2* (*nitric oxide synthase 2*), — ген, локализованный в 19-й хромосоме у крупного рогатого скота, кодирующий цитоплазматический фермент, именуемый как индуцибельная синтаза оксида азота [1–3].

Данный фермент способен инициировать выработку большого количества короткоживущих молекул оксида азота и его реактивных форм, являющихся медиатором апоптоза и различных патофизиологических состояний, а также регулятором системы врожденного иммунитета [4–6].

Генетико-селекционные исследования, направленные на изучение ассоциативной связи полиморфизма гена *iNOS Bos taurus* с восприимчивостью и устойчивостью к лейкозу крупного рогатого скота, а также с племенной ценностью животных, весьма актуальны и продиктованы необходимостью воспроизводства высокопродуктивного стада с генетической резистентностью к данному заболеванию [7–9].

Полимеразная цепная реакция, совмещенная с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), — относительно простой и доступный комбинированный молекулярно-генетический метод определения генетического разнообразия (генетического полиморфизма), широко используемый в лабораторной практике [10–12].

На основе указанного комбинированного метода ранее были разработаны способы генотипирования крупного рогатого скота по аллельным вариантам полиморфного маркера AH13-1 гена *iNOS* [13, 14], а также недавно смоделирован способ ПЦР-ПДРФ-генотипирования по другим SNP-маркерам (AH13-2, AH13-3, AH13-4) [15], локализованным в анализируемом участке гена [16].

При этом в анализируемом локусе гена *iNOS Bos taurus* сосредоточены и другие SNP-маркеры (AH13-5 и AH13-6), подробно охарактеризованные уже в данной работе. Детекция указанных полиморфных маркеров может быть диагностически значимой в случае установления и их взаимосвязи с хозяйственно ценными признаками животных.

Развитие молекулярно-генетических подходов к генотипированию крупного рогатого скота по аллельным вариантам установленных полиморфных маркеров — важный этап проводимых научных исследований и разработок, опирающийся на систематизированные знания о полиморфизме гена *iNOS Bos taurus* и прокладывающий дорогу к более полному раскрытию его ассоциативной связи с резистентностью к лейкозу и племенной ценностью животных.

Цель исследования — картирование выявленных полиморфных сайтов рестрикции у 6 SNP-маркеров (AH13-1, AH13-2, AH13-3, AH13-4, AH13-5 и AH13-6) гена *iNOS Bos taurus* и программный расчет ПЦР-ПДРФ-профилей возможных генотипов с последующим тестированием разработанного способа генотипирования крупного рогатого скота по перечисленным маркерам.

Материалы и методы исследования / Materials and methods

Исследование проведено в лаборатории лейкозо-логии Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук в 2024 году.

Теоретико-аналитическую часть биоинформационного исследования по картированию выявленных полиморфных сайтов рестрикции у 6 SNP-маркеров (AH13-1, AH13-2, AH13-3, AH13-4, AH13-5 и AH13-6) гена *iNOS Bos taurus* и расчету ПЦР-ПДРФ-профилей возможных генотипов выполнили с применением онлайн-программы NEBcutter V2.0 (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

Для практической реализации экспериментальной части исследования использовали технологические процедуры выделения ДНК, постановки ПЦР и ПДРФ, а также гель-электрофорезной детекции с последующей интерпретацией полученных результатов в идентификационном ключе.

Экстракцию нуклеиновых кислот из 65 отобранных проб цельной консервированной крови голштинизированного скота черно-пестрой породы осуществляли комплектом реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб В» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Постановку ПЦР с праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R* для амплификации локуса гена *iNOS Bos taurus* длиной 258 bp выполняли набором реагентов Encyclo Plus PCR kit (ЗАО «Евроген», Россия) согласно ранее представленному ПЦР-протоколу [15].

Процедуру эндонуклеазного расщепления амплифицированных ПЦР-продуктов проводили подобранными для определенного полиморфного маркера рестриктазами. В частности, для детекции полиморфных позиций SNP-маркеров AH13-1 и AH13-6 10 мкл амплификата смешивали с равным объемом ПДРФ-смеси, содержащей 5 единиц эндонуклеазы рестрикции *HinfI* в SE-буфере O (ООО «СибЭнзайм», Россия), и инкубировали в термостате при 37 °C в течение 4 часов. Аналогичный объем амплификата и ПДРФ-смеси, а также схожее время инкубирования использовали и при детекции полиморфных позиций других SNP-маркеров: AH13-2 (5 ед. *AspS9I* в SE-буфере W (ООО «СибЭнзайм», Россия), 37 °C), AH13-3 (1 ед. *HpyAV* в SE-буфере *rCutSmart*TM Buffer (New England Biolabs, USA), 37 °C), AH13-4 (1 ед. *Sse9I* в SE-буфере B (ООО «СибЭнзайм», Россия), 55 °C), AH13-5 (2 ед. *Bst4CI* в SE-буфере Y (ООО «СибЭнзайм», Россия), 65 °C).

Аликвоты инкубированных ПЦР-ПДРФ-проб вносили в лунки 2,5%-ного агарозного геля в объеме 10 мкл и подвергали вместе с маркерами длин ДНК (ООО «СибЭнзайм», Россия) горизонтальному электрофорезу в буфере TBE (pH 8,0) с последующей визуализацией электрофореграмм в УФ-трансиллюминаторе и фиксацией полученных результатов на цифровую камеру.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Биоинформационный анализ депонированных в GenBank NCBI нуклеотидных последовательностей локуса гена *iNOS Bos taurus*, ограниченных праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R*, свидетельствует не только о ранее описанных 4 SNP-маркерах (AH13-1, AH13-2, AH13-3, AH13-4) [15, 16], но и о еще 2 однонуклеотидных полиморфизмах, рассматриваемых в качестве SNP-маркеров AH13-5 и AH13-6.

Представленная на рисунке 1 смоделированная последовательность анализируемого локуса гена со смешанными нуклеотидами в полиморфных позициях 6 SNP-маркеров, выделенных красным цветом, сформирована в результате множественного выравнивания в BLAST (Базовый инструмент поиска локального выравнивания — Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>) депонированных в GenBank

NCBI (Национальный центр биотехнологической информации — National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) соответствующих последовательностей (AF465168, LR962749, OX344708), первая из которых (AF465168) несет информацию о 4 ранее описанных SNP-маркерах, а другие 2 последовательности открывают возможность обосновать наличие еще 2 дополнительных SNP-маркеров — AN13-5 (LR962749) и AN13-6 (OX344708).

На рисунке 1 представлены и полиморфные сайты рестрикции перечисленных 6 SNP-маркеров гена *iNOS Bos taurus*, и соответствующие ПЦР-ПДРФ-профили возможных генотипов, сгенерированные при рестриционном картировании анализируемой последовательности ДНК, ограниченной праймерами iNOS-F и iNOS-R.

Однако в отношении SNP-маркеров AN13-1 и AN13-6, чьи полиморфные позиции могут затрагивать сайты рестрикции общей для них эндонуклеазы *HinfI*, рассчитанные ПЦР-ПДРФ-профили 3 генотипов AN13-1, представленные на рисунке 1, верны лишь при генотипе CC AN13-6, и, соответственно, сгенерированные ПЦР-ПДРФ-профили 3 генотипов AN13-6 корректны лишь при генотипе TT AN13-1.

Более подробная информация о рассчитанных ПЦР-ПДРФ-профилях комплексных генотипов полиморфных маркеров AN13-1 и AN13-6, взаимосвязанных с их гаплотипами, представлена в таблице 1.

Экспериментальная часть исследования, посвященная тестированию ранее смоделированного способа ПЦР-ПДРФ-генотипирования крупного рогатого скота по 4 полиморфным маркерам (AN13-1, AN13-2, AN13-3, AN13-4) гена *iNOS* [15], расширенного анализом еще

Рис. 1. Полиморфные сайты рестрикции 6 SNP-маркеров (AN13-1, AN13-2, AN13-3, AN13-4, AN13-5 и AN13-6) гена *iNOS Bos taurus* и соответствующие ПЦР-ПДРФ-профили возможных генотипов, сгенерированные при рестриционном картировании анализируемой последовательности ДНК, ограниченной праймерами iNOS-F и iNOS-R

Fig. 1. Polymorphic restriction sites of 6 SNP markers (AN13-1, AN13-2, AN13-3, AN13-4, AN13-5 and AN13-6) of the *Bos taurus iNOS* gene and the corresponding PCR-RFLP profiles of possible genotypes generated by restriction mapping analyzed DNA sequence limited by primers iNOS-F and iNOS-R

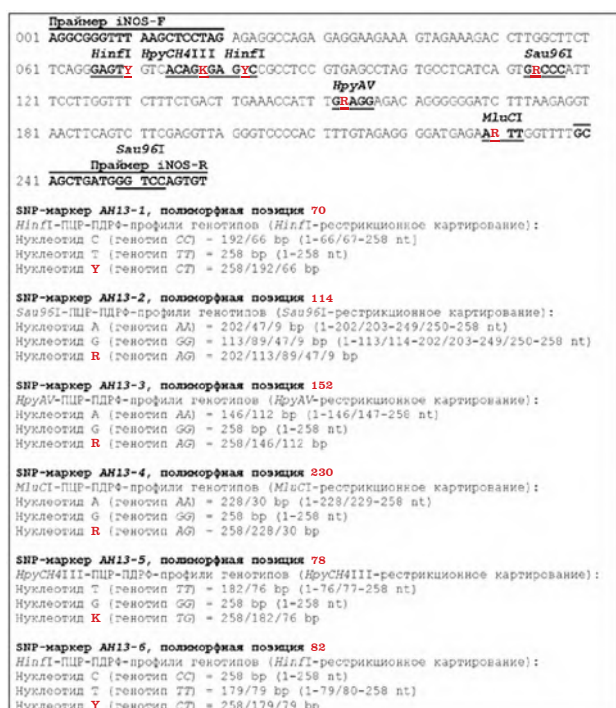


Таблица 1. Рассчитанные ПЦР-ПДРФ-профили комплексных генотипов полиморфных маркеров AN13-1 и AN13-6
Table 1. Calculated PCR-RFLP profiles of complex genotypes of polymorphic markers AN13-1 and AN13-6

AN13-1		AN13-6		AN13-1/AN13-6		ПЦР-ПДРФ-профиль (bp)
генотип	гаплотип	генотип	гаплотип	генотип	гаплотип	
CC	C	CC	C	CC/CC	C/C	192/66
CC	C	TT	T	CC/TT	C/T	179/66/13
TT	T	CC	C	TT/CC	T/C	258
TT	T	TT	T	TT/TT	T/T	179/79
CC	C	CT	C	CC/CT	C/C	192/179/66/13
TT	T	CT	C	TT/CT	T/C	258/179/79
CT	C	CC	C	CT/CC	C/C	258/192/66
CT	C	TT	T	CT/TT	C/T	179/79/66/13
CT	C	CT	C	CT/CT	C/C	192/179/79/66
CT	T	CT	T	CT/CT	T/T	258/179/66/13

по 2 SNP-маркерам (AN13-5 и AN13-6), реализована комплексом технологических процедур, завершаемых гель-электрофорезной детекцией, наглядные примеры которой в виде обработанных электрофореграмм представлены на соответствующих рисунках (рис. 2–4). В частности, на рисунке 2 наглядно отображена электрофореграмма *HinfI*-ПЦР-ПДРФ-профилей 5 комплексных генотипов полиморфных маркеров AN13-1 и AN13-6 гена *iNOS Bos taurus*, выявленных в ходе тестирования разработанного способа на исследуемой выборке животных.

При этом программно рассчитанные *HinfI*-ПЦР-ПДРФ-профили большинства выявленных комплексных генотипов (CT/CC, TT/CT, TT/CC и CC/CC) полиморфных маркеров AN13-1 и AN13-6 соответствовали визуально наблюдаемой картине электрофоретического разделения фрагментов ДНК. За исключением одного комплексного генотипа (CT/CT с гаплотипами C/T и T/C), чьи теоретические расчеты (258/179/66/13 bp) не совпадали с экспериментально полученными данными (258/192/179/79/66/13 bp).

Основная причина, повлиявшая на указанное несоответствие, кроется в неполном эндонуклеазном расщеплении ДНК с близко расположенными сайтами рестрикции *HinfI* из-за его медленной диссоциации с одного из разрезанных участков, до завершения которой перекрывается доступ к еще не разрезанному соседнему участку узнавания фермента.

Электрофореграмма *Sse9I*-ПЦР-ПДРФ-профилей 3 генотипов (AA, AG, GG) полиморфного маркера AN13-4

Рис. 2. Электрофореграмма *HinfI*-ПЦР-ПДРФ-профилей комплексных генотипов полиморфных маркеров AN13-1 и AN13-6 гена *iNOS Bos taurus*. Обозначение: М) маркеры длин ДНК; 1–9) комплексные генотипы: 1, 5) CT/CT (258/192/179/79/66/13 bp); 2, 3, 4, 6) CT/CC (258/192/66 bp); 5) TT/CT (258/179/79 bp); 8) TT/CC (258 bp); 9) CC/CC (192/66 bp)

Fig. 2. Electropherogram of *HinfI*-PCR-RFLP profiles of complex genotypes of polymorphic markers AN13-1 and AN13-6 of the *iNOS Bos taurus*. M) DNA length markers; 1–9) complex genotypes: 1, 5) CT/CT (258/192/179/79/66/13 bp); 2, 3, 4, 6) CT/CC (258/192/66 bp); 5) TT/CT (258/179/79 bp); 8) TT/CC (258 bp); 9) CC/CC (192/66 bp)

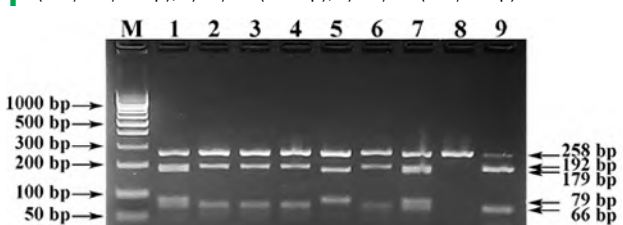
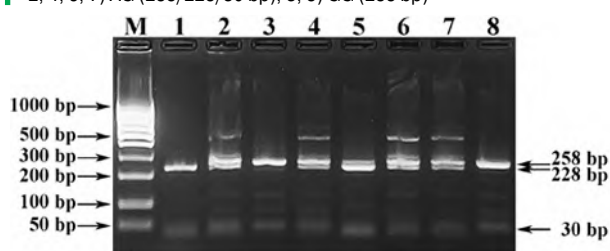


Рис. 3. Электрофореграмма Sse9I-ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфного маркера AH13-4 гена *iNOS Bos taurus*: M) маркеры длин ДНК; 1–8) генотипы: 1, 5) AA (228/30 bp); 2, 4, 6, 7) AG (258/228/30 bp); 3, 8) GG (258 bp)

Fig. 3. Electropherogram of Sse9I-PCR-RFLP profiles of genotypes of the polymorphic marker AH13-4 of the *iNOS Bos taurus*: M) DNA length markers; 1–8) genotypes: 1, 5) AA (228/30 bp); 2, 4, 6, 7) AG (258/228/30 bp); 3, 8) GG (258 bp)



гена *iNOS Bos taurus*, также выявленных в ходе тестирования разработанного способа на исследуемой выборке животных, наглядно отображена на рисунке 3.

В целом визуально наблюдаемая картина электрофоретического разделения фрагментов ДНК выявленных генотипов SNP-маркера AH13-4 гена *iNOS Bos taurus* соответствовала их программно рассчитанным Sse9I-ПЦР-ПДРФ-профилям.

Дополнительно наблюдаемый у гетерозиготного генотипа (AG) неспецифичный фрагмент длиной около 500 bp — непродиссоциировавшийся комплекс «ДНК-фермент», существенно не влияющий на корректную интерпретацию результатов генотипирования.

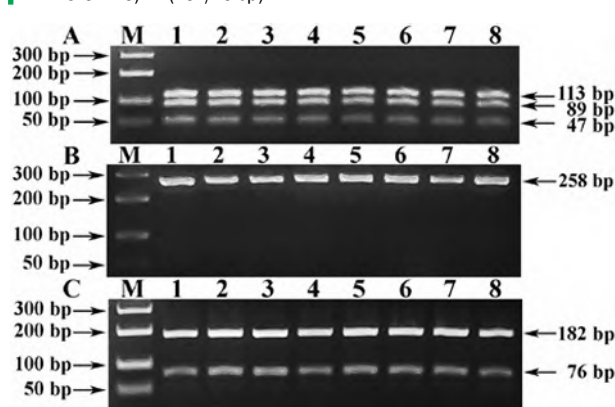
Наглядные примеры электрофореграмм ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфных маркеров AH13-2, AH13-3 и AH13-5 гена *iNOS Bos taurus* представлены на объединенном рисунке 4.

На нем (рис. 4) запечатлены лишь ПЦР-ПДРФ-профили единичных генотипов SNP-маркеров AH13-2 (GG), AH13-3 (GG) и AH13-5 (TT). При этом другие генотипы указанных полиморфных маркеров в исследуемой выборке крупного рогатого скота не выявлены в ходе тестирования предложенного способа генотипирования.

Следует отметить, что из 5 подобранных эндонуклеаз рестрикции (HinfI, Sau96I, HpyAV, MluCI и HpyCH4III) (рис. 1) 3 фермента были успешно заменены на их прототипы, в частности Sau96I на изоизомер AspS9I, MluCI на изоизомер Sse9I и HpyCH4III на изоизомер Bst4CI. Данные изоизомеры и рестриктазу HinfI производит российская компания ООО «СибЭнзайм», что в конечном счете положительно

Рис. 4. Электрофореграммы ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфных маркеров AH13-2, AH13-3 и AH13-5 гена *iNOS Bos taurus*: M) Маркеры длин ДНК; A — AspS9I-ПЦР-ПДРФ-профиль генотипа SNP-маркера AH13-2: 1–8) GG (113/89/47/9 bp); B — HpyAV-ПЦР-ПДРФ-профиль генотипа SNP-маркера AH13-3: 1–8) GG (258 bp); C — Bst4CI-ПЦР-ПДРФ-профиль генотипа SNP-маркера AH13-5: 1–8) TT (182/76 bp)

Fig. 4. Electropherograms of PCR-RFLP profiles of genotypes of polymorphic markers AH13-2, AH13-3 and AH13-5 of the *iNOS gene Bos taurus*: M) DNA length markers; A — AspS9I-PCR-RFLP genotype profile of the SNP marker AH13-2: 1–8) GG (113/89/47/9 bp); B — HpyAV-PCR-RFLP genotype profile of the SNP marker AH13-3: 1–8) GG (258 bp); C — Bst4CI-PCR-RFLP genotype profile of SNP marker AH13-5: 1–8) TT (182/76 bp)



сказалось на себестоимости запланированной и реализованной экспериментальной части исследования.

Выводы/Conclusions

Результат картирования выявленных полиморфных сайтов рестрикции у 6 SNP-маркеров (AH13-1, AH13-2, AH13-3, AH13-4, AH13-5 и AH13-6) гена *iNOS Bos taurus* и программного расчета ПЦР-ПДРФ-профилей возможных генотипов указывал на теоретическую возможность детектирования перечисленных маркеров анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК.

Указанная возможность затем была подтверждена экспериментально при тестировании разработанного способа генотипирования крупного рогатого скота по перечисленным маркерам с 5 отобранными эндонуклеазами рестрикции и изоизомерами (HinfI, AspS9I, HpyAV, Sse9I и Bst4CI) преимущественно отечественного производства (за исключением HpyAV), положительно повлиявших на себестоимость проведенного исследования.

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.

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.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

FUNDING

This research was funded by Russian Science Foundation No. 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
- Zhang W. *et al.* Nitric oxide synthase and its function in animal reproduction: an update. *Frontiers in Physiology.* 2023; 14: 1288669. https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1288669
- Adler H., Frech B., Thöny M., Pfister H., Peterhans E., Jungi T.W. Inducible nitric oxide synthase in cattle. Differential cytokine regulation of nitric oxide synthase in bovine and murine macrophages. *Journal of Immunology.* 1995; 154(9): 4710–4718.

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
- Zhang W. *et al.* Nitric oxide synthase and its function in animal reproduction: an update. *Frontiers in Physiology.* 2023; 14: 1288669. https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1288669
- Adler H., Frech B., Thöny M., Pfister H., Peterhans E., Jungi T.W. Inducible nitric oxide synthase in cattle. Differential cytokine regulation of nitric oxide synthase in bovine and murine macrophages. *Journal of Immunology.* 1995; 154(9): 4710–4718.

4. Ohhashi T., Kawai Y., Maejima D., Hayashi M., Watanabe-Asaka T. Physiological Roles of Lymph Flow-Mediated Nitric Oxide in Lymphatic System. *Lymphatic Research and Biology*. 2023; 21(3): 253–261.
5. 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](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(99)00052-7)
6. Chakravorty D., Hensel 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](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00096-0)
7. 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.
8. 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>
9. Wang M., Ibeagha-Awemu E.M. Impacts of Epigenetic Processes on the Health and Productivity of Livestock. *Frontiers in Genetics*. 2021; 11: 613636. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.613636>
10. 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>
11. Yang W., Kang X., Yang Q., Lin Y., Fang M. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2013; 4: 2. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-2>
12. Ota M., Fukushima H., Kulski J.K., Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature Protocols*. 2007; 2: 2857–2864. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.407>
13. 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 AN13-1 гена iNOS. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2018; (4): 22–28. <https://www.elibrary.ru/uribzl>
14. Kuzhebaeva U.Zh., Donnik I.M., Petropavlovskiy M.V., Kanatbaev S.G., Nurgaliev B.E. Nitric oxide as an indicator for assessing the resistance and susceptibility of cattle to leukemia. *Аграрный вестник Урала*. 2021; (10): 48–54. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2021-213-10-48-54>
15. 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; (1): 66–70. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-379-2-66-70>
16. 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

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

Хамид Халимович Гильманов

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

Павел Николаевич Шастин

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

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

4. Ohhashi T., Kawai Y., Maejima D., Hayashi M., Watanabe-Asaka T. Physiological Roles of Lymph Flow-Mediated Nitric Oxide in Lymphatic System. *Lymphatic Research and Biology*. 2023; 21(3): 253–261.
5. 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](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(99)00052-7)
6. Chakravorty D., Hensel 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](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00096-0)
7. Chichina S.V. The role of allelic variability of cytokine genes in the formation of cattle resistance to leukemia. *Dissertation for the degree of candidate of biological sciences*. Novosibirsk. 2005; 110 (in Russian).
8. 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>
9. Wang M., Ibeagha-Awemu E.M. Impacts of Epigenetic Processes on the Health and Productivity of Livestock. *Frontiers in Genetics*. 2021; 11: 613636. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.613636>
10. 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>
11. Yang W., Kang X., Yang Q., Lin Y., Fang M. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2013; 4: 2. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-2>
12. Ota M., Fukushima H., Kulski J.K., Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature Protocols*. 2007; 2: 2857–2864. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.407>
13. 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/uribzl>
14. Kuzhebaeva U.Zh., Donnik I.M., Petropavlovskiy 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>
15. 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; (2): 66–70 (in Russian). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-379-2-66-70>
16. 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>

ABOUT THE AUTHORS

Ramil Rishadovich Vafin

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

Khamid Khalimovich Gilmanov

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

Pavel Nikolaevich Shastin

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

Federal Scientific Center — All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary named after K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 24 Ryazan Ave., Moscow, 109428, Russia