

УДК: 577.2.0:636.082.2

Краткое сообщение



Открытый доступ

DOI: 10.32634/0869-8155-2025-394-05-89-94

Р.Р. Вафин

Х.Х. Гильманов ✉

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: 05.02.2025

Одобрена после рецензирования: 08.04.2025

Принята к публикации: 22.04.2025

© Вафин Р.Р., Гильманов Х.Х.

ДНК-технологии идентификации аллелей и генотипов полиморфных маркеров анализируемого локуса гена *iNOS Bos taurus*

РЕЗЮМЕ

Актуальной областью исследования генетико-селекционной направленности, в долгосрочной перспективе необходимой для воспроизводства высокопродуктивного стада крупного рогатого скота с генетической устойчивостью к лейкозу, является изучение полиморфизма гена *iNOS Bos taurus* в ассоциативной связи с племенной ценностью животных и их резистентностью к указанному хроническому инфекционному заболеванию.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке ДНК-технологий идентификации аллелей и генотипов SNP-маркеров гена *iNOS Bos taurus* детекцией и интерпретацией диагностически значимых однонуклеотидных полиморфизмов на основе смоделированных способов проведения вложенной ПЦР с dCAPS-праймерами и SNP-генотипирование анализом данных прямого секвенирования ПЦР-продукта. Конструирование dCAPS праймеров *iNOS-F1* и *iNOS-R1* выполнено с использованием программного обеспечения dCAPS Finder 2.0 и OligoAnalyzer 1.2. Картирование полиморфных сайтов рестрикции и расчет ПЦР-ПДРФ-профилей возможных генотипов SNP-маркеров осуществлены с применением онлайн-программы NEBcutter V2.0. Сконструированные dCAPS-праймеры успешно протестированы при постановке вложенной ПЦР в статусе внутренних пар олигонуклеотидов с последующей процедурой эндонуклеазного расщепления амплификата 2-го раунда ПЦР длиной 123 bp подобранными рестриктазами, идентификационно значимыми для определенного полиморфного маркера. Амплификат 1-го раунда ПЦР длиной 258 bp был подвергнут капиллярному секвенированию ДНК по Сэнгеру для детекции и интерпретации диагностически значимых однонуклеотидных полиморфизмов в контексте идентификации аллелей и генотипов SNP-маркеров. ДНК-технологии, использованные в данной работе, оказались действенными подходами к корректному генотипированию крупного рогатого скота по SNP-маркерам гена *iNOS*.

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

Для цитирования: Вафин Р.Р., Гильманов Х.Х. ДНК-технологии идентификации аллелей и генотипов полиморфных маркеров анализируемого локуса гена *iNOS Bos taurus*. *Аграрная наука*. 2025; 394(05): 89–94.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2025-394-05-89-94>

DNA technologies for identification of alleles and genotypes of polymorphic markers of the analyzed locus of the *Bos taurus iNOS* gene

ABSTRACT

The current area of research in genetic and selection focus, which is necessary in the long term for the reproduction of a highly productive herd of cattle with genetic resistance to leukemia, is the study of the polymorphism of the *Bos taurus iNOS* gene of in association with the breeding value of animals and their resistance to this chronic infectious disease.

The aim of this study was to develop DNA technologies for identification of alleles and genotypes of SNP markers of the *Bos taurus iNOS* gene by detection and interpretation of diagnostically significant single nucleotide polymorphisms based on simulated methods of nested PCR with dCAPS primers and SNP genotyping by analysis of direct sequencing data of the PCR product. Construction of dCAPS primers *iNOS-F1* and *iNOS-R1* was performed using dCAPS Finder 2.0 and OligoAnalyzer 1.2 software. Mapping of polymorphic restriction sites and calculation of PCR-RFLP profiles of possible genotypes of SNP markers were performed using the NEBcutter V2.0 online program. The constructed dCAPS primers were successfully tested in nested PCR as internal oligonucleotide pairs followed by endonuclease digestion of the 123 bp PCR amplification product of the second round with selected restriction enzymes that were significant for identification of a particular polymorphic marker. The 258 bp PCR amplification product of the first round was subjected to capillary DNA sequencing according to Sanger for detection and interpretation of diagnostically significant single nucleotide polymorphisms in the context of identification of alleles and genotypes of SNP markers. The DNA technologies used in this work turned out to be effective approaches to correct genotyping of cattle by SNP markers of the *iNOS* gene.

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

For citation: Vafin R.R., Gilmanov Kh.Kh. DNA technologies for identification of alleles and genotypes of polymorphic markers of the analyzed locus of the *Bos taurus iNOS* gene. *Agrarian science*. 2025; 394(05): 89–94 (in Russian).

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2025-394-05-89-94>

Short communications



Open access

DOI: 10.32634/0869-8155-2025-394-05-89-94

Ramil R. Vafin

Khamid Kh. Gilmanov ✉

Federal Scientific Centre VIEV, Moscow,
Russia

✉ gilmanov.xx@mail.ru

Received by the editorial office: 05.02.2025

Accepted in revised: 08.04.2025

Accepted for publication: 22.04.2025

© Vafin R.R., Gilmanov Kh.Kh.

Введение/Introduction

Индубильная синтаза оксида азота — цитоплазматический фермент, кодируемый одноименным геном *iNOS* (inducible nitric oxide synthase) [1, 2]. Указанный фермент способен инициировать как выработку короткоживущих молекул оксида азота, являющихся регулятором системы врожденного иммунитета, так и его реактивных форм — токсичных молекул иммунной системы, подавляющих микробные патогены [3–5].

Изучение полиморфизма гена *iNOS Bos taurus* в ассоциативной связи с чувствительностью и резистентностью к лейкозу крупного рогатого скота, а также его племенной ценностью — актуальная область исследования генетико-селекционной направленности, в долгосрочной перспективе необходимая для воспроизводства высокопродуктивного стада с генетической устойчивостью к указанной хронической инфекционной болезни вирусной природы [6–8].

Полимеразная цепная реакция, совмещенная с полиморфизмом длин рестриционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), — комбинированный молекулярно-генетический подход к определению генетического полиморфизма, имеющий альтернативное название — расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, CAPS) [9–11].

Данный комбинированный подход ранее был использован и при разработке способов ПЦР-ПДРФ-генотипирования крупного рогатого скота по полиморфным маркерам, локализованным в анализируемом локусе гена *iNOS Bos taurus* [12–14]. При этом из уровня техники известен модифицированный метод Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS) — полученные расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности, приводящий к созданию искусственного сайта рестрикции в анализируемой полиморфной позиции за счет изменения в нуклеотидных последовательностях праймеров [15].

Среди ДНК-технологий, ориентированных на детекцию Single Nucleotide Polymorphism (SNP) — однонуклеотидный полиморфизм, можно выделить метод прямого секвенирования продуктов ПЦР, позволяющий определить первичную последовательность анализируемого локуса гена [16].

Таким образом, наряду с применением способов ПЦР-ПДРФ-генотипирования крупного рогатого скота по полиморфным маркерам гена *iNOS*, с позиции корректной идентификации ряда генотипов SNP-маркеров могут быть востребованы и другие подходы, в том числе основанные на dCAPS и секвенировании.

Цель исследования — разработка ДНК-технологий идентификации аллелей и генотипов SNP-маркеров гена *iNOS Bos taurus* детекцией и интерпретацией диагностически значимых однонуклеотидных полиморфизмов на основе

смоделированных способов проведения вложенной ПЦР с dCAPS-праймерами и SNP-генотипирования анализом данных прямого секвенирования ПЦР-продукта.

Материалы и методы исследования / Materials and methods

Работа проведена в лаборатории лейкозоологии Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук в 2024 году.

Конструирование dCAPS-праймеров *iNOS-F1* 5'-CCTTGGCTTCTTCAGGGCGT-3' и *iNOS-R1* 5'-AAGATCCCCCTGTCTGGTC-3' выполнено с применением программного обеспечения OligoAnalyzer 1.2 и dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/>).

Картирование полиморфных сайтов рестрикции у трех SNP-маркеров (*AH13-1*, *AH13-3* и *AH13-6*) гена *iNOS Bos taurus* и расчет ПЦР-ПДРФ-профилей возможных генотипов осуществлены с использованием онлайн-программы NEBcutter V2.0 (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

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

Постановка ПЦР с праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R* для амплификации локуса гена *iNOS Bos taurus* длиной 258 бп выполнена набором реагентов Encyclo Plus PCR kit (ЗАО «Евроген», Россия) согласно ранее использованному протоколу [14]. Постановка гнездовой ПЦР с праймерами *iNOS-F1* и *iNOS-R1* для амплификации локуса гена *iNOS Bos taurus* длиной 123 бп выполнена с Taq ДНК-полимеразой со стандартным буфером (ООО «СибЭнзайм», Россия).

Процедура эндонуклеазного расщепления ПЦР-продуктов, амплифицированных со сконструированными праймерами *iNOS-F1* и *iNOS-R1*, осуществлена подобранными для определенного полиморфного маркера рестриктазами. В частности, для детекции полиморфной позиции SNP-маркера *AH13-1* 10 мкл амплификата смешивали с равным объемом ПДРФ-смеси, содержащей 2 ед. эндонуклеазы рестрикции *Bst*ACI в SE-буфере W (ООО «СибЭнзайм», Россия) и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 4 часов.

Аналогичный объем амплификата и ПДРФ-смеси, а также схожее время инкубирования использовали и при детекции полиморфных позиций других SNP-маркеров: *AH13-3* (5 ед. *Bme*18I в SE-буфере O (ООО «СибЭнзайм», Россия) и *AH13-6* (5 ед. *Hinf*I в SE-буфере O (ООО «СибЭнзайм», Россия).

Далее инкубированные ПЦР-ПДРФ-пробы окрашивали буфером для нанесения образцов ДНК 4X Gel Loading Dye, Blue (ЗАО «Евроген», Россия) и в объеме 20 мкл вносили в лунки 3% агарозного геля, подвергая вместе с маркерами длин

ДНК DNA Ladder 50+ bp (ЗАО «Евроген», Россия) горизонтальному электрофорезу в буфере TBE (рН 8,0) с последующей визуализацией электрограмм в УФ-трансиллюминаторе.

Праймеры *iNOS-F* и *iNOS-R*, инициирующие амплификацию локуса *iNOS*-гена *Bos taurus* длиной 258 bp, использованы и в качестве сиквенсных при расшифровке анализируемых нуклеотидных последовательностей на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) в лаборатории НПК «Синтол» (Россия) для детекции 6 SNP-маркеров (*AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*, *AH13-5* и *AH13-6*) методом прямого секвенирования ПЦР-продукта по Сэнгеру.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Биоинформационный анализ депонированных в GenBank NCBI нуклеотидных последовательностей локуса гена *iNOS Bos taurus* (AF465168, LR962749, OX344708), фланкируемых праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R*, свидетельствует о существовании не менее 6 однонуклеотидных полиморфизмов, рассматриваемых в качестве следующих SNP-маркеров: *AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*, *AH13-5* и *AH13-6*.

Синтетическая нуклеотидная последовательность анализируемого локуса гена, сформированная в результате множественного выравнивания депонированных в GenBank NCBI последовательностей, представлена на рисунке 1, где смешанные нуклеотиды в полиморфных позициях 6 SNP-маркеров выделены красным цветом.

При этом смешанный нуклеотид Y, локализованный в полиморфной позиции 70 синтетической последовательности локуса гена *iNOS*, ассоциирован с SNP-маркером *AH13-1*. Определенные для других SNP-маркеров смешанные нуклеотиды и их полиморфные позиции следующие: *AH13-2* (R, 114), *AH13-3* (R, 152), *AH13-4* (R, 230), *AH13-5* (K, 78) и *AH13-6* (Y, 82).

На этом же рисунке представлены полиморфные сайты рестрикции трех SNP-маркеров (*AH13-1*, *AH13-3* и *AH13-6*) и соответствующие ПЦР-ПДРФ-профили их возможных генотипов, сгенерированные при рестриционном картировании анализируемой последовательности ДНК, ограниченной уже внутренними праймерами *iNOS-F1* и *iNOS-R1* (рис. 1).

Конструирование dCAPS-праймеров *iNOS-F1* и *iNOS-R1* продиктовано необходимостью корректной идентификации генотипов SNP-маркеров

AH13-1, *AH13-3* и *AH13-6*. При этом введенные в 3'-концевые участки праймеров неспаренные (mismatch) нуклеотиды, выделенные серым цветом (рис. 1), приведут к искусственно созданным полиморфным сайтам рестрикции, затрагивающим SNP-маркеры *AH13-1* (*BsaHI*) и *AH13-3* (*AvaII*). Это в свою очередь позволит обеспечить и корректную идентификацию генотипов *AH13-6* ранее отобранной рестриктазой *HinfI*.

На рисунке 2 представлен результат *in silico* моделирования ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов полиморфных маркеров *AH13-1*, *AH13-3* и *AH13-6* гена *iNOS Bos taurus* с эндонуклеазами рестрикции *BsaHI*, *AvaII* и *HinfI* соответственно.

Генерация рассчитанных ПЦР-ПДРФ-фрагментов и ассоциированных с ними профилей генотипов опосредована полиморфной позицией: SNP-маркера *AH13-1* в положении 70, приводящей с dCAPS-праймером *iNOS-F1* к созданию участка узнавания рестриктазы *BsaHI* (GR/CGYC) при SNP с заменой тимина (Т) на цитозин (С); SNP-маркера *AH13-3* в положении 152, приводящей с dCAPS-праймером *iNOS-R1* к созданию участка узнавания рестриктазы *AvaII* (G/GWCC) при SNP с заменой аденина (А) на гуанин (G); SNP-маркера *AH13-6* в положении 82, приводящей к созданию участка узнавания рестриктазы *HinfI* (G/ANTC) при SNP с заменой цитозина (С) на тимин (Т) (рис. 1, 2).

Рис. 1. Синтетическая нуклеотидная последовательность локуса гена *iNOS Bos taurus* со смешанными нуклеотидами в полиморфных позициях 6 SNP-маркеров, включая полиморфные сайты рестрикции 3 SNP-маркеров (*AH13-1*, *AH13-3* и *AH13-6*) и ПЦР-ПДРФ-профили их возможных генотипов, сгенерированные при рестриционном картировании анализируемой последовательности ДНК, ограниченной уже внутренними праймерами *iNOS-F1* и *iNOS-R1*

Fig. 1. Synthetic nucleotide sequence of the *Bos taurus iNOS* gene locus with mixed nucleotides at polymorphic positions of 6 SNP markers, including polymorphic restriction sites of 3 SNP markers (*AH13-1*, *AH13-3* and *AH13-6*) and PCR-RFLP profiles of their possible genotypes generated by restriction mapping of the analyzed DNA sequence, already limited by internal primers *iNOS-F1* and *iNOS-R1*



В настоящем исследовании сконструированные dCAPS-праймеры *iNOS-F1* и *iNOS-R1*, инициирующие амплификацию локуса гена *iNOS Bos taurus* длиной 123 bp, были применены в статусе внутренних пар олигонуклеотидов при постановке вложенной ПЦР (2-й раунд) с использованием в качестве пробы ДНК 2 мкл амплификата 1-го раунда ПЦР, предварительно наработанного с праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R*.

При этом праймеры *iNOS-F* и *iNOS-R*, инициирующие амплификацию локуса гена *iNOS Bos taurus* длиной 258 bp, были использованы не только в статусе внешних пар олигонуклеотидов, но и в качестве сиквенсных при расшифровке анализируемых нуклеотидных последовательностей для детекции 6 SNP-маркеров методом прямого секвенирования ПЦР-продукта.

Наглядные фрагменты аналитической картины результата секвенирования амплифицированного локуса гена *iNOS Bos taurus* представлены на рисунке 3.

На нем в качестве примера идентификационного потенциала SNP-генотипирования анализом данных прямого секвенирования ПЦР-продукта локуса гена *iNOS Bos taurus* проведены детекция и интерпретация диагностически значимых однонуклеотидных полиморфизмов в контексте идентификации аллелей и генотипов 6 SNP-маркеров: *AH13-1* (генотип *CT*), *AH13-2* (генотип *GG*), *AH13-3* (генотип *AG*), *AH13-4* (генотип *AA*), *AH13-5* (генотип *TT*) и *AH13-6* (генотип *CT*).

Наглядные же примеры полученных электрофореграмм ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов SNP-маркеров *AH13-1*, *AH13-3* и *AH13-6* гена *iNOS Bos taurus*, сгенерированных с внутренними праймерами и отобранными рестриктазами, представлены на объединенном рисунке 4.

На нем в общей сложности запечатлены ПЦР-ПДРФ-профили трех генотипов SNP-маркеров *AH13-1* (*TT*, *CC*, *CT*) и *AH13-3* (*AA*, *GG*, *AG*), а также двух генотипов *AH13-6* (*CC* и *CT*). При этом генотип *TT* SNP-маркера *AH13-6* в ходе тестирования предложенного способа

Рис. 2. *In silico* моделирование ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов SNP-маркеров *AH13-1*, *AH13-3* и *AH13-6* гена *iNOS Bos taurus* (праймеры *iNOS-F1* и *iNOS-R1*). Обозначения: *BsaHI*-ПЦР-ПДРФ-профили генотипов SNP-маркера *AH13-1*: генотип *CC* (106/17 bp), генотип *TT* (123 bp), генотип *CT* (123/106/17 bp). *Avall*-ПЦР-ПДРФ-профили генотипов SNP-маркера *AH13-3*: генотип *AA* (123 bp), генотип *GG* (103/20 bp), генотип *AG* (123/103/20 bp). *HinfI*-ПЦР-ПДРФ-профили генотипов SNP-маркера *AH13-6*: генотип *CC* (123 bp), генотип *TT* (93/30 bp), генотип *CT* (123/93/30 bp)

Fig. 2. *In silico* modeling of PCR-RFLP profiles of genotypes of SNP markers *AH13-1*, *AH13-3* and *AH13-6* of the *Bos taurus iNOS* gene (primers *iNOS-F1* and *iNOS-R1*). Designation: *BsaHI*-PCR-RFLP profiles of genotypes of SNP marker *AH13-1*: genotype *CC* (106/17 bp), genotype *TT* (123 bp), genotype *CT* (123/106/17 bp). *Avall*-PCR-RFLP profiles of genotypes of SNP marker *AH13-3*: genotype *AA* (123 bp), genotype *GG* (103/20 bp), genotype *AG* (123/103/20 bp). *HinfI*-PCR-RFLP profiles of genotypes of the SNP marker *AH13-6*: genotype *CC* (123 bp), genotype *TT* (93/30 bp), genotype *CT* (123/93/30 bp)

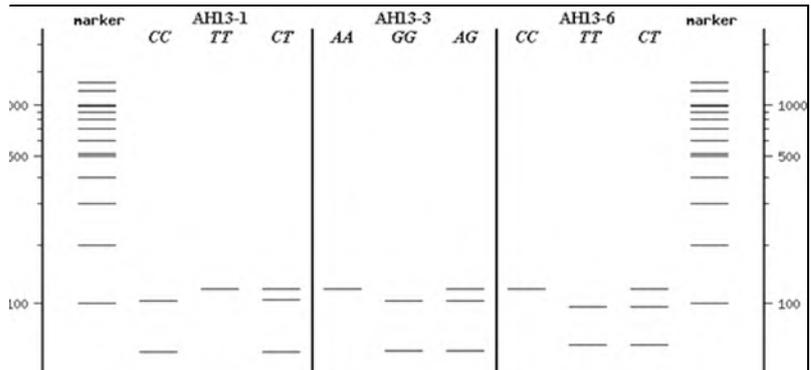


Рис. 3. Фрагменты аналитической картины результата капиллярного секвенирования амплифицированного локуса гена *iNOS Bos taurus*

Fig. 3. Fragments of the analytical picture of the result of capillary sequencing of the amplified locus of the *Bos taurus iNOS* gene

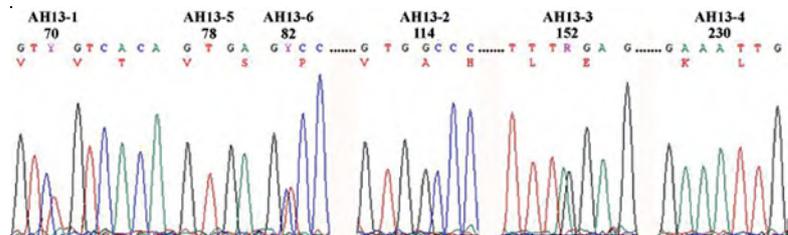
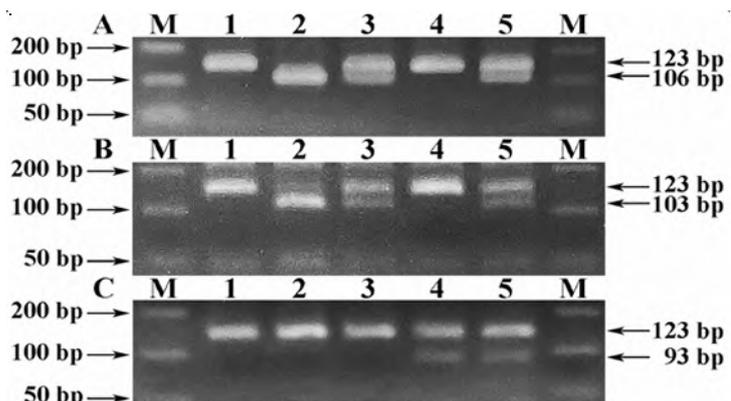


Рис. 4. Электрофореграммы ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов SNP-маркеров *AH13-1*, *AH13-3* и *AH13-6* гена *iNOS Bos Taurus*. Обозначение: М) маркеры длин ДНК. А — *BstACI*-ПЦР-ПДРФ-профили генотипов SNP-маркера *AH13-1*: 1, 4) генотип *TT* (123 bp); 2) генотип *CC* (106/17 bp); 3, 5) генотип *CT* (123/106/17 bp). В — *Bme18I*-ПЦР-ПДРФ-профили генотипов SNP-маркера *AH13-3*: 1, 4) генотип *AA* (123 bp); 2) генотип *GG* (103/20 bp); 3, 5) генотип *AG* (123/103/20 bp). С — *HinfI*-ПЦР-ПДРФ-профили генотипов SNP-маркера *AH13-6*: 1, 2, 3) генотип *CC* (123 bp); 4, 5) генотип *CT* (123/93/30 bp)

Fig. 4. Electropherograms of PCR-RFLP profiles of genotypes of SNP markers *AH13-1*, *AH13-3* and *AH13-6* of the *Bos taurus iNOS* gene. Designation: М) DNA length markers. А — *BstACI*-PCR-RFLP profiles of genotypes of SNP marker *AH13-1*: 1, 4) genotype *TT* (123 bp); 2) genotype *CC* (106/17 bp); 3, 5) genotype *CT* (123/106/17 bp). В — *Bme18I*-PCR-RFLP profiles of genotypes of SNP marker *AH13-3*: 1, 4) genotype *AA* (123 bp); 2) genotype *GG* (103/20 bp); 3, 5) genotype *AG* (123/103/20 bp). С — *HinfI*-PCR-RFLP profiles of genotypes of the SNP marker *AH13-6*: 1, 2, 3) *CC* genotype (123 bp); 4, 5) *CT* genotype (123/93/30 bp)



генотипирования в исследуемой выборке крупного рогатого скота не выявлен.

Следует отметить, что дополнительно отобранные эндонуклеазы рестрикции (*BsaHI* и *Avall*) были успешно заменены на их прототипы, в частности *BsaHI* на изошизомер *BstACI*, а *Avall* на изошизомер *Bme18I*. Данные изошизомеры и рестриктаза *HinfI* доступны к приобретению на территории Российской Федерации благодаря их производству и реализации отечественной компанией ООО «СибЭнЗайм».

Выводы/Conclusions

Сконструированные dCAPS-праймеры *iNOS-F1* и *iNOS-R1*, предназначенные для корректной идентификации генотипов SNP-маркеров *AH13-1*, *AH13-3*, *AH13-6*, успешно протестированы при постановке вложенной ПЦР в статусе внутренних пар

олигонуклеотидов с последующей процедурой эндонуклеазного расщепления амплифицированного локуса гена *iNOS Bos taurus* длиной 123 bp подобранными рестриктазами, диагностически значимыми для определенного полиморфного маркера. Амплификат 1-го раунда ПЦР длиной 258 bp, предварительно наработанный с праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R* в статусе внешних пар олигонуклеотидов, был подвергнут секвенированию ДНК для детекции и интерпретации диагностически значимых однонуклеотидных полиморфизмов в контексте идентификации аллелей и генотипов 6 SNP-маркеров: *AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*, *AH13-5* и *AH13-6*.

Использованные в работе ДНК-технологии являются действенными подходами к корректному генотипированию крупного рогатого скота по SNP-маркерам гена *iNOS*.

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

- 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>
- 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>
- 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.
- 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](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00096-0)
- 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)
- 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>
- 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>
- 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. <https://www.elibrary.ru/nnhnwb>
- Kocaman B., Toy S., Maraklı S. Application of different molecular markers in biotechnology. *International Journal of Science Letters*. 2020; 2(2): 98–113. <https://doi.org/10.38058/ijsl.770081>
- 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>
- 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(11): 2857–2864. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.407>

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

- 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>
- 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>
- 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.
- 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](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00096-0)
- 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)
- 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>
- 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>
- 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). <https://www.elibrary.ru/nnhnwb>
- Kocaman B., Toy S., Maraklı S. Application of different molecular markers in biotechnology. *International Journal of Science Letters*. 2020; 2(2): 98–113. <https://doi.org/10.38058/ijsl.770081>
- 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>
- 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(11): 2857–2864. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.407>

12. 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/urlbzl>

13. Kuzhebaeva U.Zh., 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>

14. 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; (7): 74–77. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-384-7-74-78>

15. Hrubá M. dCAPS method: advantages, troubles and solution. *Plant, Soil and Environment*. 2007; 53(9): 417–420. <https://doi.org/10.17221/2293-PSE>

16. Shendure J. *et al.* DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017; 550(7676): 345–353. <https://doi.org/10.1038/nature24286>

12. 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/urlbzl>

13. Kuzhebaeva U.Zh., 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>

14. 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; (7): 74–78 (in Russian). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-384-7-74-78>

15. Hrubá M. dCAPS method: advantages, troubles and solution. *Plant, Soil and Environment*. 2007; 53(9): 417–420. <https://doi.org/10.17221/2293-PSE>

16. Shendure J. *et al.* DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017; 550(7676): 345–353. <https://doi.org/10.1038/nature24286>

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>

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

ABOUT THE AUTHORS

Ramil Rishadovich Vafin

Doctor of Biological Sciences, Professor of RAS, 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>

Federal Scientific Centre VIEV,

24 Ryazan Ave., Moscow, 109428, Russia

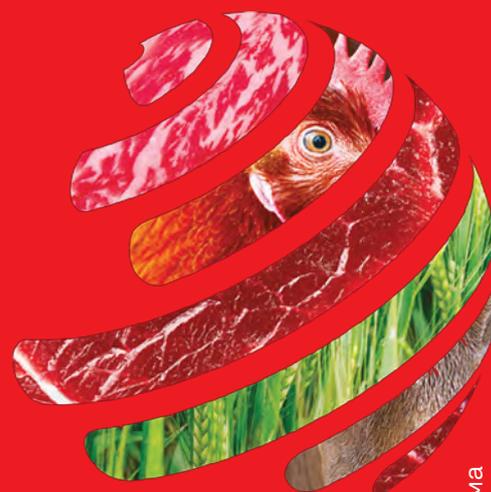
МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА И САММИТ



МЯСНАЯ & КУРИНЫЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТЬ & КОРОЛЬ
ИНДУСТРИЯ ХОЛОДА для АПК
MAP Russia 2025

27–29 МАЯ

Москва, Россия



Реклама



Асти Групп
выставочная компания

Организатор:
ООО «Выставочная компания Асти Групп»
Тел. / WA Business: +7 (495) 797 6914
E-mail: info@meatindustry.ru
www.meatindustry.ru

