



Р.Р. Вафин

Х.Х. Гильманов ✉

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

✉ [gilmanov.xx@mail.ru](mailto:gilmanov.xx@mail.ru)

Поступила в редакцию: 17.03.2025

Одобрена после рецензирования: 11.07.2025

Принята к публикации: 26.07.2025

© Вафин Р.Р., Гильманов Х.Х.

## Способы проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота по анализируемым SNP-маркерам гена *iNOS*

### РЕЗЮМЕ

Современное развитие генетико-селекционных технологий требует углубленного изучения молекулярно-генетических механизмов, определяющих устойчивость крупного рогатого скота к лейкозу. В этом контексте исследование полиморфизма гена *iNOS* *Bos taurus* представляет особую научную и практическую значимость, поскольку его результаты могут быть использованы для совершенствования селекционных программ, направленных на повышение как продуктивности животных, так и их резистентности к хроническим инфекционным заболеваниям.

**Цель настоящего исследования** — разработка способов проведения ПЦР в реальном времени в формате гибридизационно-флуоресцентной детекции однонуклеотидных полиморфизмов для генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркерам *AH13-1* и *AH13-6* гена *iNOS*.

Дизайн модифицированных и немодифицированных олигонуклеотидов, формирующих для определенного полиморфного маркера свой набор из 5'-флуоресцентно-меченых аллель-специфических праймеров, анти-праймера, меченого гасителем флуоресценции с 3'-конца олигонуклеотида, а также общего праймера, выполнен в программе OligoAnalyzer 1.2. Разработанные способы, протестированные в данной работе, относятся к разновидности анти-праймер-опосредованной количественной ПЦР в реальном времени, гибридизационно-флуоресцентный формат детекции которой обеспечивает корректную интерпретацию данных кривых роста сигнала флуоресценции. Их достоверность подкреплена ПЦР-ПДРФ-анализом с подобранными праймерами и эндонуклеазой рестрикции, тоже способными к идентификации генотипов искомым SNP-маркерам. При этом предложенные способы проведения ПЦР в реальном времени по сравнению с ПЦР-ПДРФ-анализом более экспрессны, так как не требуют времязатратных процедур эндонуклеазного расщепления и последующего электрофоретического разделения генерируемых фрагментов.

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

**Для цитирования:** Вафин Р.Р., Гильманов Х.Х. Способы проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота по анализируемым SNP-маркерам гена *iNOS*. *Аграрная наука*. 2025; 397(08): 58–63.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2025-397-08-58-63>



Ramil R. Vafin

Khamid Kh. Gilmanov ✉

Federal State Budget Scientific Institution  
"Federal Scientific Centre VIEV",  
Moscow, Russia

✉ [gilmanov.xx@mail.ru](mailto:gilmanov.xx@mail.ru)

Received by the editorial office: 17.03.2025

Accepted in revised: 11.07.2025

Accepted for publication: 26.07.2025

© Vafin R.R., Gilmanov Kh.Kh.

## Methods of conducting real-time PCR for genotyping cattle by analyzed SNP markers of the *iNOS* gene

### ABSTRACT

Modern development of genetic and selection technologies requires in-depth study of molecular genetic mechanisms determining cattle resistance to leukemia. In this context, the study of the *iNOS* gene polymorphism in *Bos taurus* is of particular scientific and practical importance, since its results can be used to improve breeding programs aimed at increasing both animal productivity and their resistance to chronic infectious diseases. The aim of this study was to develop methods for real-time PCR in the format of hybridization-fluorescence detection of single nucleotide polymorphisms for genotyping cattle by SNP markers *AH13-1* and *AH13-6* of the *iNOS* gene. The design of modified and unmodified oligonucleotides forming for a certain polymorphic marker their own set of 5'-fluorescently labeled allele-specific primers, an anti-primer labeled with a fluorescence quencher from the 3'-end of the oligonucleotide, and a common primer was performed in the OligoAnalyzer 1.2 program. The developed methods tested in this work belong to a variety of anti-primer-mediated quantitative real-time PCR, the hybridization-fluorescence detection format of which ensures correct interpretation of the fluorescence signal growth curve data. Their reliability is supported by PCR-RFLP analysis with selected primers and restriction endonucleases, which are also capable of identifying the genotypes of the sought SNP markers. Moreover, the proposed methods for conducting real-time PCR are more expressive compared to PCR-RFLP analysis, since they do not require time-consuming procedures of endonuclease cleavage and subsequent electrophoretic separation of the generated fragments.

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

**For citation:** Vafin R.R., Gilmanov Kh.Kh. Methods of conducting real-time PCR for genotyping cattle by analyzed SNP markers of the *iNOS* gene. *Agrarian science*. 2025; 397(08): 58–63 (in Russian).

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2025-397-08-58-63>

## Введение/Introduction

Индукцибельная синтаза оксида азота (iNOS) — ключевой фермент, катализирующий синтез оксида азота (NO) и его реактивных форм [1, 2]. Эти молекулы играют важную роль: выступают медиаторами врожденного иммунитета, подавляя патогены, и регулируют апоптоз, влияя на патофизиологические процессы [3–5].

Исследования полиморфизма гена *iNOS Bos taurus* приобретают особую значимость в контексте генетической селекции. Установленная ассоциация его аллельных вариантов с устойчивостью к лейкозу [6, 7] и молочной продуктивностью [7, 8] делает этот локус перспективной мишенью для разработки стратегий сохранения здоровья стада и повышения его продуктивности.

Для оценки генетического разнообразия в локусе *iNOS* широко применяется метод полимеразной цепной реакции, совмещенный с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ-анализ), позволяющий идентифицировать полиморфные маркеры через рестриktion амплифицированных фрагментов ДНК [9–11]. Данный метод использован при разработке способов ПЦР-ПДРФ-генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркерам (Single Nucleotide Polymorphism — однонуклеотидный полиморфизм), локализованным в анализируемом локусе гена [12, 13].

Корректная детекция ряда полиморфных маркеров может быть осуществлена с использованием модифицированной методики dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences — производные расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности), создающей искусственный сайт рестрикции за счет реконструированного праймера [14], а также прямым секвенированием ПЦР-продукта, обеспечивающим точное определение нуклеотидных замен [15].

При этом наряду с вышеперечисленными ДНК-технологиями могут быть востребованы и способы проведения ПЦР в реальном времени в формате гибридационно-флуоресцентной детекции однонуклеотидных полиморфизмов благодаря их экспрессности [16].

Интеграция разрабатываемых диагностикомов в систему молекулярно-генетического тестирования племенного поголовья способствует не только выявлению ассоциаций между SNP-маркерами и хозяйственно ценными признаками, но и формированию высокопродуктивных и генетически резистентных к лейкозу популяций крупного рогатого скота, что является ключевым направлением современной селекционной практики.

**Цель исследования** — разработка способов проведения ПЦР в реальном времени в формате гибридационно-флуоресцентной детекции однонуклеотидных полиморфизмов для генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркерам *AH13-1* и *AH13-6* гена *iNOS*.

## Материалы и методы исследования / Materials and methods

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

Экстракция нуклеиновых кислот из 100 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).

Дизайн олигонуклеотидов для проведения ПЦР в реальном времени в формате гибридационно-флуоресцентной детекции с целью идентификации аллелей и генотипов SNP-маркеров *AH13-1* и *AH13-6* гена *iNOS Bos taurus* выполнен в программе OligoAnalyzer 1.2 (Teemu Kuulasma, Финляндия).

Перечень сконструированных олигонуклеотидов, включающий для определенного SNP-маркера свой набор из 5'-флуоресцентно-меченых аллель-специфических праймеров, антипраймера, меченого гасителем флуоресценции с 3'-конца олигонуклеотида, а также общего праймера, представлен в таблице 1.

Таблица 1. Перечень сконструированных олигонуклеотидов

Table 1. List of constructed oligonucleotides

Наименование и последовательность олигонуклеотидов	SNP-маркер
70C-F: 5'-FAM-CTTGGCTTCTCAGGGAATC-3' 70T-F: 5'-VIC-CTTGGCTTCTCAGGACTT-3' 70-S: 5'-CCTGAAGAAGCCAAG-BHQ1-3' 82-R: 5'-ACTAGGCTCACGGAGG-3'	<i>AH13-1</i>
82C-R: 5'-ROX-ACTAGGCTCACGGAGGCAGG-3' 82T-R: 5'-Cy5-ACTAGGCTCACGGAGGCCGA-3' 82-S: 5'-CTCCGTGAGCCTAGT-BHQ3-3' 70-F: 5'-GACCTTGGCTTCTCAGGGAGT-3'	<i>AH13-6</i>

Способы проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркерам *AH13-1* и *AH13-6* гена *iNOS* выполнены на амплификаторе Tianlong Gentier 96E (Tianlong, Китай). Готовые реакционные смеси объемом по 20 мкл включали в себя 14,2 мкл стерильной воды, 2 мкл dNTPs (2,5 мМ исходной концентрации каждого трифосфата), 2 мкл стандартного буфера для Taq ДНК полимеразы (10×), 0,2 мкл Taq ДНК полимеразы (5 ед.), 0,2 мкл микса 5'-флуоресцентно-меченых аллель-специфических праймеров (25 мкМ каждого праймера), 0,2 мкл антипраймера (50 мкМ), 0,2 мкл общего праймера (50 мкМ), 1 мкл пробы ДНК 1-го раунда ПЦР.

Режимы термоциклирования и детекции для SNP-маркера *AH13-1*: ×1: 94 °C — 4 мин.; ×20: 94 °C — 10 сек., 60 °C — 10 сек., 72 °C — 10 сек., 50 °C — 10 сек. (FAM — канал детекции № 1 / VIC — канал детекции № 2). Режимы термоциклирования

и детекции для SNP-маркера *AH13-6*: ×1: 94 °C — 4 мин.; ×20: 94 °C — 10 сек., 65 °C — 10 сек., 72 °C — 10 сек., 55 °C — 10 сек. (ROX — канал детекции № 3 / Cy5 — канал детекции № 4).

Постановка 1-го раунда ПЦР с праймерами *iNOS-F* и *iNOS-R* для амплификации локуса гена *iNOS Bos taurus* длиной 258 bp осуществлена набором реагентов Epcyclo Plus PCR kit (ЗАО «Евроген», Россия) согласно ранее использованному протоколу [13]. Дополнительно проведенная полугнездовая ПЦР с праймерами *iNOS-F1* и *iNOS-R* для амплификации локуса гена *iNOS Bos taurus* длиной 209 bp выполнена с Taq ДНК полимеразой со стандартным буфером (ООО «СибЭнзайм», Россия).

Процедура эндонуклеазного расщепления наработанных с праймерами *iNOS-F1* и *iNOS-R* ампликонов осуществлена рестриктазами, подобранными для определенного SNP-маркера. В частности, для детекции полиморфных позиций SNP-маркера *AH13-1* 10 мкл амплификата смешивали с равным объемом ПДРФ-смеси, содержащей 2 ед. *Bst*ACI в SE-буфере W (ООО «СибЭнзайм», Россия) или 2 ед. *Bst*ACI и 5 ед. *Hae*III в SE-буфере G (ООО «СибЭнзайм», Россия), инкубируя 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 *AH13-6* (5 ед. *Hinf*I в SE-буфере O (ООО «СибЭнзайм», Россия)).

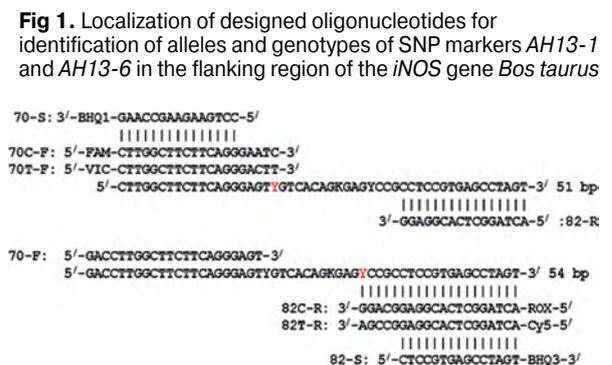
Инкубированные ПЦР-ПДРФ-пробы, окрашенные буфером для нанесения образцов ДНК 4X Gel Loading Dye, Blue (ЗАО «Евроген», Россия), вносили в лунки 3%-ного агарозного геля в объеме 20 мкл и подвергали горизонтальному электрофорезу в TAE буфере (pH 8,0) (ЗАО «Евроген», Россия) с последующей визуализацией электрофореграмм в УФ-трансиллюминаторе.

**Результаты и обсуждение / Results and discussion**

Авторами разработаны способы проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркерам *AH13-1* и *AH13-6* гена *iNOS* в формате гибридно-флуоресцентной детекции, предусматривающие использование для определенного полиморфного маркера своего набора модифицированных и немодифицированных олигонуклеотидов, куда входят 5'-флуоресцентно-меченые аллель-специфические праймеры (70С-F + 70Т-F для *AH13-1* и 82С-R + 82Т-R для *AH13-6*), общий праймер (82-R для *AH13-1* и 70-F для *AH13-6*), и антипраймер (70-S для *AH13-1* и 82-S для *AH13-6*), меченый гасителем флуоресценции с 3'-конца олигонуклеотида.

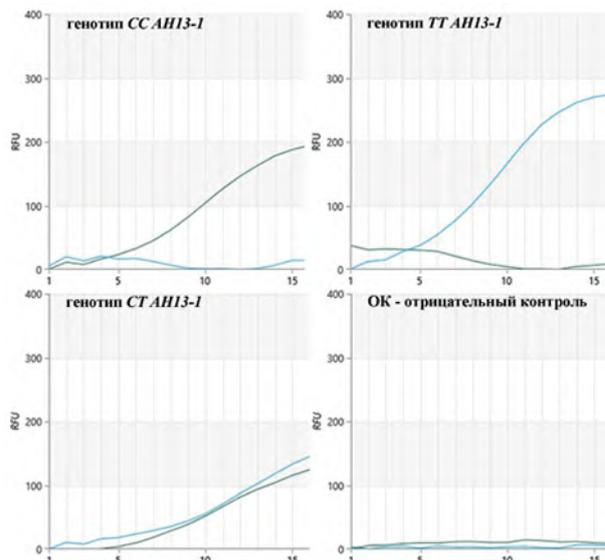
Локализация сконструированных олигонуклеотидов во фланкируемой ими области гена *iNOS Bos taurus* отображена на рисунке 1.

**Рис. 1.** Локализация сконструированных олигонуклеотидов для идентификации аллелей и генотипов SNP-маркеров *AH13-1* и *AH13-6* во фланкируемой области гена *iNOS Bos taurus*



**Рис. 2.** Результат проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркеру *AH13-1*

**Fig. 2.** Result of real-time PCR for genotyping cattle using the *AH13-1* SNP marker



центра, характерные для генотипа *CC* (канал FAM, зеленая линия), генотипа *TT* (канал VIC, голубая линия) и генотипа *CT* (каналы FAM и VIC, зеленая и голубая линии). Ось ординат отражает относительные единицы флуоресценции (RFU). Ось абсцисс отражает циклы амплификации.

Note: kinetic curves of fluorescence signal growth characteristic of the *CC* genotype (FAM channel, green line), *TT* genotype (VIC channel, blue line) and *CT* genotype (FAM and VIC channels, green and blue lines). The ordinate axis reflects relative fluorescence units (RFU). The abscissa axis reflects amplification cycles.

Наглядный пример результата тестирования разработанного способа проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркеру *AH13-1* представлен на рисунке 2.

Другой пример результата тестирования еще одного предложенного способа проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота уже по SNP-маркеру *AH13-6* наглядно продемонстрирован на рисунке 3.

В результате тестирования разработанных способов проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркерам *AH13-1* и *AH13-6* получены

обеспечиваемые предложенными генодиагностическими подходами технические результаты, выраженные в эффективной идентификации искомым генотипов определенных полиморфных маркеров ввиду корректной интерпретации данных кривых роста сигнала флуоресценции (рис. 2, 3).

Предложенные способы, протестированные в настоящей работе, относятся к разновидности антипраймер-опосредованной количественной ПЦР в реальном времени (antiprimer-based quantitative real-time PCR, aQRT-PCR) [16], способной эффективно идентифицировать однонуклеотидный полиморфизм. При этом основное отличие от прототипа кроется в конструктивной особенности 5'-флуоресцентно-меченых аллель-специфических праймеров, полностью состоящих из ген-специфических последовательностей, 5'-концевые участки которых способны к конкурентной гибридизации с комплементарным антипраймером, меченым гасителем флуоресценции с 3'-конца олигонуклеотида.

Следует отметить, что достоверность полученных результатов подкреплена данными ПЦР-ПДРФ-анализа с подобранными наборами праймеров и рестриктаз, в том числе способных к идентификации генотипов SNP-маркеров *AH13-1* и *AH13-6*.

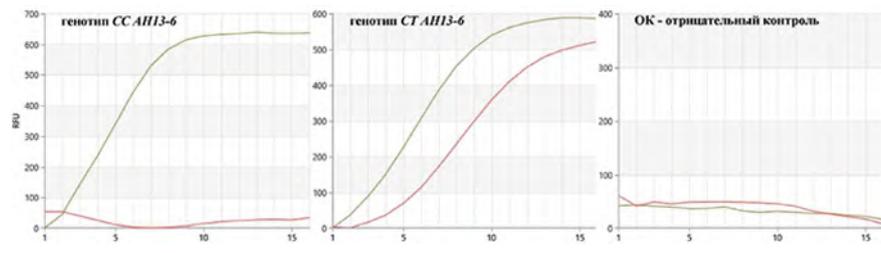
В настоящем исследовании сконструированный dCAPS праймер *iNOS-F1* применен в статусе внутреннего олигонуклеотида в полугнездовой ПЦР вместе с внешним праймером *iNOS-R*, инициирующим амплификацию локуса гена *iNOS Bos taurus* длиной 209 bp.

Локализация использованных праймеров во фланкируемых ими областях локуса гена *iNOS* отображена на рисунке 4.

Помимо этого, на рисунке 4 представлены и полиморфные сайты рестрикции SNP-маркеров

**Рис. 3.** Результат проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркеру *AH13-6*

**Fig. 3.** Result of real-time PCR for genotyping cattle using the *AH13-6* SNP marker



*Примечание:* кинетические кривые роста сигнала флуоресценции, характерные для генотипа *CC* (канал ROX, коричневая линия), генотипа *TT* (канал Cy5, красная линия) и генотипа *CT* (каналы ROX и Cy5, коричневая и красная линии). Ось ординат отражает относительные единицы флуоресценции (RFU). Ось абсцисс отражает циклы амплификации.

*Note:* kinetic curves of fluorescence signal growth characteristic of the *CC* genotype (ROX channel, brown line), *TT* genotype (Cy5 channel, red line) and *CT* genotype (ROX and Cy5 channels, brown and red lines). The ordinate axis reflects relative fluorescence units (RFU). The abscissa axis reflects amplification cycles.

**Рис. 4.** Синтетическая нуклеотидная последовательность локуса гена *iNOS Bos taurus* с локализацией использованных праймеров и полиморфных сайтов рестрикции SNP-маркеров *AH13-1* и *AH13-6* со сгенерированными ПЦР-ПДРФ-профилями их возможных генотипов

**Fig. 4.** Synthetic nucleotide sequence of the *iNOS* gene *Bos taurus* locus with localization of the primers used and polymorphic restriction sites of SNP markers *AH13-1* and *AH13-6* with generated PCR-RFLP profiles of their possible genotypes

```

iNOS-F                               iNOS-F1
AGGCGGGTTT AAGCTCCTAG              C CTGGCTTCT
001 AGGCGGGTTT AAGCTCCTAG AGAGGCCAGA GAGGAAGAAA GTAGAAAGAC CTGGCTTCT
      BsaHI
TCAGGGCGT                            HinfI                               HaeIII
061 TCAGGGAGT Y GTCACAGKGA GYCCGCCTCC GTGAGCCTAG TGCCTCATCA GTGRCCATT
121 TCCTTGGTTT CTTTCTGACT TGAACCATT TRGAGGAGAC AGGGGGGATC TTTAAGAGGT
181 AACTTCAGTC TTCGAGGTTA GGGTCCCCAC TTTGTAGAGG GGATGAGAAR TTGGTTTTGC
      iNOS-R      ПЦР-продукт с праймерами
AGCTGATGGG TCCAGTGT iNOS-F+iNOS-R iNOS-F1+iNOS-R
241 AGCTGATGGG TCCAGTGT      258 bp      209 bp
    
```

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

*Bsa*HI-ПЦР-ПДРФ-профили генотипов (рестрикционное картирование):  
 Нуклеотид С (генотип *CC*) = 192/17 bp (1-17/18-209 nt)  
 Нуклеотид Т (генотип *TT*) = 209 bp (1-209 nt)  
 Нуклеотид Y (генотип *CT*) = 209/192/17 bp

*Bsa*HI-*Hae*III-ПЦР-ПДРФ-профили генотипов (рестрикционное картирование):

Нуклеотид С (генотип *CC*) = 144/48/17 bp (1-17/18-65/66-209 nt)  
 Нуклеотид Т (генотип *TT*) = 144/65 bp (1-65/66/209 nt)  
 Нуклеотид Y (генотип *CT*) = 144/65/48/17 bp

**SNP-маркер *AH13-6*, полиморфная позиция 82**

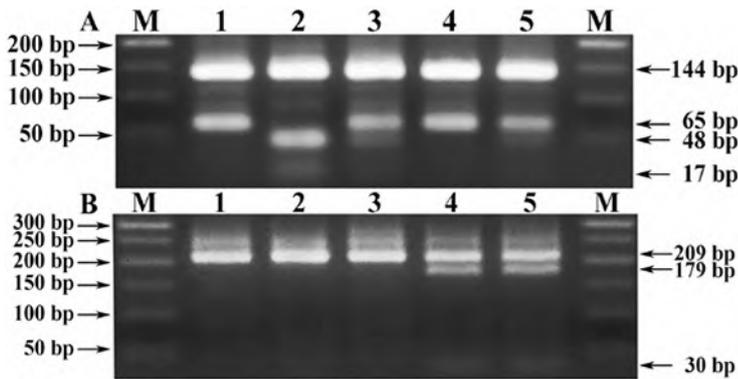
*Hinf*I-ПЦР-ПДРФ-профили генотипов (рестрикционное картирование):  
 Нуклеотид С (генотип *CC*) = 209 bp (1-209 nt)  
 Нуклеотид Т (генотип *TT*) = 179/30 bp (1-30/31-209 nt)  
 Нуклеотид Y (генотип *CT*) = 209/179/30 bp

*AH13-1* и *AH13-6*, а также соответствующие ПЦР-ПДРФ-профили их возможных генотипов, сгенерированные при рестрикционном картировании анализируемой последовательности ДНК, ограниченной уже внутренним (*iNOS-F1*) и внешним (*iNOS-R*) праймерами (рис. 4).

Наглядные примеры полученных электрофореграмм ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов SNP-маркеров *AH13-1* и *AH13-6* гена *iNOS Bos taurus*, сгенерированных с отобранными праймерами и рестриктазами, представлены на рисунке 5.

**Рис. 5.** Электрофореграммы ПЦР-ПДРФ-профилей генотипов SNP-маркеров *AH13-1* и *AH13-6* гена *iNOS Bos Taurus*: М) Маркеры длин ДНК. А — *Bst*ACI-*Hae*III-ПЦР-ПДРФ-профили генотипов SNP-маркера *AH13-1*: 1, 4) генотип *TT* (144/65 bp); 2) генотип *CC* (144/48/17 bp); 3, 5) генотип *CT* (144/65/48/17 bp). В — *Hinf*I-ПЦР-ПДРФ-профили генотипов SNP-маркера *AH13-6*: 1, 2, 3) генотип *CC* (209 bp); 4, 5) генотип *CT* (179/30 bp).

**Fig. 5.** Electropherograms of PCR-RFLP profiles of genotypes of SNP markers *AH13-1* and *AH13-6* of the *iNOS Bos taurus*: М) DNA length markers. А — *Bst*ACI-*Hae*III-PCR-RFLP profiles of genotypes of SNP marker *AH13-1*: 1, 4) genotype *TT* (144/65 bp); 2) genotype *CC* (144/48/17 bp); 3, 5) genotype *CT* (144/65/48/17 bp). В — *Hinf*I-PCR-RFLP profiles of genotypes of SNP marker *AH13-6*: 1, 2, 3) genotype *CC* (209 bp); 4, 5) genotype *CT* (179/30 bp)



На них в общей сложности запечатлены ПЦР-ПДРФ-профили трех генотипов SNP-маркеров *AH13-1* (*TT*, *CC*, *CT*), а также двух генотипов *AH13-6* (*CC* и *CT*). Третий генотип *TT* SNP-маркера *AH13-6* в ходе генотестирования в исследуемой выборке крупного рогатого скота не выявлен.

Полученные результаты генотестирования с внутренним (*iNOS-F1*) и внешним (*iNOS-R*) праймерами в постановке полугнездовой ПЦР и отобранными рестриктазами согласуются

с результатами ранее проведенной гнездовой ПЦР с внутренними (*iNOS-F1* и *iNOS-R1*) праймерами и последующего ПДРФ-анализа для идентификации SNP-маркеров гена *iNOS* крупного рогатого скота [17], что свидетельствует об их достоверности.

**Выводы/Conclusions**

Разработанные способы проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркерам *AH13-1* и *AH13-6* гена *iNOS* являются действенными подходами к идентификации искомым однонуклеотидных полиморфизмов. Гибридизационно-флуоресцентный формат детекции использованной разновидности антипраймер-опосредованной ПЦР в реальном времени обеспечивает корректную интерпретацию данных кривых роста сигнала флуоресценции.

Достоверность полученных результатов подкреплена ПЦР-ПДРФ-анализом с подобранными наборами праймеров и рестриктаз, способных к идентификации генотипов SNP-маркеров *AH13-1* и *AH13-6* гена *iNOS Bos taurus*. Однако, в отличие от ПЦР-ПДРФ-анализа, предложенные способы проведения ПЦР в реальном времени не требуют времязатратных процедур эндонуклеазного расщепления и последующего электрофоретического разделения генерируемых фрагментов.

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>
- 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., Röllinghoff 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)

**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>
- 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., Röllinghoff 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. 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. 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>
8. Чичинина С.В. Роль аллельной вариабельности 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>
9. 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>
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. 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. 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>
13. Вафин Р.Р., Гильманов Х.Х., Шастин П.Н. Тестирование разработанного способа ПЦР-ПДФ-генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркерам гена *iNOS*. *Аграрная наука*. 2024; (7): 74–78.  
<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-384-7-74-78>
14. Hrubá M. dCAPS method: advantages, troubles and solution. *Plant, Soil and Environment*. 2007; 53(9): 417–420.  
<https://doi.org/10.17221/2293-PSE>
15. Shendure J. *et al.* DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017; 550(7676): 345–353.  
<https://doi.org/10.1038/nature24286>
16. Li J., Makrigiorgos G.M. Anti-primer quenching-based real-time PCR for simplex or multiplex DNA quantification and single-nucleotide polymorphism genotyping. *Nature Protocols*. 2007; 2(1): 50–58.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.11>
17. Вафин Р.Р., Гильманов Х.Х. ДНК-технологии идентификации аллелей и генотипов полиморфных маркеров анализируемого локуса гена *iNOS Bos taurus*. *Аграрная наука*. 2025; (5): 89–94.  
<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2025-394-05-89-94>
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. 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>
8. Chichinina 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).  
<https://www.elibrary.ru/nnhnwb>
9. 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>
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. 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. 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>
13. 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>
14. Hrubá M. dCAPS method: advantages, troubles and solution. *Plant, Soil and Environment*. 2007; 53(9): 417–420.  
<https://doi.org/10.17221/2293-PSE>
15. Shendure J. *et al.* DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017; 550(7676): 345–353.  
<https://doi.org/10.1038/nature24286>
16. Li J., Makrigiorgos G.M. Anti-primer quenching-based real-time PCR for simplex or multiplex DNA quantification and single-nucleotide polymorphism genotyping. *Nature Protocols*. 2007; 2(1): 50–58.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.11>
17. 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; (5): 89–94 (in Russian).  
<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2025-394-05-89-94>

**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.Р. 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