

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ, СЕЛЕКЦИЯ,  
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 619:616.995.1

СРАВНЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *DRB1* ДВУХ ПОПУЛЯЦИЙ ОВЕЦ  
РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ МЕТОДАМИ РЕСТРИКЦИОННОГО  
КАРТИРОВАНИЯ И СЕКВЕНИРОВАНИЯ

© 2025 г. С. Н. Марзанова<sup>1</sup> \*, Д. А. Девришов<sup>1</sup>,  
В. А. Жучков<sup>1</sup>, Е. А. Николаева<sup>1</sup>, Н. С. Марзанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина,  
Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, Москва, 109472 Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, Министерство науки  
и высшего образования Российской Федерации, Московская область, Подольск, пос. Дубровицы, 142132 Россия

\*e-mail: s.marzanova@mail.ru

Поступила в редакцию 26.10.2024 г.

После доработки 18.01.2025 г.

Принята к публикации 22.01.2025 г.

Статья посвящена разработке метода диагностики аллелей экзона-2 гена *DRB1* лейкоцитарного антигена овец (OLA). В качестве модели использованы две популяции овец романовской породы. Исследования проводили методом рестрикционного картирования с использованием рестриктаз *SacI*, *SacII*, *MvaI*, *HinII* и *HaeIII*. Вертикальный электрофорез гидролизованных фрагментов ДНК проводили в 10%-ном полиакриламидном геле. Для анализа секвенированных последовательностей использовали компьютерную программу SnapGene©, а для обработки полученных данных – программу MS Excel 2023. Аллелофонд в *DRB1* локусе обеих популяций овец был представлен 25 разными аллелями. В популяции № 1 идентифицировано 19 аллелей, в популяции № 2 – 17. Совпадение между двумя выборками составило 44%, то есть выявлено 11 идентичных аллелей. После выравнивания нуклеотидных последовательностей и оценки удаленности аллелей друг от друга было построено филогенетическое дерево. Наличие тест-системы для анализа аллелей в локусе *DRB1* важно для оценки уровня биоразнообразия пород овец, а также их генетической устойчивости или предрасположенности к различным заболеваниям.

**Ключевые слова:** овцы, романовская порода, главный комплекс гистосовместимости, лейкоцитарный антиген овец, *DRB1*, экзон 2, локус, праймеры, генотип, аллель

**DOI:** 10.56304/S0234275825010090

В последние годы в животноводстве активно идут исследования генов главного комплекса гистосовместимости (МНС) как факторов устойчивости или восприимчивости животных к различным заболеваниям с целью оптимизации стратегий селекции. Лейкоцитарный антиген овец (Ovine leukocyte antigen, OLA), часть МНС овец, включает три класса генов: OLA-I, OLA-II, OLA-III, – которые локализуются на хромосоме 20 в области q15–q23 [1]. Система OLA – это семейство множества генов, контролирующего иммунологическое распознавание по принципу “Я/не-Я” [2–9]. Обозначение локусов OLA возникло в результате

добавления “Ovar” (*Ovis aries*) к известным обозначениям локусов у человека. Так, класс OLA-I у овец представлен пока одним локусом *Ovar-N*, кодирующим 32 аллеля; OLA-II – аллелями 5 локусов: *Ovar-DRB1*, *Ovar-DQA1*, *Ovar-DQA2*, *Ovar-DQB1* и *Ovar-DQB2*. Сюда же относятся два локуса *Ovca-DRA* и *Ovca-DRB1*, идентифицированные у диких канадских толсторогов (*Ovis canadensis*, отсюда и аббревиатура *Ovca*). В список вошли еще два локуса, близкие к *DQB* человека: *Ovar-DQB2like* и *Ovar-DQA2like*. Все 10 локусов OLA полиморфные. Наибольший полиморфизм выявлен для *Ovar-DRB1* ( $n = 130$ ), потом следуют *Ovar-N* ( $n = 32$ ), *Ovar-DQB2* ( $n = 27$ ) и *Ovar-DQB1* ( $n = 22$ ) и группа из четырех локусов: *Ovar-DQA2* ( $n = 14$ ), *Ovar-DQA1* ( $n = 12$ ), *Ovca-DRA* ( $n = 10$ ) и *Ovca-DRB1* ( $n = 8$ ). Меньше всего полиморфных аллелей выявлено в *OvarDQB2like* ( $n = 4$ ) и *Ovar-DQA2like* ( $n = 3$ ). Класс OLA-III занимает область между OLA-I и

**Список сокращений:** *DRB1* (DR B1 chain) – ген, кодирующий β-цепь антигенпрезентирующей молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II; IPD (Immuno Polymorphism Database) – база данных иммунополиморфизмов; МНС (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости; OLA (Ovine leukocyte antigen) – лейкоцитарный антиген овец.

**Таблица 1.** Праймеры, выбранные для ПЦР-анализа экзона-2 гена *DRB1* у овец  
**Table 1.** Primers selected for PCR analysis of *DRB1* exon 2 in sheep

Праймер		$T_m^a, ^\circ\text{C}$	Источник
название	последовательность, 5' → 3'		
330_F	ATTAGCCTCYCCCCAGGAGKC	59	[22]
329_R	CACCCCCGCGCTCACCTCGCCGC	74	[22]
445_F	TATCCCGTCTCTGCAGCACATTTTC	61	[22]
DRB1_E2_rev	GCTCACCTCGCCGCT	60	Эта работа <sup>b</sup>
OLA_DRB1(GC)	CCGGAATTC <del>CCCGTCTCTGCAGCACATTTCTT</del>	63	[5]
HL031	TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT	68	[5]
OLA_XRB1	AGCTCGAGCGCTGCACAGTGAACCTC	51	[5]
KP_fw	TATCCCGTCTCTGCAGCACATTTTC	61	[24]
KP_rev	TCGCCGCTGCACACTGAACTCTC	65	[24]

*Примечание:* <sup>a</sup> Температура плавления; <sup>b</sup> это укороченный по 3'-концу праймер HL031 (подчеркиванием выделена область, вошедшая в DRB1\_E2\_rev).

*Note:* <sup>a</sup> Melting temperature; <sup>b</sup> this is a 3'-truncated HL031 primer (the region included in DRB1\_E2\_rev is underlined).

OLA-II, где картированы гены, кодирующие некоторые компоненты системы комплемента (C4a и C4b, C2, фактор В), цитокины, 21-гидроксилазу и другие [10, 11]. Локусы OLA-II высокополиморфны и их рассматривают как основные генетические маркеры в исследованиях по генотипированию овец для определения их устойчивости/восприимчивости к инфекционным и паразитарным болезням [5, 12]. Локусы *DRB1* и *DQB1* OLA класса II обладают высоким полиморфизмом, который поддерживается предпочтительным отбором гетерозигот, что было показано ранее с использованием других типов (полиморфные системы белков, группы крови, микросателлиты) маркирующих систем [13–16]. Разнообразие, обусловленное аллелями в локусе *DRB1*, предполагает корреляцию между структурами генов OLA и устойчивостью животного к паразитарным или инфекционным болезням. Такая связь впервые была показана на цыплятах, у которых гаплотип В21 (МНС класса IВ) обеспечивает самую высокую устойчивость к заражению герпесвирусом, вызывающим болезнь Марекка [17, 18]. Не менее известна роль куриного МНС класса I в обеспечении устойчивости к вирусу саркомы Рауса [19, 20]. Полиморфизм гена *Ovar-DRB1* играет важную роль в устойчивости к нематодной инфекции у овец пород суффолкская и тексель [10, 21].

Целью проведенного исследования была разработка метода генетического анализа аллелей в локусе *DRB1* OLA у овец романовской породы.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Материал исследования

Образцы цельной крови брали у овец двух популяций романовской породы. Исследовали 59 различ-

ных половозрастных особей из ООО “АГИС СХ” (популяция № 1) и 30 овцематок из ООО “Романовское” (популяция № 2) в Ярославской области. Кровь у животных брали из яремной вены в пробирки с 0.05%-ным раствором ЭДТА. Образцы хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

### Выделение ДНК

ДНК из цельной крови овец выделяли сорбентным методом с использованием набора реагентов EX-516 (“СИНТОЛ”, Россия) по инструкции производителя.

### Дизайн праймеров

Согласно базе данных иммунополиморфизма главного комплекса гистосовместимости (IPD-МНС; <https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>), на данный момент у овец идентифицировано более 150 различных аллелей гена *DRB1*. Из них 130 аллелей подробно описаны, изучена их нуклеотидная последовательность. Нами проведен поиск и отбор нескольких пар локуспецифичных праймеров, позволяющих получить полную последовательность экзона-2 гена *DRB1* у овец романовской породы [5, 22–24]. При этом мы учитывали, что на 3'-конце прямого праймера могут встречаться вариативные области аллеля. В связи с этим в одной из пар был использован укороченный вариант праймера HL031 (*DRB1\_E2\_rev*). Эта модификация применена для сохранения вариативных регионов аллелей. Тщательный отбор праймеров проведен с целью дальнейшего их использования в разрабатываемых протоколах ПЦР для анализа экзона-2 гена *DRB1* у овец (табл. 1).

### *ПЦР-анализ экзона-2 гена DRB1*

ПЦР проводили на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) с использованием набора для проведения ПЦР с HS-Taq (+MgCl<sub>2</sub>) (KH016-500; “Биолабмикс”, Россия). В ходе оптимизации был проведен ряд ПЦР для каждой группы праймеров.

Пары 330\_F, 329\_R, 445\_F и DRB1\_E2\_rev использовали в реакциях со следующим режимом: 1) денатурация при 95°C в течение 5 мин; 2) 30 циклов по 30 с при 95°C, 30 с при 58°C, 30 с при 72°C; 3) финальная элонгация при 72°C в течение 10 мин.

ПЦР с праймерами OLA\_DRB1(GC), HL031 и OLA\_XRB1 проводили в два этапа. На первом этапе в 20 мкл реакционной смеси использовали пару OLA\_DRB1(GC) и HL031 в следующем режиме: 1) денатурация при 95°C в течение 5 мин; 2) 15 циклов по 30 с при 95°C, 30 с при 50°C, 60 с при 72°C; 3) финальная элонгация при 72°C в течение 10 мин. Далее 3 мкл полученной на первом этапе реакционной смеси вводили во второй этап ПЦР (конечный объем 50 мкл) с праймерами OLA\_DRB1(GC) и OLA\_XRB1 в следующем режиме: 1) 30 циклов по 30 с при 95°C, 30 с при 63°C, 60 с при 72°C; 2) финальная элонгация при 72°C в течение 10 мин.

ПЦР с парой праймеров KP-fw и KP-rev проводили в следующем режиме: 1) денатурация при 95°C в течение 5 мин; 2) 40 циклов по 60 с при 95°C, 45 с при 59.5°C, 60 с при 72°C; 3) финальная элонгация при 72°C в течение 10 мин.

### *Ферментативный гидролиз*

В качестве ферментов рестрикции применяли изоизомеры рестриктаз фирмы “SibEnzyme” (Россия): *Sfr3031*, *Bst2UI*, *BstACI*, *EcoICRI*, *BsuRI*. Реакцию проводили в объеме 20 мкл с 9 мкл ПЦР-смеси и 5 U фермента в условиях, рекомендованных производителем.

### *Электрофорез ДНК-гидролизатов*

Вертикальный электрофорез ферментативных гидролизатов ДНК проводили в 10%-ном ПААГ в буфере ТВЕ (“Евроген”, Россия). Горизонтальный электрофорез проводили в 1.5%-ном агарозном (Suzhou Yaso Science, Китай) геле в ТВЕ-буфере. К 20 мкл реакционной смеси добавляли 4 мкл 6× буфера для нанесения ДНК-образцов на гель и 0.25 мкл 100× Sybr Gold (Thermo Fisher Scientific, США). Электрофорез проводили в течение 60 мин при 120 В. Для детекции использовали трансиллюминатор ЕСХ-F15.М (Vilber Lourmat, Франция) при длине волны 495 нм.

### *Виртуальное рестрикционное картирование*

Для предварительной оценки распределения аллелей в *DRB1* локусе было проведено их виртуальное картирование рестриктазами *SacI*, *SacII*, *MvaI*, *HinII* и *HaeIII*. Нуклеотидные последовательности каждого экзона-2 каждого известного аллеля загружали в онлайн ресурс Restriction Analyzer (<https://molbiotools.com/>). Далее выбирали список используемых ферментов. В результате работы программа предоставляет данные о том, какой длины фрагменты будут получены в результате обработки загруженной нуклеотидной последовательности каждым отдельным ферментом.

### *Рестрикционное картирование*

После электрофореза в полиакриламидном геле и детекции результатов проводили оценку длин фрагментов ДНК, образовавшихся в результате реакции гидролиза. На основании числа и длин фрагментов проводили анализ схожести различных образцов и делали выводы об их аллельном составе, опираясь на результаты предварительного виртуального картирования.

### *Секвенирование и анализ амплифицированных фрагментов гена DRB1*

Секвенирование фрагментов, полученных в ходе ПЦР, проведено в ЗАО “Евроген” на генетическом анализаторе 3500 xL Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific).

Анализ последовательностей проводили с использованием компьютерной программы SnapGene© (<https://www.snapgene.com/>).

### *Построение филогенетического дерева*

Для выравнивания нуклеотидных последовательностей и построения филогенетического дерева использовали онлайн ресурс Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>; Kyoto University Bioinformatics Center, Япония).

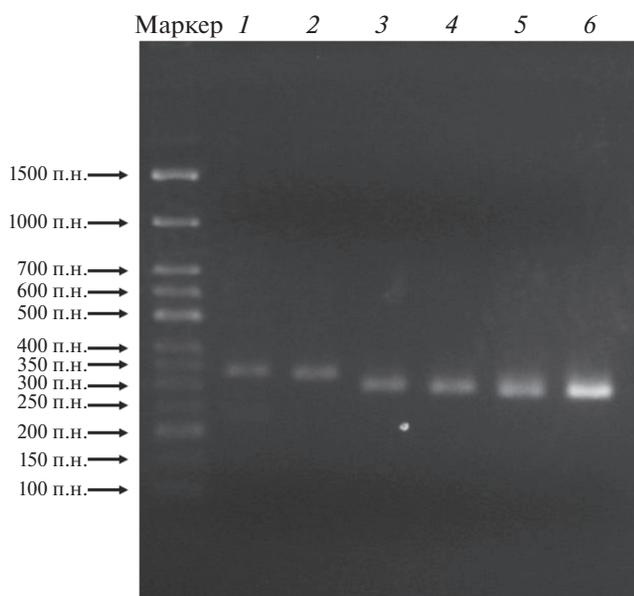
### *Обработка данных*

Полученные данные обрабатывали с использованием программы MS Excel 2023.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Предварительное типирование ДНК-последовательностей известных аллелей, полученных при обработке рестриктазами*

На момент начала работы в базе данных IPD-MHC содержалась информация о 130 аллелях гена *DRB1* с описанием их нуклеотидной по-



**Рис. 1.** Электрофоретический анализ продуктов ПЦР-амплификации ДНК овец. На дорожки нанесены ПЦР-продукты, полученные с праймерами 330\_F и 329\_R (1), 330\_F и DRB1\_E2\_rev (2), 445\_F и 329\_R (3), 445\_F и DRB1\_E2\_rev (4), OLA\_DRB1(GC), OLA\_XRB1 и HL031 (5), KP\_fw и KP\_rev (6). В качестве маркера длин ДНК использовали Step50 plus (“Биолабмикс”, Россия).

**Fig. 1.** Electrophoretic analysis of PCR amplification of sheep DNA. The lanes contain PCR products obtained with primers 330\_F and 329\_R (1), 330\_F and DRB1\_E2\_rev (2), 445\_F and 329\_R (3), 445\_F and DRB1\_E2\_rev (4), OLA\_DRB1(GC), OLA\_XRB1 and HL031 (5), KP\_fw and KP\_rev (6). Step50 plus (“Biolabmix”, Russia) was used as a DNA length marker.

следовательности. Раньше для проведения статистических исследований, связанных с определенными аллелями, использовали распределение вариантов *DRB1* по группам согласно наличию или отсутствию специфичных сайтов рестрикции [5, 25]. Данный метод анализа позволяет примерно определить схожесть нуклеотидных последовательностей без применения секвенирования. Принцип действия заключается в обработке нуклеотидной последовательности одним или несколькими ферментами рестрикции. В результате реакции гидролиза рассматриваемая цепь ДНК распадается (или не распадается в случае отсутствия сайта распознавания рестриктазы) на фрагменты различной длины. Далее проводят электрофоретический анализ длин образовавшихся фрагментов. Нуклеотидные последовательности со сходными паттернами гидролиза распределяют в группы. Чем больше ферментов используют параллельно, тем более качественно удастся сгруппировать исследуемые образцы. Принадлежность к одной группе позволяет предполагать, что рассматриваемые варианты нуклеотидных последовательностей обладают схожей структу-

рой – как минимум в участках, где есть сайт рестрикции.

Чаще всего рассматривали следующие рестриктазы: *SacI*, *SacII*, *MvaI*, *HinII* и *HaeIII*. С целью понять, насколько точно можно идентифицировать аллели, присутствующие в геноме конкретного рассматриваемого животного, при помощи отобранного набора ферментов, мы провели предварительное виртуальное рестрикционное картирование всех доступных последовательностей.

В связи с этим на предварительном этапе исследования мы выбрали референсную последовательность гена *DRB1* овец (Gene ID: 101119342) и провели виртуальную ПЦР с использованием праймеров 330\_F и DRB1\_E2\_rev. Эта пара праймеров была выбрана в качестве целевой, так как их комбинация позволяет охватить наиболее длинную последовательность (331 п.н) участка гена. Кроме того, ее использование в ПЦР позволяет избежать различий в вариативных участках по концам экзона-2 гена *DRB1*. Продукты амплификации анализировали электрофорезом в 1.5%-ном агарозном геле (рис. 1).

После этого провели выравнивание всех 130 описанных аллелей в локусе *DRB1* с полученным фрагментом экзона-2. На основании выравнивания для каждого аллеля составили нуклеотидные последовательности одинаковой длины с последовательностями используемых праймеров по краям. Полученные варианты последовательностей подвергли виртуальному параллельному гидролизу рестриктазами *SacI*, *SacII*, *MvaI*, *HinII* и *HaeIII*. Выявлено, что из ПЦР-ампликона (общая длина – 331 п.н.), обработанного различными рестриктазами, могут быть получены следующие фрагменты: 331 и 242/89 п.н. для *SacI*, 331 и 263/68 п.н. для *SacII*, 123/107/87/14, 180/87/50/14 и 123/87/57/50/14 п.н. для *MvaI*, 331 и 212/119 *HinII*, 193/124/14, 193/138, 193/72/52/14, 259/72, 193/72/66, 207/124, 207/72/48 и 207/72/52 п.н. для *HaeIII*.

Для каждого известного аллеля была составлена индивидуальная рестрикционная карта. Аллели, которые образовывали одинаковые рестрикционные карты по всем 5 используемым ферментам, объединяли в общую группу. По результатам обработки всех 130 нуклеотидных последовательностей было сформировано 20 возможных вариантов рестрикционной карты. Таким образом, удалось распределить все выявленные последовательности аллелей гена *DRB1* в 20 групп гидролитического паттерна (табл. 2) по карте гидролиза ампликона экзона-2. Полное распределение групп представлено в табл. S1 Дополнительных материалов.

#### Рестрикционное картирование выборок

Для исследования генетического разнообразия овец романовской породы было проанализи-

**Таблица 2.** Группы гидролитического паттерна, составленные на основе возможных комбинаций вариантов гидролиза (рестрикционных карт) рассматриваемого ампликона  
**Table 2.** Hydrolytic pattern groups compiled on the basis of possible combinations of hydrolysis variants (restriction maps) of the amplicon under consideration

Группа ГП*	Длина рестрикционных фрагментов, п.н.				
	<i>SacII/Sfr303I</i>	<i>MvaI/Bst2UI</i>	<i>HinII/BstACI</i>	<i>SacI/EcoICRI</i>	<i>HaeIII/BsuRI</i>
1	331	123/107/87/14	331	331	193/124/14
2	263/68	123/107/87/14	331	331	193/124/14
3	263/68	180/87/50/14	331	331	193/124/14
4	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/14
5	263/68	123/107/87/14	212/119	331	193/124/14
6	331	123/107/87/14	212/119	242/89	193/124/14
7	263/68	180/87/50/14	212/119	331	193/124/14
8	331	123/107/87/14	331	331	193/138
9	331	123/107/87/14	331	242/89	193/138
10	263/68	180/87/50/14	331	331	193/138
11	331	123/107/87/14	331	331	193/72/52/14
12	331	123/107/87/14	212/119	331	193/72/52/14
13	331	180/87/50/14	212/119	331	259/72
14	331	123/107/87/14	212/119	242/89	193/72/52/14
15	331	123/107/87/14	331	331	193/72/66
16	331	123/107/87/14	331	242/89	193/72/66
17	331	123/107/87/14	212/119	331	193/72/66
18	263/68	123/87/57/50/14	331	331	207/124
19	331	123/87/57/50/14	331	331	207/72/48
20	331	123/87/57/50/14	331	331	207/72/52

\* *Примечание:* Группа гидролитического паттерна.

\* *Note:* Group of hydrolytic pattern.

**Таблица 3.** Условия гидролиза целевых ПЦР-продуктов рестриктазами  
**Table 3.** Conditions for hydrolysis of target PCR products by restriction enzymes

Фермент	Буфер	Условия реакции			
		гидролиз		инактивация	
		<i>T</i> , °C	время, мин	<i>T</i> , °C	время, мин
<i>Sfr303I</i>	B	37	90	65	20
<i>Bst2UI</i>	G + BSA (0.1 мг/мл)	37	90	80	20
<i>BstACI</i>	W	37	90	80	20
<i>EcoICRI</i>	G + BSA (0.1 мг/мл)	37	90	65	20
<i>BsuRI</i>	G	37	90	80	20

ровано две их популяции. Из цельной крови, полученной от животных, выделяли суммарную геномную ДНК, после чего проводили амплификацию экзона-2 гена *DRB1* с использованием праймеров 330\_F и *DRB1\_E2\_rev*. ПЦР-смесь каждого образца делили на 5 частей – для параллельного гидролиза ферментами рестрикции. Для каждого фермента использовали условия, рекомендованные производителем (табл. 3).

Полученные продукты разделяли электрофорезом в 10%-ном ПААГ, детектировали с использованием ДНК-красителя Sybr Gold (Thermo Fisher Scientific). По результатам электрофореза в ПААГ каждый образец оценивали по пяти вариантам гидролиза с каждым ферментом (по длинам фрагментов, полученных после гидролиза ампликона). На основании полученных рестрикционных карт каждый образец относили к одной из групп

гидролитического паттерна, приведенных в табл. 2, или к их комбинации. В результате гидролиза образца, содержащего аллели из разных групп гидролитического паттерна, одновременно формируются карты, соответствующие обеим группам. Таким образом, происходит наложение гидролитических карт друг на друга. Полученные рестрикционные карты, а также групповая принадлежность для каждого исследуемого образца представлены в табл. 4. Кроме того, для подтверждения эффективности рассматриваемой системы было проведено секвенирование всех образцов для точного определения конкретных аллелей в каждом из них, а также для проверки достоверности оценки групповой принадлежности по рестрикционной карте.

#### *Идентификация конкретных аллелей по результатам секвенирования*

Полученные в ходе работы ПЦП-фрагменты секвенировали с праймером 330\_F для точного определения аллелей, представленных в рассматриваемых выборках, и оценки гетерогенности *DRB1* локуса в двух популяциях овец романовской породы. Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей проводили против ранее определенных групп. В случае секвенирования гетерозигот в некоторых участках на хроматограмме детектировали появление двух сигналов разных нуклеотидов одновременно. В связи с этим аллели подбирали таким образом, чтобы в местах двоения сигнала комбинация вариативных участков разных аллелей образовывала картину, соответствующую данным хроматограммы. Аллели 09:01 и 09:02 невозможно различить в рамках экзона-2 *DRB1* локуса, так как их отличия локализованы в первом экзоне. В общей сложности в *DRB1* локусе было идентифицировано 19 аллелей у овец в популяции № 1 и 17 в популяции № 2. В то же время аллелофонд в *DRB1* гене обеих популяций был представлен 25 разными аллелями. Совпадение между двумя выборками составило 44%, то есть было выявлено 11 идентичных аллелей (табл. 5).

На основании множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей обнаруженных аллелей построили филогенетическое дерево с использованием онлайн ресурса Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) и оценили удаленность идентифицированных аллелей друг от друга (рис. 2).

Цифры в основании узлов и в круглых скобках рядом с наименованием аллеля указывают так называемую длину ветвей, а конкретнее, число нуклеотидных замен, произошедшее в среднем между двумя узлами (при 1 замене на 10 нуклеотидов это 0.1, на 100 нуклеотидов — 0.01 и т.д.). Числа в квадратных скобках в основании узла указаны в процентах и могут варьировать от 1 до 100%. Это мера поддержки узла, или значение бутстрэп-

анализа. Это число указывает степень вероятности того, что в данном месте происходит разделение ветвей именно указанными группами, и чем больше число, тем выше достоверность и вероятность произошедшего разделения.

В ходе построения филогенетического дерева последовательности соотносят в различных комбинациях — для определения наиболее достоверных данных распределения. Чем чаще пара последовательностей попадает в один узел, тем более вероятно их близкое разделение в процессе изменения нуклеотидной последовательности. Например, аллели 09:01 и 09:02 отличаются друг от друга на один нуклеотид. Таким образом, наблюдается очень низкое число замен ( $5 \times 10^{-9}$ ) и высокий балл бутстрэп-анализа, равный 100%. Таким образом, чем дальше друг от друга находятся узлы, разделяющие аллели между собой, тем раньше во времени произошла нуклеотидная замена, определяющая их отличие. В таком случае большое число узлов, отделяющих аллель 01:01 от 04:02, показывает их большую генетическую отдаленность друг от друга.

#### *Преимущества и ограничения метода рестрикционного картирования*

В ходе проведенной работы нам удалось подобрать оптимальную пару праймеров, использование которой позволило впервые получить ампликоны экзона-2 гена *DRB1* овец романовской породы. При введении в ПЦП комбинации праймеров мы получили последовательность, полностью захватывающую исследуемый фрагмент ДНК и все вариативные сайты, содержащиеся в экзоне-2. Кроме того, по краям ПЦП-фрагмента формировались участки, длина которых была достаточна для использования праймеров на интронных фрагментах — для более точных результатов секвенирования.

Нами разработан метод дифференцировки аллелей гена *DRB1* по группам гидролитического паттерна с использованием 5 ферментов рестрикции и продемонстрирована его эффективность. Заметим, что ранее аналогичный метод генотипирования по *DRB1* при помощи рестрикционного картирования со схожим набором ферментов был использован для поиска возможных корреляций между гаплотипами по *DRB1* и резистентностью к паразитозам и нематодозам [4, 5]. Авторы пришли к выводу, что гаплотипы *MvaI*(210/123/87/86)-*SacII*(296/229/69)-*HinII*(296/178/118) [5] и *SacI*(296/208/88) *MvaI*(123/87/86) [4] могут быть связаны с устойчивостью животных к кишечным паразитозам. Но в связи с отсутствием на тот момент информации о точном числе возможных аллельных вариаций и их нуклеотидных последовательностях такое типирование не позволило точно идентифицировать конкретные аллели, определяющие резистентность, хотя возможность сузить допустимые варианты до конкретных групп была.

Таблица 4. Рестрикционный анализ ампликонов экзона-2 гена *DRB1* у овец романовской породы  
 Table 4. Restriction analysis of amplicons of *DRB1* gene exon-2 in Romanov sheep

Образец <sup>a</sup>	Длина рестрикционных фрагментов, п.н.						Группа ГП <sup>b</sup>	Аллели <sup>c</sup>
	<i>SacII</i>	<i>MvaI</i>	<i>HinII</i>	<i>SacI</i>	<i>HaeIII</i>			
1.01	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	03:01, 20:04	
1.02	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	03:01, 20:01	
1.03	331	180/123/107/87/50/14	331/212/119	331	259/193/124/72	15, 13	26:01, 04:02	
1.04	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/14	4	10:05, 03:01	
1.05	331	123/107/87/14	212/119	331/242/89	193/124/72/52/14	4, 14	10:09, 16:13	
1.06	331	123/107/87/14	212/119	331	193/72/52/14	12	20:01, 20:04	
1.07	331	123/107/87/14	331/212/119	331/242/89	193/72/66/52/14	12, 16	20:02, 06:02	
1.08	331	123/107/87/14	331	331/242/89	193/72/66	15, 16	04:02, 06:02	
1.09	331	123/107/87/14	331	331/242/89	193/72/66	15, 16	06:02, 04:06	
1.10	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/1124/72/66	4, 15	03:01, 04:02	
1.11	331	123/107/87/14	212/119	331/242/89	193/124/72/52/14	4, 14	16:13, 03:01	
1.12	331	123/87/57/50/14	331	331	207/72/52/48	19, 20	09:01(09:02), 29:01	
1.13	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/66/52/14	12, 15	20:01, 04:02	
1.14	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/66/52/14	12, 15	04:02, 20:01	
1.15	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	03:01, 20:01	
1.16	331	180/123/107/87/50/14	212/119	331	259/193/124/72/52/14	4, 13	20:01, 10:09	
1.17	331	123/107/87/14	212/119	331	193/72/52/14	12	20:01, 20:02	
1.18	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/14	4	03:01, 10:05	
1.19	331	180/123/107/87/50/14	331/212/119	331	259/193/72/66	15, 13	26:01, 04:02	
1.20	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/14	4	03:01, 03:02	
1.21	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/14	4	03:01, 10:09	
1.22	331/263/68	180/123/107/87/50/14	331/212/119	331	193/124/72/66	7, 15	07:01, 04:02	
1.23	331	123/107/87/14	212/119	331/242/89	193/72/52/14	12, 14	16:13, 20:04	
1.24	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/72/66/52/14	12, 15	04:02, 20:04	
1.25	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	03:01, 20:01	
1.26	331	123/107/87/14	331/212/119	331/242/89	193/72/66/52/14	12, 16	20:01, 06:02	
1.27	331	123/87/57/50/14	331	331	207/72/52/48	19, 20	09:01(09:02), 29:01	
1.28	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/66/14	4, 15	03:02, 04:02	
1.29	331	123/107/87/14	331/212/119	331/242/89	193/124/72/66	4, 16	06:02, 17:04	
1.30	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/66/14	4, 15	03:01, 03:10	
1.31	331	123/107/87/14	212/119	331	193/72/52/14	12	20:02, 20:01	

Таблица 4. Продолжение

Образец <sup>a</sup>	Длина рестрикционных фрагментов, п.н.						Группа ГП <sup>b</sup>	Алтели <sup>c</sup>
	<i>Sac</i> II	<i>Mva</i> I	<i>Hin</i> II	<i>Sac</i> I	<i>Hae</i> III			
1.32	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	03:02, 20:04	
1.33	331	123/107/87/14	331/212/119	331/242/89	193/72/66/52/14	12, 16	03:10, 06:02	
1.34	331	123/107/87/14	212/119	331	193/72/52/14	12	20:01, 20:02	
1.35	331	123/107/87/14	331/212/119	331/242/89	193/72/66/52/14	12, 16	06:02, 20:01	
1.36	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	10:05, 20:01	
1.37	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	10:05, 20:02	
1.38	331/263/68	123/87/57/50/14	212/119	331	193/124/72/52/14	7, 12	07:01, 11:02	
1.39	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/66/14	4, 15	03:01, 04:02	
1.40	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	10:05, 20:02	
1.41	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	20:02, 10:09	
1.42	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/66/14	4, 15	10:09, 04:06	
1.43	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	03:01, 20:02	
1.44	331	123/107/87/14	331/212/119	331/242/89	193/72/66/52/14	12, 16	20:01, 06:02	
1.45	331	123/107/87/14	212/119	331/242/89	193/72/52/14	12, 14	20:01, 16:13	
1.46	331	123/107/87/57/50/14	331/212/119	331/242/89	207/193/72/52/48/14	14, 19	09:01(09:02), 16:13	
1.47	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	03:01, 11:02	
1.48	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/66/52/14	12, 15	20:01, 04:02	
1.49	331	180/123/107/87/50/14	331/212/119	331	259/193/72/66	15, 13	04:02, 26:01	
1.50	331	123/107/87/14	212/119	331/242/89	193/124/72/52/14	4, 14	16:13, 10:05	
1.51	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/66/14	4, 15	03:01, 04:02	
1.52	331	123/107/87/14	331/212/119	331/242/89	193/124/72/66	4, 16	06:02, 17:04	
1.53	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	10:05, 11:02	
1.54	331	123/107/87/14	331/212/119	242/89	193/72/66/52/14	14, 16	06:02, 16:13	
1.55	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/72/66/52/14	12, 15	04:02, 20:04	
1.56	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/66/52/14	12, 15	20:01, 04:02	
1.57	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	10:09, 20:02	
1.58	331	123/107/87/57/50/14	331/212/119	331	207/193/72/52/48/14	12, 19	20:01, 09:01(09:02)	
1.59	331/263/68	180/123/107/87/50/14	331/212/119	331	193/124/72/66	7, 15	07:01, 04:02	
2.01	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	20:02, 03:02	
2.02	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/72/66/52/14	12, 15	04:02, 02:01	
2.03	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14	4, 12	03:01, 20:01	

Таблица 4. Окончание

Образец <sup>a</sup>	Длина рестрикционных фрагментов, п.н.							Группа ГП <sup>b</sup>	Аллели <sup>c</sup>
	<i>SacII</i>	<i>MvaI</i>	<i>HinI</i>	<i>SacI</i>	<i>HaeIII</i>				
2.04	331/263/68	123/107/87/14	331/212/119	331/242/89	193/124/72/52/14			2, 14	12:03, 16:13
2.05	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/52/14			1, 12	12:02, 20:02
2.06	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/72/66/52/14			12, 15	20:01, 03:08
2.07	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/72/52/14			4, 12	03:01, 20:01
2.08	331/263/68	123/107/87/14	331	331	193/124/72/66			2, 15	12:03, 04:02
2.09	331/263/68	123/107/87/14	212/119	331	193/124/14			7, 4	07:01, 03:01
2.10	331	123/107/87/14	331/212/119	331/242/89	193/72/66/52/14			12, 16	06:02, 01:01
2.11	331	123/107/87/14	212/119	331	193/124/14			4	03:01, 03:01
2.12	331	123/107/87/14	331	331	193/124/72/66/14			15	04:02, 12:06
2.13	331	123/107/87/14	331	331	193/124/72/66/14			15	04:02, 12:06
2.14	331	123/107/87/14	331	331	193/124/72/66/14			15	03:08, 12:06
2.15	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/72/66/52/14			12, 15	20:01, 04:02
2.16	331	123/107/87/14	331/212/119	331/242/89	193/72/66/52/14			12, 16	06:02, 02:01
2.17	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/72/66/52/14			12, 15	20:01, 04:02
2.18	331/263/68	180/123/107/87/50/14	212/119	331	193/124/72/52/14			7, 12	07:01, 20:01
2.19	331/263/68	123/107/87/14	331	331	193/124/72/66			2, 15	12:03, 03:08
2.20	331	123/107/87/14	331	331/242/89	193/72/66			15, 16	03:08, 06:02
2.21	331	123/107/87/14	331	331	193/124/72/66/14			15	04:02, 12:06
2.22	331	123/107/87/57/50/14	331	331	207/193/72/52			15, 19	09:01(09:02), 03:08
2.23	331	123/107/87/14	331/212/119	331/242/89	193/124/72/66/14			4, 16	03:01, 06:02
2.24	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/72/66/52/14			12, 15	20:01, 04:02
2.25	331	123/107/87/14	331	242/89	193/72/66			16	06:02, 06:02
2.26	331	123/107/87/14	212/119	331	193/72/52/14			12	20:01, 20:01
2.27	331	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/52/14			1, 12	20:02, 12:02
2.28	331/263/68	123/107/87/14	331/212/119	331	193/124/72/52/14			2, 12	12:03, 20:01
2.29	331	123/107/87/14	331	331/242/89	193/72/66			15, 16	03:10, 06:02
2.30	331	123/107/87/14	212/119	331/242/89	193/72/52/14			12, 14	20:01, 16:13

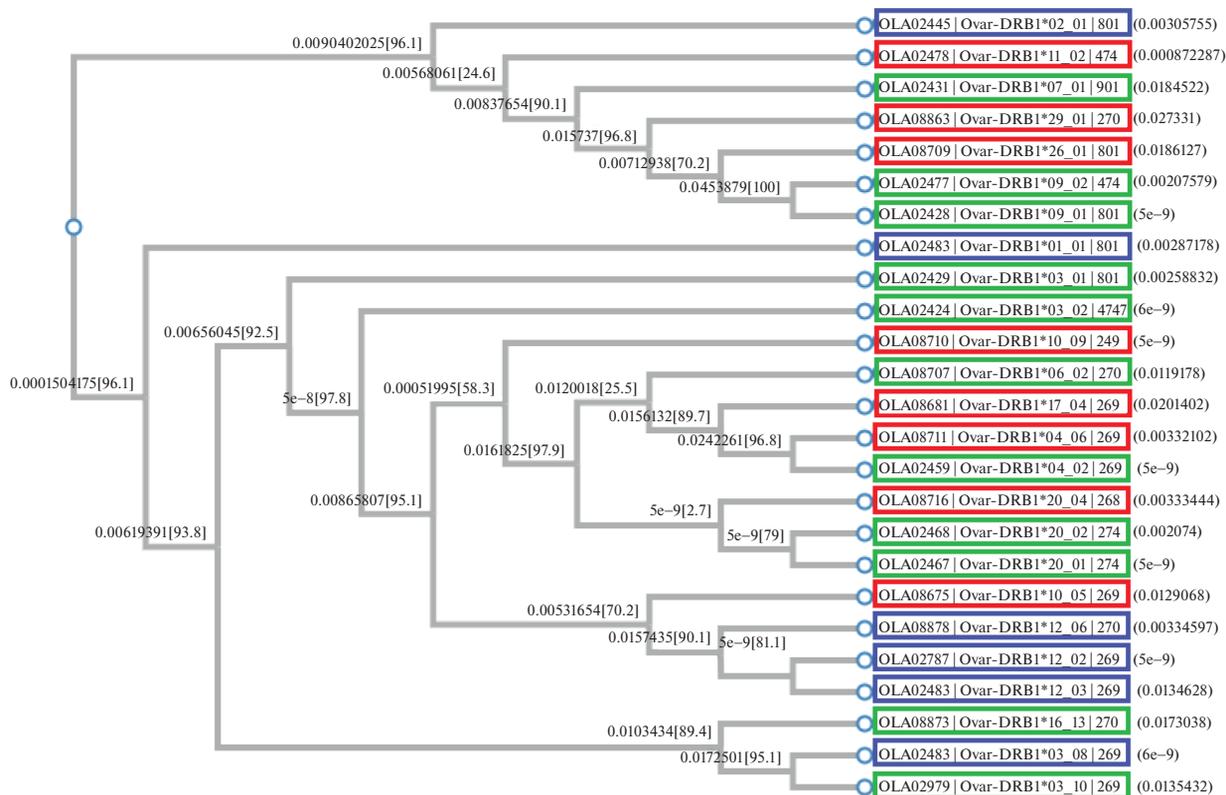
Примечание: <sup>a</sup> Образцы ДНК, полученные от овец популяции № 1, пронумерованы 1.01–1.59, от популяции № 2 – 2.01–2.30. <sup>b</sup> Указаны группы, к которым относится аллель по паттерну гидролиза (см. табл. 2). <sup>c</sup> Представлены кодировки конкретных аллелей, которые были подтверждены секвенированием.  
 Note: <sup>a</sup> DNA samples obtained from sheep of population # 1 have numbers 1.01–1.59, from population # 2 have 2.01–2.30. <sup>b</sup> The groups to which the allele belongs according to the hydrolysis pattern are indicated (see Table 2). <sup>c</sup> The coding of specific alleles that were confirmed by sequencing is presented.

**Таблица 5.** Аллели в локусе *DRB1*, обнаруженные в двух популяциях овец романовской породы  
**Table 5.** Alleles at the *DRB1* locus detected in two populations of Romanov sheep

Аллели в <i>DRB1</i> локусе*			
популяция № 1 (n = 59)	частота встречаемости	популяция № 2 (n = 30)	частота встречаемости
1. OLA02429 <i>Ovar-DRB1*03:01</i>	0.1271	1.OLA02429 <i>Ovar-DRB1*03:01</i>	0.1000
2. OLA02424 <i>Ovar-DRB1*03:02</i>	0.0254	2.OLA02424 <i>Ovar-DRB1*03:02</i>	0.0167
3. OLA02979 <i>Ovar-DRB1*03:10</i>	0.0169	3.OLA02979 <i>Ovar-DRB1*03:10</i>	0.0167
4. OLA02459 <i>Ovar-DRB1*04:02</i>	0.1356	4.OLA02459 <i>Ovar-DRB1*04:02</i>	0.1333
5. OLA08707 <i>Ovar-DRB1*06:02</i>	0.0847	5.OLA08707 <i>Ovar-DRB1*06:02</i>	0.1167
6. OLA02431 <i>Ovar-DRB1*07:01</i>	0.0254	6.OLA02431 <i>Ovar-DRB1*07:01</i>	0.0333
7. OLA02428 <i>Ovar-DRB1*09:01</i>	0.0339	7.OLA02428 <i>Ovar-DRB1*09:01</i>	0.0167
8. OLA02477 <i>Ovar-DRB1*09:02</i>	0.0339	8.OLA02477 <i>Ovar-DRB1*09:02</i>	0.0167
9. OLA08873 <i>Ovar-DRB1*16:13</i>	0.0593	9.OLA08873 <i>Ovar-DRB1*16:13</i>	0.0333
10. OLA02467 <i>Ovar-DRB1*20:01</i>	0.1525	10.OLA02467 <i>Ovar-DRB1*20:01</i>	0.1833
11. OLA02468 <i>Ovar-DRB1*20:02</i>	0.0763	11.OLA02468 <i>Ovar-DRB1*20:02</i>	0.0500
12. OLA08716 <i>Ovar-DRB1*20:04</i>	0.0508	12. OLA08878 <i>Ovar-DRB1*12:06</i>	0.0667
13. OLA08709 <i>Ovar-DRB1*26:01</i>	0.0254	13. OLA02483 <i>Ovar-DRB1*03:08</i>	0.0833
14. OLA08863 <i>Ovar-DRB1*29:01</i>	0.0169	14. OLA02787 <i>Ovar-DRB1*12:02</i>	0.0333
15. OLA08711 <i>Ovar-DRB1*04:06</i>	0.0169	15. OLA02445 <i>Ovar-DRB1*02:01</i>	0.0333
16. OLA08675 <i>Ovar-DRB1*10:05</i>	0.0593	16. OLA02426 <i>Ovar-DRB1*01:01</i>	0.0167
17. OLA08710 <i>Ovar-DRB1*10:09</i>	0.0508	17. OLA02788 <i>Ovar-DRB1*12:03</i>	0.0667
18. OLA02478 <i>Ovar-DRB1*11:02</i>	0.0254		
19. OLA08681 <i>Ovar-DRB1*17:04</i>	0.0169		

\* *Примечание:* Аллели 1–11 – общие для двух исследованных популяций овец выделены зеленым цветом

\* *Note:* Alleles 1–11 are common in the two sheep populations studied, and are highlighted in green.



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево обнаруженных аллелей гена *DRB1*. Цифры рядом с каждым узлом обозначают меру поддержки узла. Красным цветом выделены аллели, идентифицированные в популяции № 1, синим цветом – в популяции № 2, зеленым цветом – общие для обеих популяций аллели. Обозначения:  $5e-9 = 5 \times 10^{-9}$ ,  $6e-9 = 6 \times 10^{-9}$ .

**Fig. 2.** Phylogenetic tree of the detected alleles of the *DRB1* gene. The numbers next to each node represent a measure of node support. Red indicates alleles identified for population #1, blue for population #2, and green indicates alleles common to both populations. Designations:  $5e-9 = 5 \times 10^{-9}$ ,  $6e-9 = 6 \times 10^{-9}$ .

К сожалению, при проведении ПЦР с праймерами, указанными в обеих статьях [4, 5], происходит уничтожение сайта рестрикции прямым праймером для фермента *MvaI*, который присутствует в некоторых вариантах аллелей, из-за чего пропадает возможность правильно дифференцировать часть групп. При проведении анализа результатов рассматриваемых статей с данными рестрикционного картирования всех известных последовательностей, полученных в ходе работы, мы обнаружили, что невозможно с точностью определить, какие именно генотипы могут отвечать за устойчивость животных к нематодозам из-за очень широкого спектра возможных аллелей и их комбинаций. Таким образом, разработанная нами методология рестрикционного картирования позволила расширить знания об аллельном составе *DRB1* гена у овец и в дальнейшем может быть использована как инструмент генотипирования, причем более точный, чем в рассмотренных выше работах.

Разработанный нами метод позволяет в большинстве случаев достаточно точно определить принадлежность исследуемого участка гена *DRB1* из образца особи к определенной группе или их комбинации. Но такой способ рестрикционного картирования требует определенной доработки,

так как в процессе идентификации групповой принадлежности возникает ряд ограничений. Во-первых, это очень близкое расположение фрагментов, которые незначительно отличаются по размеру, но эта разница является определяющей (фрагменты длиной 138/124 или 72/66 п.н.). Во-вторых, при использованном методе окрашивания визуально трудно определить наличие фрагментов размером 50 п.н. и меньше из-за низкой интенсивности люминесценции, что затрудняет проведение анализа. В-третьих, использование описанного набора ферментов рестрикции позволяет выделить лишь 20 групп гидролитического паттерна, что при общем размере базы данных в 130 идентифицированных последовательностей не дает точной информации о конкретных аллелях, содержащихся в популяции. Необходимо провести оптимизацию и поиск дополнительных рестрикционных сайтов, которые позволят точнее определять групповую принадлежность, исключив стадию секвенирования.

Следует отметить еще очень важный момент. Дело в том, что исследованная нами романовская порода овец относится к закрытой и многоплодной, что может влиять на сужение ее аллелотипа из-за стихийного инбридинга. Косвенно это подтверждается и общим уровнем геномной гетеро-

генности у двух популяций овец. Так, нами показано, что 44% идентифицированных аллелей экзона-2 гена *DRB1* совпадают в двух разных популяциях романовских овец. Как видно из построенного филогенетического дерева (рис. 2), между двумя выборками нет широкого эволюционного разброса. Обнаруженные аллели либо совпадают между группами, либо очень близко расположены на ветвях с уровнями поддержки узлов, близкими к единице, а также низким уровнем нуклеотидных замен в последовательностях. Исключениями можно считать аллели 02:01, 11:02, 01:01 и группу из вариантов 12:06, 12:02 и 12:03. Возможно, что можно найти больше отличий, но для этого необходимо проведение аттестации широкой выборки овец романовской породы из различных регионов.

В проведенном исследовании представлена и оптимизирована методика генотипирования экзона-2 гена *DRB1* у овец романовской породы с использованием специфичных праймеров и ферментов рестрикции. Продемонстрировано, что использование разработанного алгоритма построения рестрикционных карт позволяет точно идентифицировать аллельный состав исследуемого региона в популяции и влияние конкретных нуклеотидных замен на сайты рестрикции в известных последовательностях аллелей. Однако методика требует дальнейшей доработки из-за ряда технических ограничений, таких как сложность визуализации малых фрагментов ДНК и недостаточная точность при дифференцировании некоторых комбинаций групп. Для улучшения точности генотипирования необходимо искать дополнительные рестрикционные сайты и их комбинации и расширять выборку для более глубокого анализа аллельного разнообразия.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала: <https://sciencejournals.ru/journal/biotech/>.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00197 (<https://rscf.ru/project/24-26-00197/>).

#### ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Настоящая статья не содержит исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов. Образцы крови были взяты в период плановых ветеринарных мероприятий на ООО «АТИС СХ» и ООО «Романовское».

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dukkipati V.S.R., Blair H.T., Garrick D.J., Murray A.* 'Ovar-Mhc' – ovine major histocompatibility complex: structure and gene polymorphisms. *Genet. Mol. Res.*, 2006, 5(4), 581–608.
2. *Klein J.* *Natural History of the Major Histocompatibility Complex.* N.Y.: John Wiley&Sons, 1986, 775 p.
3. *Amills M., Ramiya V., Norimine J., Lewin H.A.* The major histocompatibility complex of ruminants. *Rev. Sci. Tech.*, 1998, 17(1), 108–120. <https://doi.org/10.20506/rst.17.1.1092>
4. *Li R., Jia B., Zhang W., Zhao Z.-S., Shi G.-Q., Shen H., Peng Q., Lv L.-M., Zhou Q.-W., Du Y.-C.* Analysis of the relationship between MHC-*DRB1* gene polymorphism and hydatidosis in Kazakh sheep. *Anim. Biosci.*, 2010, 23(9), 1145–1151. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.90480>
5. *Shen H., Han G., Jia B., Jiang S., Du Y.* MHC-*DRB1/DQB1* gene polymorphism and its association with resistance/susceptibility to cystic echinococcosis in Chinese Merino sheep. *J. Parasitol. Res.*, 2014, 272601. <https://doi.org/10.1155/2014/272601>
6. *Stear A., Ali A.O.A., Brujeni G.N., Buitkamp J., Donskow-Lysoniewska K., Fairlie-Clarke K., Groth D., Isa N.M.M., Stear M.J.* Identification of the amino acids in the major histocompatibility complex class II region of Scottish Blackface sheep that are associated with resistance to nematode infection. *Int. J. Parasitol.*, 2019, 49(10), 797–804. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.05.003>
7. *Silwamba I., Vasoya D., Simuunza M., Tzelos T., Nalubamba K.S., Simulundu E., Vrettou Ch., Mainda G., Watson M., Muma B.J., Conneley T.* High throughput analysis of MHC class I and class II diversity of Zambian indigenous cattle populations. *HLA*, 2023, 101(5), 458–483. <https://doi.org/10.1111/tan.14976>
8. *Salim B., Nakao R., Chatanga E., Marcuzzi O., Eissawi M.A., Almathen F., Hanotte O., Giovambattista G.* Exploring genetic diversity and variation of *Ovar-DRB1* gene in Sudan Desert sheep using targeted next-generation sequencing. *BMC Genomics*, 2024, 25(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10053-3>
9. *Vasoya D., Connelley T., Tzelos T., Todd H., Ballingall K.T.* Large scale transcriptional analysis of MHC class I haplotype diversity in sheep. *HLA*, 2024, 103(2), e15356. <https://doi.org/10.1111/tan.15356>
10. *Sayers G., Good B., Hanrahan J.P., Ryan M., Angles J.M., Sweeney T.* Major histocompatibility complex *DRB1* gene: its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. *Parasitology*, 2005, 131(Pt. 3), 403–409. <https://doi.org/10.1017/s0031182005007778>
11. *Марзанова С.Н., Фатахов К.Ф., Девришов Д.А., Марзанов Н.С.* Связь локусов главного комплекса гистосовместимости у овец (OLA) с резистентностью и восприимчивостью их к паразитозам. *Ветеринария*, 2024, 7, 28–34. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2024.27.7.28-33>
12. *Larruskain A., Minguijón E., Garcia-Etxebarria K., Arostegui I., Moreno B., Juste R.A., Jugo B.M.* Amino acid signatures in the Ovar-DRB1 peptide-binding pockets are associated with ovine pulmonary adenocarcinoma susceptibility/resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, 428(4), 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.085>

13. Марзанов Н.С., Насибов М.Г., Марзанова Л.К., Озеров М.Ю., Кантанен Ю., Петров С.Н., Лобков В.Ю. Генетические маркеры в теории и практике разведения овец. Москва: ИЦ “Пионер”, 2010, 184 с.
14. Марзанов Н.С., Девришов Д.А. Марзанова С.Н., Корецкая Е.А., Озеров М.Ю. Оценка овец романовской породы по различным типам иммунологических и генетических маркеров. Москва: ООО “Академия-Принт”, 2022, 154 с.  
<https://doi.org/10.18720/SPBPU/2/z21-42>
15. Моисейкина Л.Г., Марзанов Н.С., Марзанова С.Н. Селекция овец с использованием генетических маркеров. Элиста: Калмыцкий государственный университет имени Б.Б. Городовикова, 2013, 100 с.
16. Marzanov N.S., Devrishov D.A., Ozerov M.Y., Maluchenko O.P., Marzanova S.N., Shukurova E.B., Koreckaya E.A., Kantanen J., Petit D. The significance of a multilocus analysis for assessing the biodiversity of the Romanov sheep breed in a comparative aspect. *Animals*, 2023, 13(8), 1320.  
<https://doi.org/10.3390/ani13081320>
17. Briles W.E., Stone H.A., Cole R.K. Marek’s disease: effects of B histocompatibility alloalleles in resistant and susceptible chicken lines. *Science*, 1977, 195, 193–195.  
<https://doi.org/10.1126/science.831269>
18. Longenecker B.M., Gallatin W.M. Genetic control of resistance to Marek’s disease. *IARC Sci. Publ.*, 1978, 24 (Pt. 2), 845–850.
19. Schierman L.W., Collins W.M. Influence of the major histocompatibility complex on tumor regression and immunity in chickens. *Poult. Sci.*, 1987, 66, 812–818.  
<https://doi.org/10.3382/ps.0660812>
20. Kaufman J., Venugopal K. The importance of MHC for Rous sarcoma virus and Marek’s disease virus some Payneful considerations. *Avian Pathol.*, 1998, 27, S82–S87.  
<https://doi.org/10.1080/03079459808419297>
21. Ali A.O.A., Murphy L., Stear A., Fairlie-Clarke K., Nikbakht Brujeni G., Donskow-Eysoniewska K., Groth D., Buitkamp J., Stear M.J. Association of MHC class II haplotypes with reduced faecal nematode egg count and IgA activity in British Texel sheep. *Parasite Immunol.*, 2019, 41(7), 12626.  
<https://doi.org/10.1111/pim.12626>
22. Ballingall K.T., Tassi R. Sequence-based genotyping of the sheep MHC class II *DRB1* locus. *Immunogenetics*, 2010, 62(1), 31–39.  
<https://doi.org/10.1007/s00251-009-0410-y>
23. Dicks K.L., Pemberton J.M., Ballingall K.T. Characterisation of major histocompatibility complex class IIa haplotypes in an island sheep population. *Immunogenetics*, 2019, 71, 383–393.  
<https://doi.org/10.1007/s00251-019-01109-w>
24. Thirunavukkarasu S.B., Pushpendra K., Om Prakash A.K., Ilayakumar K. Major histocompatibility complex class II *DRB* exon 2 gene polymorphism in Tellicherry goats by PCR-RFLP. *J. Entomol. Zool. Stud.*, 2020, 8(3), 522–524.
25. Li G., Liu K., Jiao S., Liu H., Blair T.H., Zhang P., Cui X., Tan P., Gao J., Ma Z.R. A physical map of a BAC clone contig covering the entire autosome insertion between ovine MHC class IIa and IIb. *BMC Genomics*, 2012, 13, 398.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-398>

## Comparison of *DRB1* Gene Alleles in Two Populations of Romanov Sheep Breed by Restriction Mapping and Sequencing

S. N. Marzanova<sup>a, #</sup>, D. A. Devrishov<sup>a</sup>, V. A. Zuchkov<sup>a</sup>, E. A. Nikolaeva<sup>a</sup>, and N. S. Marzanov<sup>b</sup>

<sup>a</sup>K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Moscow, 109472 Russia

<sup>b</sup>L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Dubrovitsy, Moscow Oblast, 142132 Russia

<sup>#</sup>e-mail: s.marzanova@mail.ru

**Abstract**—Here, a method for the identification of alleles of *DRB1* gene exon 2 of sheep leukocyte antigen (OLA). Two populations of Romanov sheep were used as a model. The studies were carried out by restriction mapping using the *SacI*, *SacII*, *MvaI*, *HinII* and *HaeIII* restriction enzymes. Vertical electrophoresis of hydrolyzed DNA fragments was performed in a 10% polyacrylamide gel. SnapGene© computer program was used to analyze the results of sequencing, and MS Excel 2023 program was used for statistical processing the obtained data. The allele pool at the *DRB1* locus of both populations was represented by 25 different alleles. Nineteen alleles were identified in population #1 and 17 alleles in population #2. The concordance between the two samples was 44%, i.e. 11 identical alleles were identified. After aligning the nucleotide sequences and estimating the distance of alleles from each other, a phylogenetic tree was constructed. The availability of the test system for analyzing alleles at the *DRB1* locus is important for assessing the level of biodiversity of sheep breeds, as well as their genetic resistance or susceptibility to various diseases.

**Keywords:** sheep, Romanov breed, major histocompatibility complex, OLA, *DRB1*, exon 2, locus, primers, restriction enzymes, restriction mapping, genotype, alleles