

УДК 575.22:636.2

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ KASP ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АССОЦИАЦИЙ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ВАРИАНТОВ В ГЕНАХ *GPAD4*, *CCL3*, *DGKG*, *PPARGC1A*, *STAT1*, *TLR4* С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2022 г. М. В. Модоров<sup>1, 2, \*</sup>, А. А. Клещева<sup>1</sup>, К. Р. Осинцева<sup>1</sup>, И. В. Ткаченко<sup>1</sup>, М. Ю. Севостьянов<sup>1</sup>, Н. Н. Зезин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620142 Россия

<sup>2</sup>Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

\*e-mail: mmodorov@gmail.com

Поступила в редакцию 04.02.2022 г.

После доработки 07.04.2022 г.

Принята к публикации 12.04.2022 г.

С использованием метода KASP-генотипирования определены частоты аллелей шести однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в выборке племенного голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской области. SNP8: g.107062990G>A гена *TLR4* (rs8193048) не проявил изменчивости в анализируемой выборке крупного рогатого скота, остальные SNP были изменчивы. Проведен ассоциативный тест между генотипами коров и удоем за 305 дней первой лактации, процентным содержанием и количеством жира и белка молока. Для SNP *CCL3* rs109686238, *DGKG* rs41608610, *PPARGC1A* rs133669403 и *STAT1* rs43705173 – ассоциации не выявлены. При проведении маркер-ориентированной селекции, направленной на увеличение молочной продуктивности голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл., использовать эти локусы не рекомендуется. Для SNP27: g.36531442T>C гена *GPAD4* (rs109913786) показана ассоциация с процентным содержанием жира в молоке. Дана рекомендация по использованию этого SNP в программах маркер-ориентированной селекции уральской популяции голштинизированного черно-пестрого скота.

**Ключевые слова:** ПЦР, генотипирование, SNP, голштинская порода, молочная продуктивность.

**DOI:** 10.31857/S0016675822120086

Дикий бык (*Bos taurus* L. 1758) является одним из наиболее важных объектов животноводства, генетическим исследованиям которого уделяется много внимания. К настоящему времени расшифрован геном и получены тысячи прочтений полного генома представителей многих пород [1, 2]. Разработаны и активно используются SNP-чипы, включающие от нескольких десятков до сотен тысяч маркеров [3–5]. Для тысяч геновариантов показаны ассоциации с хозяйственно ценными признаками крупного рогатого скота [6–8].

Основной массив данных, способствующих современному прогрессу генетических исследований крупного рогатого скота, получен с использованием SNP-чипов и прочтений полного генома. В то же время существует ряд научных и прикладных задач, которые могут быть эффективно (дешевле и быстрее) решены с использованием более простых методов генетических исследований. К таким задачам можно отнести:

1. Подтверждение достоверности происхождения породы крупного рогатого скота с использованием STR-маркеров [9, 10].

2. Определение геновариантов менделирующих признаков (фенов, проявление которых определяется одним геном). В качестве примера можно привести наследственные заболевания крупного рогатого скота [11–13], одну из мутаций гена *CSN3* (однонуклеотидный полиморфизм SNP – 6: g.85656736T>C, rs43703015), ассоциированную с сыродельческими качествами молока, а также одну из мутаций в гене *CSN2* (SNP 6: g.85451132C>G, rs43703013), определяющую так называемое А2-молоко [14].

3. Поиск казуальной мутации для какого-либо признака [15, 16]. Довольно часто скрининг выборки, проведенный с использованием SNP-чипов и полногеномного секвенирования, указывает на наличие нескольких кандидатных геновариантов, ассоциированных с исследуемым признаком

[15, 17–23]. Для выбора казуальной мутации необходимо оценить распространение кандидатных геновариантов в популяции и их связь с фенотипом.

4. Различного рода научные проекты, в задачи которых входит генотипирование образцов по небольшому числу маркеров [24, 25]. В эту же группу можно включить задачи, связанные с проведением маркер-ориентированной селекции по локусам, вносящим существенный вклад в проявление количественных хозяйственно ценных признаков животных.

Если есть необходимость определить генотипы небольшой по размеру выборки животных, процедура постановки и оптимизации ПЦР может являться наиболее долгим, трудоемким и непредсказуемым этапом работы. В связи с этим интерес представляют методы ПЦР, не требующие значительных ресурсозатрат на этапе постановки реакции и определения геновариантов животных. В качестве подобного метода в данной работе мы рассмотрим **KASP** (competitive allele specific PCR, конкурентная аллель-специфическая ПЦР).

KASP позволяет проводить генотипирование образцов по принципу “один локус в одной лунке” (uniplex) с использованием реагентов LGC Genomics (<http://www.lgcgenomics.com>, <https://www.biotech.com/>). Состав реагентов реакции, как и последовательность уникальных праймеров для исследования целевого полиморфизма, является коммерческой тайной производителя, детекция продукта проводится по конечной точке. В качестве локусов могут быть выбраны биаллельные SNP, инсерции и делеции [26, 27]. Удобство использования KASP определяется простотой постановки реакции (необходимо смешать универсальный мастер-микс, праймеры и ДНК). Кроме этого, метод подразумевает использование единой для всех маркеров последовательности температур и времени термоциклирования. В данной работе с использованием метода KASP-генотипирования будет проанализирована связь шести SNP с молочной продуктивностью голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования был племенной голштинизированный черно-пестрый скот 2016–2018 гг. рождения, содержащийся в сельскохозяйственной организации, расположенной на территории Свердловской обл. Данные о продуктивности животных (удой за 305 дней первой лактации, процентном содержании и массе белка и жира в молоке) брали из ИАС “Селэкс – Молочный скот”. Размеры проанализированных выборок коров для разных маркеров составили от 91 до 182 голов.

ДНК выделяли из крови, законсервированной в ЭДТА, с использованием набора “ДНК-Экстрат-1” (“Синтол”, Россия). Концентрацию ДНК измеряли с использованием Nabi Spectrophotometer (MicroDigital, Республика Корея). В качестве генетических маркеров были выбраны шесть SNP, для которых ранее в работе E. Viale с соавт. [3] была показана ассоциация с молочной продуктивностью, либо количеством жира в молоке голштинской породы крупного рогатого скота, разводимой на территории Италии. При заполнении формы заказа реагентов использовали UCSC Genome Browser (<https://genome-euro.ucsc.edu/>), из которого брали последовательность нуклеотидов в районе расположения мутации. Названия SNP и последовательности ДНК с их локализацией приведены в табл. 1. Реагенты были изготовлены LGC Genomics (США), заказ осуществляли через официального дистрибьютора LGC Genomics в России ООО “Максим Медикал”. KASP-генотипирование проводили с использованием Applied Biosystems Real-Time PCR System 7500 согласно протоколу производителя реагентов. Для амплификации использовали 96-луночные прозрачные планшеты Kirgen (KG2561) и пленку для планшетов (KG2571). Расшифровку генотипов проводили после 42 циклов ПЦР.

Статистическую обработку данных проводили в R-project [28]. Выполняли ассоциативный тест между генотипом коров и их молочной продуктивностью, а именно: удоем за 305 дней первой лактации, процентном содержанием и массой белка и жира в молоке. При проведении ассоциативного теста использовали дисперсионный анализ (ANOVA), множественные сравнения групповых средних выполняли с использованием критерия Тьюки. При проверке статистических гипотез использовали уровень статистической значимости  $p < 0.05$ . Вводили поправку Бонферрони на множественное сравнение  $p < 0.05/6 = 0.0083$  (шесть генетических маркеров).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Частоты аллелей и генотипов шести исследуемых SNP представлены в табл. 2. SNP8: g.107062990G>A гена *TLR4* не проявил изменчивости, все проанализированные особи имели гомозиготные генотипы *GG*. Остальные пять локусов были изменчивы. Для трех SNP частоты минорных аллелей не более чем на 3% отличались от частот, отмеченных для популяции голштинской породы скота, разводимой на территории Италии [3], они составили 22% для *DGKG* rs41608610, 20% для *PPARGC1A* rs133669403 и 16% для *CCL3* rs109686238. Частота минорного аллеля *STAT1* rs43705173 в выборке уральского скота составляет 38%, что на восемь процентов больше, чем в популяции Италии. Для *GPAD4* rs109913786 обнаруженная нами

**Таблица 1.** Локализация исследуемых SNP в геноме *Bos taurus* с указанием последовательностей, используемых при заказе реагентов для KASP-генотипирования

| SNP (ген)   | Положение SNP*                  | Последовательность   | Присутствие локуса на SNP-чипах**                                     |
|---|---------------------------------|--|---|
| rs109913786<br>( <i>AGPAT6</i> ,<br><i>syn. GPAD4</i> ) | chr27:<br>36220692<br>36531442  | AGCGGGAGCAGTAAGGCCCTGGACAACAC<br>TCCCGAGTTTGAGCTCTCGGA[T/C]ATTTTCT<br>ATTTCTGCCGAAAKGAATGGAGACCATCA<br>TGGACGATGAGGT   | Illumina<br>BovineHDBead<br>Chip                                      |
| rs109686238<br>( <i>CCL3</i> )                          | chr19:<br>14673538<br>14359777  | CACACGAATAGGGCAGGCGCGATGTTGCC<br>GGGACRGTGGCCCAAGCCTC[T/C]TTTGGAT<br>GGAAGGAAGTGAATTAAGGAATCCCCGCA<br>GAGGACCAGGAAG    | Illumina<br>BovineSNP50<br>BeadChip                                   |
| rs41608610<br>( <i>DGKG</i> )                           | chr1:<br>81589478<br>80999135   | AGTATACAATAGCCACATGTGGCTAATGGC<br>TAAGTCACTTTGGCAACTTA[C/T]GGAGATA<br>AAAAACAGAAAGGAGACAGTAAGACAGA<br>TTATTTGGTATTTG   | Illumina<br>BovineHDBead<br>Chip, Illumina<br>BovineSNP50<br>BeadChip |
| rs133669403<br>( <i>PPARGCIA</i> )                      | chr6:<br>44875315<br>43401661   | ATTACCTGGGCCGCGGCTATGGGGCGATC<br>TTGAACGTGACGCRCACAGG[A/G]GCGAATT<br>TCGGTGTGTGCGGTGTCTGCAGTGGCCTGA<br>CTCATAGTAGTAG   |   |
| rs43705173<br>( <i>STAT1</i> )                          | chr2:<br>79888611<br>79518124   | GCTTTATGATGCTGGCTAATATCAATAGAA<br>GGAAGTAACTTTACAAATT[C/T]ATGAGTA<br>GTATCTTCCATTTCCAGCTTTAATACCAAAGT<br>TGAATATATTCTG |   |
| rs8193048<br>( <i>TLR4</i> )                            | chr8:<br>108834063<br>107062990 | CGATCATCAGTGTGTGCGGTGGTCACTGTGC<br>TCCTGGTGTCTGTGGTAGGR[G/A]TCCTAGT<br>CTACAAGTTCTATTTCCACCTGATGCTTCTT<br>GCTGGCTGCAA  |   |

Примечание. \* – сверху позиция в сборке генома *Bos taurus*\_UMD\_3.1.1/bosTau8 (<https://genome-euro.ucsc.edu/>), внизу – позиция в сборке генома ARS-UCD1.2 (106 annotation release, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), \*\* – данные взяты с сайта <https://www.ensembl.org/>.

частота минорного аллеля составляет 36%, что на 17% больше, чем в выборке итальянских голштинов. Во всех случаях наблюдаемые частоты генотипов статистически значимо не отличались от частот, соответствующих равновесию Харди–Вайнберга ( $p < 0.05$ ).

Ассоциативный тест выявил связь генотипов SNP27: g.36531442T>C гена *GPAD4* с процентным содержанием жира в молоке коров за первую лактацию ( $p < 0.00029$ ). Особи с генотипом *CC* статистически значимо превосходили особей с генотипом *TC* ( $p = 0.0018$ ) и особей с генотипом *TT* ( $p = 0.0031$ ), рис. 1. Особи с генотипом *CC* имели средний процент жира в молоке – 3.87%, особи с генотипом *TC* – 3.73%, с генотипом *TT* – 3.69%. Ассоциаций других генотипов с молочной продуктивностью коров выявлено не было.

Минимальное достаточное количество ДНК для корректного определения генотипа составило не менее 50 нг/реакцию.

## ОБСУЖДЕНИЕ

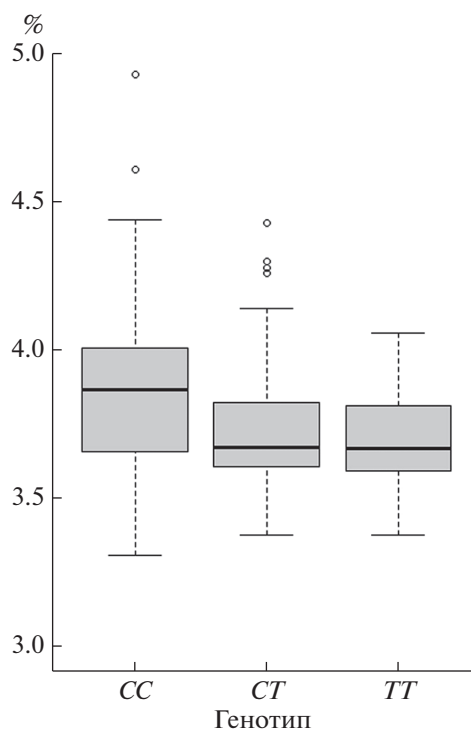
Во многих исследованиях полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) было показано, что в районе локализации гена *GPAD4* находится локус количественного признака (QTL), связанного с процентным содержанием жира молока. Связь различных геновариантов *GPAD4* с процентным содержанием жира в молоке была показана для нескольких пород крупного рогатого скота [2, 3, 29–31].

Исследуемый нами SNP27: g.36531442T>C гена *GPAD4* (rs109913786) локализован в третьем из 12 экзонов, мутация является синонимичной. Ранее ассоциативный тест для данного локуса был проведен только в двух работах. Для швейцарской породы коров ассоциация геновариантов rs109913786 с молочной продуктивностью обнаружена не была [32], тогда как для скота голштинской породы, разводимой на территории Италии, локус был ассоциирован как с процентным содержанием, так и с количеством жира в молоке [3]. Согласно результатам

**Таблица 2.** Частота встречаемости аллелей и генотипов в выборке голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл.

| SNP (ген)  | <i>N</i> | Генотип   | Частота генотипа, % | Частота аллеля, % |      |
|--|----------|-----------|---------------------|-------------------|------|
| rs109913786<br>( <i>AGPAT6</i> , <i>syn.</i><br><i>GPAD4</i> ) | 180      | <i>TT</i> | 15.0                | <i>T</i>          | 36.1 |
|  |          | <i>TC</i> | 42.2                | <i>C</i>          | 63.9 |
|  |          | <i>CC</i> | 42.8                |                   |      |
| rs109686238<br>( <i>CCL3</i> )                                 | 182      | <i>AA</i> | 72.8                | <i>A</i>          | 84.3 |
|  |          | <i>AG</i> | 23.9                | <i>G</i>          | 15.7 |
|  |          | <i>GG</i> | 3.3                 |                   |      |
| rs41608610<br>( <i>DGKG</i> )                                  | 171      | <i>AA</i> | 61.4                | <i>A</i>          | 77.8 |
|  |          | <i>AG</i> | 32.8                | <i>G</i>          | 22.2 |
|  |          | <i>GG</i> | 5.8                 |                   |      |
| rs133669403<br>( <i>PPARGCIA</i> )                             | 89       | <i>GG</i> | 64                  | <i>G</i>          | 80.3 |
|  |          | <i>GA</i> | 32.6                | <i>A</i>          | 19.7 |
|  |          | <i>AA</i> | 3.4                 |                   |      |
| rs43705173<br>( <i>STAT1</i> )                                 | 92       | <i>GG</i> | 35.9                | <i>G</i>          | 62.5 |
|  |          | <i>GA</i> | 53.2                | <i>A</i>          | 37.5 |
|  |          | <i>AA</i> | 10.9                |                   |      |
| rs8193048<br>( <i>TLR4</i> )                                   | 91       | <i>GG</i> | 100                 | <i>G</i>          | 100  |
|  |          | <i>GA</i> | 0                   | <i>A</i>          | 0    |
|  |          | <i>AA</i> | 0                   |                   |      |

Примечание. *N* – число проанализированных особей.



**Рис. 1.** Жирность молока у коров с разными генотипами по замене 27: g.36531442T>C (rs109913786) в гене *GPAD4*.

нашего исследования, геновариант CCSNP27: g.36531442T>C гена *GPAD4* ассоциирован с высоким процентным содержанием жира в молоке голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл.

Таким образом, метод KASP-генотипирования показал свою эффективность при проведении популяционно-генетических исследований крупного рогатого скота. Метод позволил расшифровать генотипы животных для всех SNP, попавших в сферу наших интересов, при этом затраты времени на дизайн реагентов и отработку протоколов амплификации были минимальными. SNP *GPAD4* rs109913786 можно рекомендовать для использования в программах маркер-ориентированной селекции уральской популяции голштинизированного черно-пестрого скота. Для пяти SNP, а именно: *DGKG* rs41608610, *PPARGCIA* rs133669403, *CCL3* rs109686238, *STAT1* rs43705173, *TLR4* rs8193048, ассоциации с удоем, процентным содержанием жира и белка в молоке в выборке голштинизированного черно-пестрого скота обнаружены не были. При проведении маркер-ориентированной селекции, направленной на увеличение молочной продуктивности голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл., использовать эти локусы не рекомендуется.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-016-00239.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Elsik C.G., Tellam R.L., Worley K.C.* The genome sequence of taurine cattle: A window to ruminant biology and evolution // *Science*. 2009. V. 324. № 5926. P. 522–528. <https://doi.org/10.1126/science.1169588>
2. *Hayes B.J., Daetwyler H.D.* 1000 bull genomes project to map simple and complex genetic traits in cattle: Applications and outcomes // *Ann. Rev. Animal Biosciences*. 2019. V. 7. P. 89–102. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115024>
3. *Viale E., Tiezzi F., Maretto F. et al.* Association of candidate gene polymorphisms with milk technological traits, yield, composition, and somatic cell score in Italian Holstein-Friesian sires // *J. Dairy Sci.* 2017. V. 100. № 9. P. 7271–7281. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12666>
4. *Neumann G.B., Korcuć P., Arends D. et al.* Design and performance of a bovine 200k SNP chip developed for endangered German Black Pied cattle (DSN) // *BMC Genomics*. 2021. V. 22. Article number 905. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08237-2>
5. *Zaalberg R.M., Poulsen N.A., Bovenhuis H. et al.* Genetic analysis on infrared-predicted milk minerals for Danish dairy cattle // *J. Dairy Sci.* 2021. V. 104. № 8. P. 8947–8958. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19638>
6. *Jiang J., Ma L., Prakapenka D. et al.* A large-scale genome-wide association study in US Holstein cattle // *Frontiers in Genet.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00412>
7. *Liu L., Zhou J., Chen C.J. et al.* GWAS – based identification of new loci for milk yield, fat, and protein in Holstein cattle // *Animals*. 2020. V. 10. № 11. <https://doi.org/10.3390/ani10112048>
8. *Hoze C., Escoufflaire C., Fritz S., Capitan A.* A splice site mutation in *CENPU* is associated with recessive embryonic lethality in Holstein cattle // *J. of Dairy Sci.* 2020. V. 103. № 1. P. 607–612. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17056>
9. *Модоров М.В., Ткаченко И.В., Грин А.А. и др.* Генетическая структура популяции голштинизированного черно-пестрого скота на территории Урала // *Генетика*. 2021. Т. 57. № 4. С. 437–444. <https://doi.org/10.31857/S001667582104010X>
10. *Модоров М.В., Ткаченко И.В., Грин А.А.* Индивидуальная идентификация особей и контроль родословной в популяции голштинизированного черно-пестрого скота Урала // *Вопр. нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2019. № 4. С. 119–121. <https://doi.org/10.17238/issn2072-6023.2019.4.119>
11. *Khan M.Y.A., Omar A.I., He Y. et al.* Prevalence of nine genetic defects in Chinese Holstein cattle // *Veter. Med. and Sci.* 2021. V. 7. № 5. P. 1728–1735. <https://doi.org/10.1002/vms3.525>
12. *Zhang Y., Liang D., Huang H. et al.* Development and application of KASP assays for rapid screening of 8 genetic defects in Holstein cattle // *J. Dairy Sci.* 2020. V. 103. № 1. P. 619–624. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16345>
13. *Модоров М.В., Мартынов Н.А., Шкуратова И.А. и др.* Распространение рецессивных генетических нарушений в уральской популяции крупного рогатого скота // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 4. С. 429–437. <https://doi.org/10.31857/S0016675822040105>
14. *Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J.* Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition // *J. Dairy Sci.* 2009. V. 92. № 11. P. 5335–5352. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2461>
15. *Lehner S., Zerbin I., Doll K. et al.* A genome-wide association study for left-sided displacement of the abomasum using a high-density single nucleotide polymorphism array // *J. Dairy Sci.* 2018. V. 101. № 2. P. 1258–1266. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13216>
16. *Sieck R.L., Fuller A.M., Bedwell P.S. et al.* Mandibulofacial dysostosis attributed to a recessive mutation of *CYP26C1* in Hereford cattle // *Genes*. 2020. V. 11. № 11. <https://doi.org/10.3390/genes11111246>
17. *Adams H.A., Sonstegard T.S., VanRaden P.M. et al.* Identification of a nonsense mutation in *APAF1* that is likely causal for a decrease in reproductive efficiency in Holstein dairy cattle // *J. Dairy Sci.* 2016. V. 99. № 8. P. 6693–6701. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10517>
18. *Kunz E., Rothammer S., Pausch H. et al.* Confirmation of a non-synonymous SNP in *PNPLA8* as a candidate causal mutation for Weaver syndrome in Brown Swiss cattle // *Genet. Select. Evol.* 2016. V. 48. Article number 21. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0201-5>
19. *Pausch H., Schwarzenbacher H., Burgstaller J. et al.* Homozygous haplotype deficiency reveals deleterious mutations compromising reproductive and rearing success in cattle // *BMC Genomics*. 2015. V. 16. Article number 312. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1483-7>
20. *Rothammer S., Kunz E., Seichter D. et al.* Detection of two non-synonymous SNPs in *SLC45A2* on BTA20 as candidate causal mutations for oculocutaneous albinism in Braunvieh cattle // *Genet. Select. Evol.* 2017. V. 49. Article number 73. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0349-7>
21. *Schwarzenbacher H., Burgstaller J., Seefried F.R. et al.* A missense mutation in *TUBD1* is associated with high juvenile mortality in Braunvieh and Fleckvieh cattle // *BMC Genomics*. 2016. V. 17. Article number 400. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2742-y>
22. *Schwarzenbacher H., Wurmser C., Flisikowski K. et al.* A frameshift mutation in *GON4L* is associated with proportionate dwarfism in Fleckvieh cattle // *Genet. Se-*

- lect. *Evol.* 2016. V. 48. Article number 25. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0207-z>
23. Venhoranta H., Pausch H., Flisikowski K. et al. In frame exon skipping in *UBE3B* is associated with developmental disorders and increased mortality in cattle // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. 890. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-890>
  24. Neary M.T., Breckenridge R.A., Neary J.M. et al. A comparison of DNA collection methods in cattle and yaks // *J. Anim. Sci.* 2014. V. 92. № 9. P. 3811–3815. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7445>
  25. Pareek C.S., Błaszczuk P., Dziuba P. et al. Single nucleotide polymorphism discovery in bovine liver using RNA-seq technology // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172687>
  26. Semagn K., Babu R., Hearne S., Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement // *Mol. Breeding*. 2014. V. 33. № 1. P. 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9917-x>
  27. Rasheed A., Wen W., Gao F. et al. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2016. V. 129. № 10. P. 1843–1860. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2743-x>
  28. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2020. <https://www.R-project.org>
  29. Littlejohn M.D., Tiplady K., Lopdell T. et al. Expression variants of the lipogenic *AGPAT6* gene affect diverse milk composition phenotypes in *Bos taurus* // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085757>
  30. Bouwman A.C., Bovenhuis H., Visser M.H.P.W., van Arendonk J.A.M. Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle // *BMC Genetics*. 2011. V. 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-43>
  31. Wang X., Wurmser C., Pausch H. et al. Identification and dissection of four major QTL affecting milk fat content in the German Holstein-Friesian population // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040711>
  32. Cecchinato A., Ribeca C., Chessa S. et al. Candidate gene association analysis for milk yield, composition, urea nitrogen and somatic cell scores in Brown Swiss cows // *Animal*. 2014. V. 8. № 7. P. 1062–1070. <https://doi.org/10.1017/S1751731114001098>

## KASP Technology Use to Study Associations of Single Nucleotide Polymorphism in *GPAD4*, *CCL3*, *DGKG*, *PPARGC1A*, *STAT1*, *TLR4* Genes with Cattle Milk Production

M. V. Modorov<sup>a, b, \*</sup>, A. A. Kleshcheva<sup>a</sup>, K. R. Osintseva<sup>a</sup>,  
I. V. Tkachenko<sup>a</sup>, M. Yu. Sevost'yanov<sup>a</sup>, and N. N. Zezin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620142 Russia

<sup>b</sup>Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144 Russia

\*e-mail: mmodorov@gmail.com

The allele frequencies of six single-nucleotide polymorphisms in a sample of Holstein Black Pied cattle of the Sverdlovsk oblast were determined using the KASP-genotyping method. The minimum sufficient amount of DNA for a correct genotype determination is at least 50 ng per reaction when DNA was isolated from the blood of animals. Locus 8: g.107062990G>A of the *TLR4* gene (rs8193048) showed no variability, other loci were variable. An association test was performed between cow genotypes, as well as milk yield in 305 days of the first lactation, percentage and amount of milk fat and protein. The associations doesn't found for rs109686238, rs41608610, rs133669403, rs43705173, rs8193048 loci. Significant SNP trait associations were observed for polymorphisms located in *AGPAT6* genes (locus 27: g.36531442T>C, rs109913786) for fat yield.

**Keywords:** PCR, genotyping, SNP, Holstein, milk yield, milk composition.