

Усенбеков Е.С., Альпейсов Ш.А., Жансеркенова О.О., Касымбекова Ш.Н.

Казахский национальный аграрный университет

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ТОЧЕЧНОЙ МУТАЦИИ У БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Аннотация. Авторами статьи проведена работа по генотипированию племенных быков-производителей АО «Асыл-Тулик» и ТОО «Асыл» на наличие генетических мутации с помощью полимеразной цепной реакции в сочетании с ПДРФ анализом. По результатам исследования быки-производители являются свободными от вредных генетических мутации - BLAD, CVM, DUMPS и Citrullinemia.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, точечная мутация, рестрикция амплификата, быки-производители, электрофорез, BLAD, CVM, DUMPS и Citrullinemia.

Введение

В настоящее время описаны множество наследственных заболеваний крупного рогатого скота различных видов и пород. Быстрота и точность диагностики многих из них значительно повысились благодаря достижениям молекулярной биологии, развитию молекулярно-генетических методов регистрации полиморфных локусов ДНК и мутационных изменений, созданию эффективных ДНК-диагностических процедур для исследования человека и различных видов сельскохозяйственных животных. Анализируя мировую литературу по генетике крупного рогатого скота, следует отметить, что в последние годы получено много новых данных по генетическим дефектам у этого вида животных. Так, если сравнивать количество летальных дефектов крупного рогатого скота в списке Визнера и Виллера 1979, и Millar, 2000, то в первом из них их число равно 46, а во втором 403 [1,2].

Определение носителей мутаций играет важную роль в работе племенных хозяйств. Продажи племенных бычков невозможны без тестирования на летальные мутации. Тестирование коров и телок также необходимо для снижения затрат на осеменение и выращивание молодняка. Все наследственные заболевания крупного рогатого скота в той или иной степени связаны с нарушением репродуктивной функции у коров, снижением резистентности организма телят, у носителей мутации генетического дефекта часто регистрируются эмбриональная смертность, повышение индекса осеменения в результате ранней смертности предимплантационных эмбрионов в период беременности. Так, наследственное заболевание крупного рогатого скота, дефицит лейкоцитарной адгезии BLAD (bovine leukocyte adhesion deficiency) сопровождается снижением иммунитета у телят, предрасположенностью у молодняка к бактериальным инфекциям. По данным различных авторов данный генетический дефект наносит большой экономический ущерб животноводству [3].

Комплексное уродство позвоночника у крупного рогатого скота, CVM (complex vertebral malformation) как летальная аутосомальная рецессивная наследственная болезнь впервые была описана в 2001 году американским ученым Agerholm J.S. [4].

DUMPS (Deficiency of uridine monophosphate synthase), является смертельным наследственным аутосомно-рецессивным расстройством крупного рогатого скота, которое сопровождается эмбриональной смертностью в период имплантации в начальной стадии

стельности у коров. В клетках млекопитающих, на последней стадии, синтез пиримидиновых нуклеотидов включает конверсию оротата в уридинмонофосфатсинтетазу (UMP) и этот биохимический процесс катализируется ферментом UMP синтетаза. Фермент UMP-синтетаза является необходимым для синтеза пиримидиновых нуклеотидов, которые входят в состав ДНК и РНК. Рост и развитие гомозиготных рецессивных предимплантационных эмбрионов заканчиваются эмбриональной смертностью, приблизительно на 40-й день после зачатия [5].

Citrullinemia - это врожденное нарушение обмена веществ из-за дефицита фермента цикла мочевины, аргининсукцинатсинтетазы (L-citrulline:L-aspartateligase). Эта болезнь была впервые описана у людей, но относительно недавно установлена у молочного скота Австралии. Обычно больные гомозиготные по гену citrullinemia телята рождаются нормальными, но на второй и третий день они становятся вялыми, отмечаются признаки депрессии и снижается аппетит. Такие животные погибают на 7-й день после рождения с клиническими признаками коллапс, слепота и резкое ухудшение состояния больного животного. Анализ последовательности гена ASAS показал, что нуклеотидная замена С на Т является причиной точечной мутации у крупного рогатого скота. Известно, что у животных носителей мутации Citrullinemia исчезает сайт рестрикции для эндонуклеазы Ava II и этот полиморфизм используется для ПЦР диагностики [3,4,5].

В настоящее время, интенсивный обмен генетическими материалами между странами требует проведения систематического мониторинга качества биоматериалов, таких, как замороженная сперма, замороженный эмбрион и живой скот. Во всех странах с развитым животноводством большое внимание уделяется своевременной диагностике генетических дефектов у племенных животных с целью недопущения распространения гетерозиготных носителей.

В связи вышеизложенным, целью настоящей работы было проведение мониторинга племенных быков-производителей на носительство генетических мутаций BLAD, CVM, DUMPS и Citrullinemia.

Материал и методика исследований

Исследования проводились на 68 племенных быках-производителей АО «Асыл-Тулик» Акмолинской области и на 43 быках ТОО «Асыл» Алматинской области в рамках реализации проекта «Мониторинг племенных животных Республики Казахстан на носительство генетических дефектов с помощью молекулярно-генетических методов» на период 2012-2013 годы в учебно-научно-диагностической лаборатории Казахстанско-Японского инновационного центра Казахского национального аграрного университета. Породный состав исследуемой группы быков-производителей АО «Асыл-Тулик» представлен более 14 породами отечественной и зарубежной селекции, а в ТОО «Асыл» были, в основном быки, местной Алатауской породы и быки мясной породы зарубежной селекции. Анализ документов племенных животных зарубежной селекции показывает, что 38% быков-производителей были протестированы на наличие генетического дефекта методом полимеразной цепной реакции и результаты тестирования были обозначены BL, бык свободен от гена BLAD синдрома и TV, бык свободен от гена CVM.

В качестве материала для исследования были использованы замороженные образцы спермы быков-производителей в соломинках АО «Асыл-Тулик» и пробы спермы, замороженные в виде гранул быков ТОО «Асыл». Объем замороженной спермы в пайеттах 0,2 мл и гранул 0,5 мл. Существуют разные способы выделения ДНК из биологических материалов. На сегодня самым распространенным и простым в методическом плане остается метод выделения ДНК с помощью фенол-хлороформ-изоамилового спирта, который позволяет выделить из спермы качественную ДНК в

большом количестве и с высокой концентрацией. Однако этот метод представляет определенную опасность для здоровья исследователя и поэтому нами был использован наряду с фенол-хлороформ-изоамиловый спирт методом, метод выделения ДНК с помощью набора «ДНК сорб В».

При выделении ДНК из замороженной спермы быков-производителей по методу Bahnak центрифугировали 0,2 мл спермы в течение 5 минут при 4000 g. Осевшие клетки промывали 0,15 М раствором NaCl, 2мМ ЭДТА и центрифугировали в течение 5 минут при 4000 g. Эту процедуру повторяли дважды. Затем, после последнего центрифугирования верхний слой отсасывали с помощью пипетки, а к осадку добавляли лизирующий буфер Bahnak в количестве 1 мл, имеющий следующий состав: 6М гуанидинтиоцианат, 25 мМ цитрат натрия pH 7,0, 0,5% Sarcosyl, 0,1 М 2-меркаптоэтанол и инкубировали при 370С в течение 30 минут. Перед депротеинизацией лизированный раствор ДНК разбавляли 0,15 М раствором NaCl в соотношении 1:4. Депротеинизацию осуществляли по обычной методике, путем добавления равного объема смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (24:24:1). После центрифугирования осторожно отсасывали верхний слой пипеткой и осаждали в двух объемах 96% этилового спирта. Высушивали ДНК в течение 2-5 минут под вытяжным шкафом и растворяли в буфере TE [6].

При выделении ДНК из замороженной спермы быков-производителей с помощью набора «ДНК сорб В», с целью оптимизации и выделения более качественной ДНК из спермы быков-производителей нами был использован способ предварительной обработки спермы следующим образом: вносили в пробирку 200 мкл спермы, затем добавляли 1 мл лизирующего буфера, имеющий состав 100 мМТрис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМNaCl, pH 8,0 и перемешивали в течение 30 секунд, далее центрифугировали 10000 об/мин в течение 5 минут. После центрифугирования, суспендировали осадок в 500 мкл буфера: 100 мМТрис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМNaCl, pH 8,0 и добавляли 8 мкл 2-меркаптоэтанола. Затем перемешивали на вортексе в течение 1 минуты и оставляли на 30 минут при комнатной температуре. Подготовленную таким способом смесь в количестве 100 мкл использовали для выделения ДНК с помощью набора «ДНК сорб-В» согласно инструкции.

В первую очередь, перед выделением ДНК прогревали лизирующий раствор и раствор для отмывки №1 из набора «ДНК-сорб-В» в течение 1 часа при температуре 65 °С. Затем, внесли в пробирку 100 мкл подготовленную с меркаптоэтанолом смесь и тщательно перемешивали на вортексе и прогревали 5 минут при температуре 65 °С. Центрифугировали 5 секунд при 5000 об/мин на микроцентрифуге. В каждую пробирку, затем вносили 25 мкл универсального ресуспендированного сорбента из набора. Перемешивали на вортексе, ставили на штатив на 2 минуты, затем повторяли эту процедуру еще раз и ставили на штатив на 5 минут. Осаждали сорбент центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 секунд. Удаляли надосадочную жидкость, затем вносили по 300 мкл раствора для отмывки №1. Перемешивали на вортексе, осаждали сорбент центрифугированием, удаляли надосадочную жидкость. Вносили 500 мкл раствора для отмывки №2, перемешивали на вортексе, центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость. Повторяли процедуру отмывки с использованием раствора для отмывки №2. Подсушивали сорбент универсальный после удаления надосадочной жидкости в термостате при 65 °С в течение 5-10 минут. В пробирки вносили по 50 мкл TE-буфера для элюции ДНК. Перемешивали на вортексе, инкубировали в термостате при 65 °С в течение 5 минут с периодическим встряхиванием. Центрифугировали пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги в течение 1 минуты. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК, которую в последующем

использовали для полимеразной цепной реакции. Качество и количество выделенной таким способом ДНК проверяли на 0,8 % агарозном геле.

Проведение полимеразной цепной реакции для детекции точечной мутации у быков-производителей. Тестирование животных на наличие генетических дефектов, в первую очередь, включает выбор праймеров для амплификации нужного фрагмента ДНК. Нами была проведена работа по подбору соответствующих пар праймеров для проведения эксперимента. Сначала с сайта NCBI вывели из базы данных полную последовательность генов BLAD, CVM, DUMPS и Citrullinemia. Для ПЦР диагностики BLAD и CVM использовали последовательности праймеров других авторов, а для выявления мутации DUMPS, Citrullinemia кроме праймеров известных авторов, был произведен дизайн собственных праймеров с помощью программы Primer 3. При разработке праймеров мы учитывали размер амплифицируемого фрагмента, для хорошей визуализации при агарозном электрофорезе и размеры фрагментов после рестрикции соответствующей эндонуклеазой, оптимальной длины для определения носителей мутации.

Полимеразную цепную реакцию проводили на термоциклере «Терцик» производства России, который имеет четыре блока по 10 ячеек в каждом блоке. Для выявления полиморфизма гена CD 18 мы использовали следующие праймеры: прямой праймер 5'-AGGCAGTTGCGTTCAATGTGA - 3' и обратный праймер 5'- CCGACTCGGTGA TGCCATTGA - 3'. Специфические праймеры были синтезированы лабораторией AppliedBiosystems. Использование данной пары праймеров позволяет амплифицировать 159 пар нуклеотидов фрагмента гена CD 18.

Условия проведения полимеразной цепной реакции: первый шаг - денатурация ДНК при температуре 94 °С – 5 минут, второй шаг – денатурация при 94 °С – 45 сек, отжиг праймеров – 62 °С 45 сек и элонгация при температуре 72 °С 45 сек. Завершающий синтез при 72 °С с продолжительностью 2 мин. Хранение при +4 °С. Объем реакционной смеси был 50 мкл, имеющий следующий состав: 5 мкл 10 X буфера для ПЦР, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 мкл 25 мкМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл 0,2 mM концентрации каждого dNTP, 0,5 мкл фермента TaqPolymerase с активностью 5u/μl, 5 мкл ДНК и 26,5 мкл дистиллированной воды.

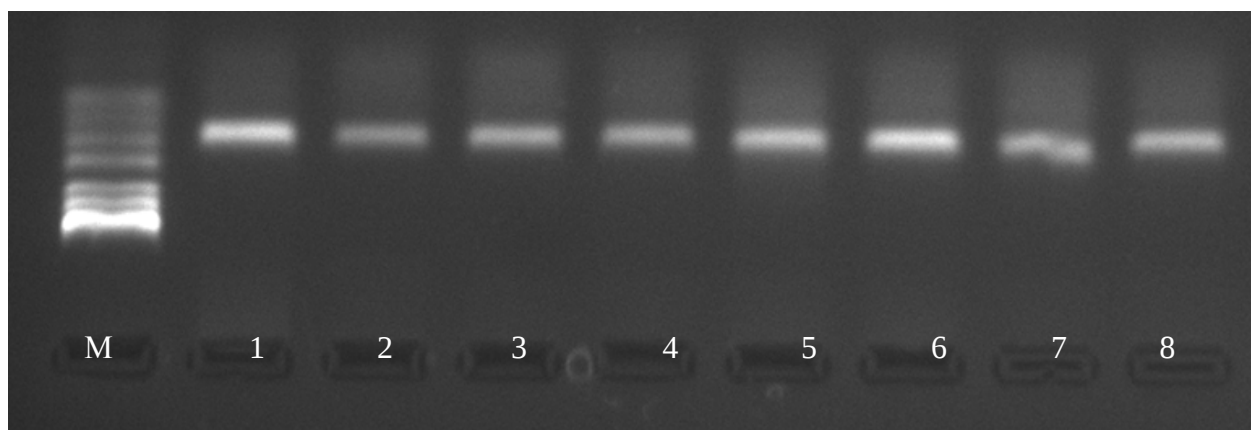


Рисунок 1. Электрофореграмма амплификата гена CD 18, длина амплификата 159 п.н.

Готовили обычно реакционную смесь на 10 реакций и внесли в каждую пробирку готовую ПЦР реакционную смесь в количестве 18,5 мкл и добавляли в каждый образец по 5 мкл ДНК и нанесли по 2 капли минерального масла. Для проведения полимеразной цепной реакции использовали тонкостенную пробирку Эппендорфа объемом 0,5 мл.

Продолжительность амплификации составила 35-40 циклов, после окончания амплификации готовили 3% агарозу и заливали гель. В каждую лунку агарозного геля внесли по 7 мкл амплификата, а в первую лунку в качестве ДНК маркера, рUC19DNA рестрицированная рестриктазой MspI. Данный маркер имеет фрагменты длиной 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34, 34 пар нуклеотидов. Продукт амплификации подвергали электрофорезу при режиме: напряжение 180 В, сила тока 150 мА, мощность 50 Вт и продолжительность 45-60 минут. В случае успешной амплификации, на электрофореграмме хорошо виден бэнд размером 159 п.н. (рисунок 1). Визуализацию результатов амплификации и продукта рестрикции осуществляли с помощью геледокументирующей системы. Результаты электрофореза документировали в виде электронного варианта и распечатали электрофореграммы. У здоровых животных появляется сайт рестрикции для рестриктазы Taq I и ампликат после рестрикции дает два фрагмента размером 110 и 49 пар нуклеотидов (рисунок 2).

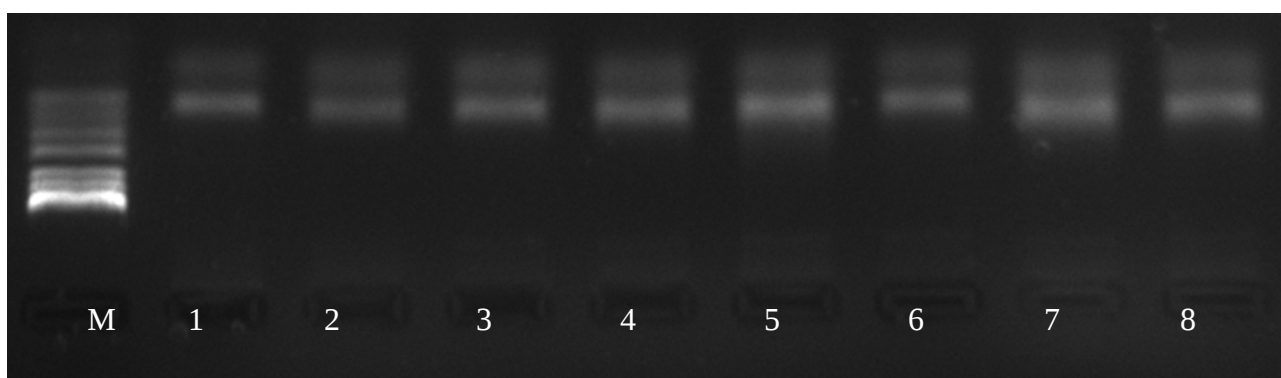


Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов рестрикции амплификата гена CD 18 эндонуклеазой Taq I, длина фрагментов 49 и 110 п.н.

Американскими учеными была изучена G/T мутация гена SLC35A3 в позиции 559 при наследственном заболевании - CVM. На основании этих исследований японскими учеными были подобраны праймеры для выявления мутации CVM у крупного рогатого скота. Мы использовали метод ПДРФ анализа ПЦР продуктов. Замена G (дикий тип аллели) на T (CVM-аллель) приводит при использовании праймеров F 5'-CACAATTTGTAGGTCTCACTGCA, R 5'-CGATGAAAAAGGAACCAAAAGGG - 3' к исчезновению сайта для рестриктазы PstI. При использовании праймеров F 5'-CACAATTTGTAGGTCTCAATGCA- 3', R 5'-CGATGAAAAAGGAACCAAAAGGG - 3' появляется сайт рестрикции для EcoT22 выявляющий мутантную аллель.

Также нами для выявления носителей мутации CVM были использованы аллель специфические праймеры CVM – G, F 5'-CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAG- 3' и CVM – T, F 5'-CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAT- 3' и R 5'-CGATGAAAAAGGAACCAAAAGGG - 3'. ПЦР проводили в общем объеме 50 мкл, содержащем 1-2 ед. Taq - полимеразы, по 0,25 mM каждого dNTP, 67 mM трис -HCl pH 8,6, 1,5 mM MgCl₂, 16,6 mM NH₄OH, по 0,5 мкM каждого праймера и 100-150 нг ДНК.

Для ПЦР анализа по локусам DUMPS, Citrullinemia кроме существующих праймеров, мы разработали дизайн собственных праймеров. Так, для амплификации участка гена ASAS (Citrullinemia) прямой праймер Usen-1, 5'-AAGGAGTTTGTGGAGGAGTTCAT - 3' и обратный праймер Usen-2, 5'-GAGACACATACTTGGCTCCTTCTC -3'. Использование

данного набора праймеров позволяет амплифицировать фрагмент гена ASAS длиной 151 п.н. и после рестрикции получаем фрагменты размерами: 58, 93 и 151 п.н. Также для ПДРФ-ПЦР анализа Citrullinemia нами были использованы праймеры, разработанные Grupe S. F 5'- AGGTGTTTCATTGAGGACATC -3' и R 5' –CGCCGTGAGACACATACTTG-3'. Данная пара праймеров позволяет амплифицировать участок гена Citrullinemia длиной 181 п.н., размеры фрагментов после рестрикции – 82, 99 и 181 п.н. [7].

Немецкие ученые В. Schwenger для детекции точечной мутации DUMPS использовали следующие праймеры: F 5'- GCAAATGGCTGAAGAACATTCTG -3' и R 5' – GCTTCTAACTGAACCTGGAGT--3' , при этом длина амплификата была 108 п.н., после рестрикции были бэнды 52, 56 и 108 п.н. Нами были разработаны праймеры, F 5'- TGAGTTCAATGTGACATGAGAAAAT -3' и R 5' – ATTACCAATCA-ATAGGCTTACCTCC-3', позволяющие амплифицировать фрагмент гена UMP размером 236 п.н. и после обработки эндонуклеазой 82, 154 и 236 п.н. [5] .

Таблица 1 - Основные характеристики амплификатов и продуктов рестрикции при генетических дефектах крупного рогатого скота - BLAD, CVM, DUMPS и Citrullinemia

Название генетического дефекта и рестриктазы	Длина амплификата п.н.	Животные с генотипом		
		Нормальные п.н.	Гетерозиготные носители п.н.	Гомозиготные носители п.н.
BLAD (Tag I)	159	49, 110	49,110, 159	159
CVM (Pst I)	287	29,258	29,258,287	287
CVM с аллель специфическимпра ймером G	287	287	287	амплификация не идет
CVM с аллель специфическимпра ймером T	287	амплификация не идет	287	287
DUMPS (Ava I) Schwenger B.	108	19,36,53	19,36,53, 89	19,89
DUMPS (Ava I) Usen	241	19,79, 143	19,79,143,241	79, 162,241
Citrullinemia (BC) (Ava II) Grupe S.	198	89, 109	89,109,198	198
Citrullinemia (BC) (Ava II) Usen	169	77,92	77,92,169	169

ДНК, выделенная из замороженной спермы быков была амплифицирована для ПЦР диагностики DUMPS и Citrullinemia в течение 40-45 циклов. Продукт амплификации проверяли в 3%-ной агарозе. Для выявления носителей мутации DUMPS ставили рестрикцию амплификата с рестриктазой Ava I, а для детекции носителей Citrullinemia рестриктазой Ava II. После рестрикции ставили горизонтальный электрофорез в 3%-ной агарозе и результаты электрофореза зафиксировали с помощью геледокументирующей системы. В таблице 1 показаны основные параметры амплификатов и продуктов рестрикции при генотипировании быков-производителей на - BLAD, CVM, DUMPS и Citrullinemia.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате проведенных экспериментов в течение 2012-2013 гг было протестировано всего быков-производителей АО «Асыл-Тулик» 68 голов и ТОО «Асыл» 43 головы на наличие генетических мутаций BLAD и CVM, 54 головы быков-производителей АО «Асыл-Тулик» на генетические дефекты DUMPS, Citrullinemia.

Важным этапом настоящей работы была оптимизация условий проведения полимеразной цепной реакции и способов выделения ДНК из спермы. Экспериментальным путем были установлены оптимальный состав ПЦР буфера и необходимая концентрация $MgCl_2$ для ПЦР диагностики BLAD. Успешно амплификация прошла при концентрации 1,5 mM $MgCl_2$, оптимальным был состав буфера 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl. При повышении концентрации $MgCl_2$ до 3-4 mM отмечается неспецифическая амплификация, а при снижении концентрации $MgCl_2$ наблюдается очень низкий сигнал.

При проведении ПДРФ-ПЦР анализа большое значение имеет качество используемой ДНК. Опыт работы показывает, что выход пригодной для амплификации ДНК обеспечивает выделение ДНК по методу Bahnak, где предусмотрено использование фенол-хлороформ-изоамилового спирта. Применение способа выделения ДНК с помощью набора «ДНК сорб В» позволяет генотипировать племенных животных методом ПЦР анализа, однако выход ДНК относительно низкий и составляет 60-70 %.

По результатам исследования 68 животных АО «Асыл-Тулик» и 43 головы ТОО «Асыл» имеют нормальный генотип по исследуемым локусам, BLAD и CVM. Отсутствие носителей генетических дефектов у племенных быков-производителей можно объяснить тем, что основная часть исследуемых животных, были местной Алатауской, Аулиекольской, Казахской белоголовой, Аулиеатинской пород, которые в своей родословной не имеют предков, носителей мутации. Быков-производителей зарубежной селекции проверены всего 52 головы, из них 27 животные были тестированы на наличие генетических дефектов BLAD и CVM. В настоящее время методом полимеразной реакции было проверено 54 головы на наличие точечной мутации DUMPS, Citrullinemia и результаты были отрицательные.

Выводы

Результаты исследований позволяют утверждать, что для мониторинга племенных животных наиболее доступным и точным способом является – метод полимеразной цепной реакции в сочетании с ПДРФ анализом. Установлено, что племенные быки-производители АО «Асыл-Тулик» и ТОО «Асыл» являются свободными от вредных генетических мутаций, BLAD, CVM, DUMPS и Citrullinemia.

Литература

1. Яковлев А.Ф., Прохоренко П.Н. Современные тенденции использования генетики в животноводстве // Вестник РАСХН. 1997. № 2. С. 56–59.
2. Марзанов Н.С., Ескин Г.В., Турбина И.С., Девришев Д.А., Тохов М.Х., Марзанова С.Н. Генодиагностика и распространение аллеля иммунодефицита, или BLAD синдрома, у черно-пестрой породы крупного рогатого скота. Москва 2013.
3. Meydan H, Mehmet Y, Agerholm J Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey ActaVeterinariaScandinavica 2010, 52:56
4. Agerholm JS: Inherited disorders in Danish cattle. APMIS 2007, 122 (Suppl).

5. Schwenger B, Tammen I, Aurich C: Detection of homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro. J ReprodFertil 1994, 100:511-514.
6. Bahnak B.R. A single and efficient vethod for isjlating high molecular weight DNA from mammalian sperm.// NAR. -1988
7. Grupe S, Diet G, Schwerin M: Population survey of citrullinemia on German Holsteins. livestockProdSci 1996, 45:35-38.

Усенбеков Е.С., Альпейсов Ш.А., Жансеркенова О.О., Касымбекова Ш.Н.

БҰҚАЛАРДА НҮКТЕЛІК МУТАЦИЯЛАРДЫ АНЫҚТАУ ҮШІН ПОЛИМЕРАЗДЫҚ ТІЗБЕК РЕАКЦИЯСЫН ПАЙДАЛАНУ

Авторлар асыл тұқымды бұқаларда аутосомальдық рецессивтік мутацияларды анықтау үшін полимераздық тізбек реакциясын пайдаланған. Аталған әдіс қысқа уақыттың ішінде генетикалық кемтарлықтары бар жануарларды анықтауға мүмкіндік береді. Тексерілген бұқалардың ішінде зиянды мутацияларды тасымалдаушы бұқалар табылмаған.

Кілт сөздер: полимераздық тізбек реакциясы, нүктелік мутация, амплификат рестрикциясы, аталық-бұқалар, электрофорез, BLAD, CVM, DUMPS, Citrullinemia.

Ussenbekov Y.S., Zhanserkenova O. O., Kasymbekova S.N., Alpeisov S.A.

APPLICATION THE POLYMERASE CHAIN REACTIONFOR DETECT POINT MUTATIONS IN BULLS

To determine the autosomal recessive lethal mutation breeding bulls has been used by the authors of the polymerase chain reaction in combination with RFLP analysis. This method allows for a short time to identify carriers of genetic defects. Obtained electropherograms of PCR products and restriction in BLAD and CVM. Among the studied group of animals carriers of harmful mutations have been identified.

Keywords: polymerase chain reaction, point mutation, restriction of PCR, bulls, electrophoresis, BLAD, CVM, DUMPS, Citrullinemia.