

Собранные данные позволяют характеризовать изученную популяцию симментальского скота, как исходную основу для формирования нового заводского типа крупного рогатого скота данной породы.

Библиографический список

1. Дмитриев, Н.Г. Современный пороодообразовательный процесс// Породное преобразование молочного скота – М.: Знание, 1990. – С. 26-32.
2. Бич, А.И. Селекционная работа с молочным и молочно-мясным скотом / А.И. Бич // Зоотехния. - № 6. - 2002. - С. 5-8.
3. Анисимова, Е.И. Конституционально-продуктивные особенности симментальского скота Поволжья: автореф. дис. канд. с.-х. наук./ - Саратов, 2000. – 21 с.
4. Барышникова, К.В. Симментальский скот Саратовской области и методы его совершенствования / К.В. Барышникова, Л.П. Ефименко// Саратов: Приволжское кн. изд-во. - 1991. - С. 12-15.
5. Кибалко, Л. Молочная продуктивность симменталов разных внутривидовых типов / Л. Кибалко, Н. Сидорова // Молочное и мясное скотоводство. - № 1. - 2003. - С. 26-27.
6. Корольков, В.И. О характере наследования внутри породных типов симментальского скота / В.И. Корольков, Н.В. Петрушин // Тр. ВИЖ. - XXXI. - М., 1968. - С. 106-109.
7. Сельцов, В.И. Создание симментальского скота нового улучшенного типа/ В.И. Сельцов // Зоотехния. - № 10. - 2002. - С. 5-9.

УДК 636.52/58:575.174

ДНК МАРКЕРЫ УСТОЙЧИВОСТИ К МАСТИТАМ У КОРОВ ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ И МЕТОДЫ ИХ ИДЕНТИФИКАЦИИ

*Муслимова Жадыра Умирбеккызы, PhD докторант 2 курса кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства», НАО «КазНАИУ
Ерназарова Сандугаи Туkenовна, старший преподаватель кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства», НАО «КазНАИУ
Усенбеков Есенгали Серикович, заведующий кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства», НАО «КазНАИУ»*

Аннотация. Авторами работы проведен поиск ДНК маркеров, резистентности к маститам у коров голштинской породы ТОО «Байсерке-Агро» Алматинской области. Изучен SNP полиморфизм по локусам генов *MASP2* и *CATHL2*, однако по локусу *CATHL2* не выявлен генетический полиморфизм. Также, исследованиями установлен низкий уровень генетического полиморфизма по локусу гена *MASP2* и отсутствие полиморфизма в кодирующей части гена *CATHL2* у исследуемой группы животных.

Ключевые слова: маститы коров, резистентность к маститам, ПЦР-ПДРФ анализ, гены *MASP2*, *CATHL2*, генотипирование, рестриктаза.

Мастит - это воспаление молочной железы, который наносит большой экономический ущерб молочной промышленности. В настоящее время многие исследователи во всем мире пытаются определить методы профилактики и снижения заболеваемости маститом на молочных фермах. Известно, что некоторые коровы более устойчивы к маститу и восприимчивость к этому заболеванию определяется генетическими факторами. Идентификация таких ДНК маркеров может привести к выбору резистентных к маститу коров, что приведет к улучшению здоровья стада. Многочисленные исследования показали важность хемокинов и рецепторов хемокина при воспалительных заболеваниях, например α рецептор интерлейкина-8 (CXCR1) был предложен как кандидат ДНК маркера устойчивости к маститам у коров.

Учеными анализ полиморфизма по локусу гена CXCR1 проводился с помощью ПЦР-ПДРФ анализа по следующим SNP полиморфизмам: с.+291С>Т, с.+365Т>С, с.+816С>А, с.+819G>А, +1093С>Т, and +1373С>А, четыре из которых были расположены в кодирующей области гена, а два - 3' фланкирующей части гена CXCR1. Генетический материал от 146 коров голштино-фризской породы был проанализирован после разделения на две группы в зависимости от частоты клинического мастита. По результатам ПЦР-ПДРФ анализа были выявлены три гаплотипа (СССАТА, ТТАGСС, СТCGСС), образующие шесть комбинаций гаплотипов. По мнению авторов регрессионный анализ показывает, что существует значительная связь между генотипом СС при с. + 365Т> С и восприимчивостью коров к клиническому маститу с достоверностью $P= 0,047$. Частота комбинации гаплотипов СССАТА/СССАТА была значительно высокой у коров, подверженных маститу с достоверностью $P= 0,062$ [1].

Известно, аллели гена CATHL2 оказывают ассоциативное влияние на содержание соматических клеток в молоке, что в свою очередь связана с заболеваемостью субклиническим маститом у коров. опыты проводились на коровах голштино-фризской породы и для идентификации генотипов использовались АCRS и PCR-RFLP методы. Согласно результатам проведенных экспериментов частота генетических вариантов по локусу гена CATHL2, SNP 807G> А была: GG - 0,636, GA - 0,323 и AA - 0,041. Установлено достоверное влияние аллелей гена CATHL2 на содержание соматических клеток в молоке коров, что является важным показателем резистентности коров к маститам. Для идентификации аллелей гена CATHL2 были подобраны праймеры прямые F -5`-GAGCTAGACCCTACACCCATT-3` и обратные R -5`- AGGCTCACCCCATTTCTCCTTGAA-3`, продукт амплификации с длиной 253 п.н. подвергали расщеплению с помощью эндонуклеазы MseI с сайтом узнавания T/ТАА [2].

Также, в настоящее время известны SNP полиморфизмы, ассоциированные с восприимчивостью к маститам, инфекционным заболеваниям, резистентностью к клиническим и субклиническим формам маститов. Одним из них является

локус гена MASP2, связанный с маннозой лектин сериновая протеаза 2, ген MASP2 (Mannose-binding lectin-associated serine protease 2, MASP2) является центральным функциональным ферментом в системе комплемента. Учеными хорошо изучены 3 новых SNP полиморфизма, а именно g.14047A> C, g.14248T> C и g.14391C> T в составе гена MASP2. Так, SNP g.14047 A>C (GAA (Glu)> GAC (Asp)) в положении 608 MASP2 коррелировал с уровнем комплемента CH50 [3]. Таким образом, поиск ДНК маркеров устойчивости к маститам и выявление животных с желательным комплексным генотипом является актуальной проблемой особенно для молочного скотоводства.

Целью настоящей работы была оптимизация методов генотипирования коров голштинской породы племенного хозяйства ТОО «Байсерке-Агро» по локусам генов MASP2 и CATHL2.

Материалы и методы исследования. Генотипирование коров голштинской породы в количестве 200 голов по локусу гена MASP2 SNP полиморфизм g.14248T>C ТОО «Байсерке-Агро» проводилось методом ПЦР-ПДРФ анализа в лаборатории «Зеленой биотехнологии и клеточной инженерии» Казахстанско-Японского инновационного центра НАО «КазНАИУ». Фрагмент гена MASP2 амплифицировали с помощью праймеров прямого F -5'- GTTTGTGGGAGGAATAGTGTC-3' и обратного R -5'- AGTTAAGTAGTGGAAGAGTGGC-3'. Условия проведения ПЦР для гена MASP2 были: первоначальная денатурация 95°C – 5 мин, количество циклов - 30, денатурация 95°C – 30 сек. отжиг праймеров 60°C – 30 сек, элонгация 72°C – 30 сек, завершающий синтез 72°C – 8 мин. Идентификация аллелей осуществлялась с помощью эндонуклеазы FOK1 с сайтом узнавания – GGATG(N)₉, температура инкубации при 37 °C – 2 часа, при 65°C – 20 мин. В зависимости от генотипа животных, после рестрикции эндонуклеазой FOK1 образуются фрагменты: TT/CC:305 п.н., TC/CT:305 п.н., 230 п.н., 143 п.н. и 74 п.н.

Генотипирование образцов ДНК по локусу гена CATHL2 проводилось с помощью праймеров: прямого F -5'- GAGCTAGACCCCTACACCCATT-3' и обратного R -5'- AGGCTCACCCCATTTCTCCTTGAA -3', длина амплификата 253 п.н. Для детекции аллелей гена CATHL2 используется рестриктаза MseI (Thermo Scientific) с сайтом узнавания: T/TAА. У гомозиготных животных после рестрикции эндонуклеазой MseI образуется фрагмент – 253 п.н. (генотип GG), у гетерозиготных образуются фрагменты: 253 п.н, 233 п.н. и 20 п.н. (генотип GA) и у гомозиготных 233 п.н. и 20 п.н. (генотип AA). Условия проведения амплификации гена CATHL2 были: первоначальная денатурация 95°C – 5 мин, количество циклов -30, денатурация 94°C – 30 сек. отжиг праймеров 51°C – 45 сек, элонгация 72°C – 30 сек, завершающий синтез 72°C – 8 мин. Рестрикцию ПЦР продукта проводили при температуре 37 °C в течение 3-4 часов.

Результаты исследования. Результаты амплификации проверяли в 3% агарозном геле, окрашенным бромистым этидий. На электрофореграмме хорошо видны ПЦР продукт размером 304 п.н. (рис 1), амплификация прошла успешно во всех образцах и на электрофореграмме не видны остатки

праймеров, что свидетельствует об оптимальных условиях проведения амплификации фрагмента гена MASP2. Нами определены генотипы 87 коров голштинской породы ТОО «Байсерке-Агро», однако только в одном случае мы обнаружили на электрофореграмме фрагменты: 304 п.н., 230 п.н. и 74 п.н., что соответствует гетерозиготному генотипу (рис 2).

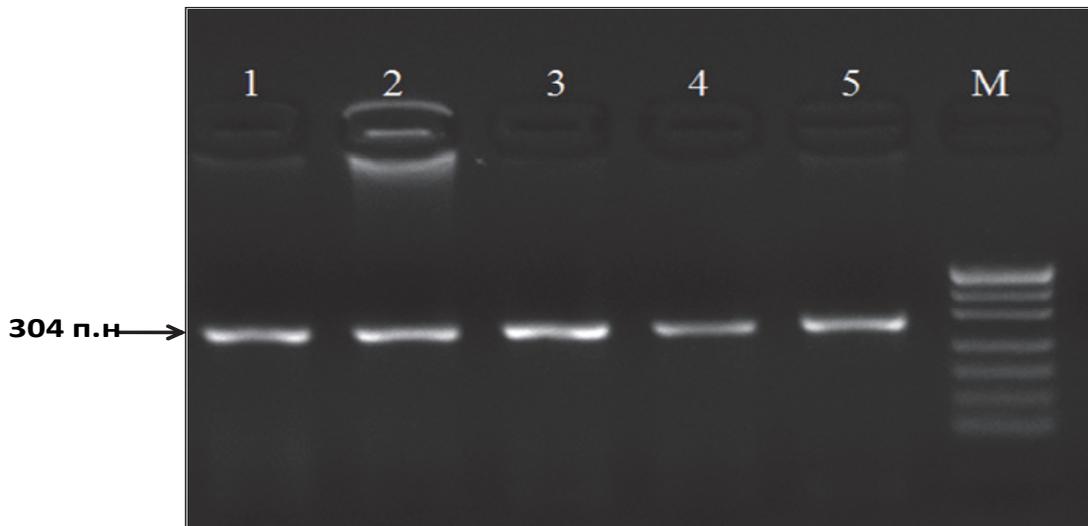


Рис. 1. Лунки 1-5 амплификат гена MASP2 размером 304 п.н., М- ДНК маркер рUC19/MspI.

Полученные результаты генотипирования образцов ДНК по локусу показывают, что по данному генетическому локусу MASP2 у исследуемой популяции выявлено отсутствие генетического полиморфизма.

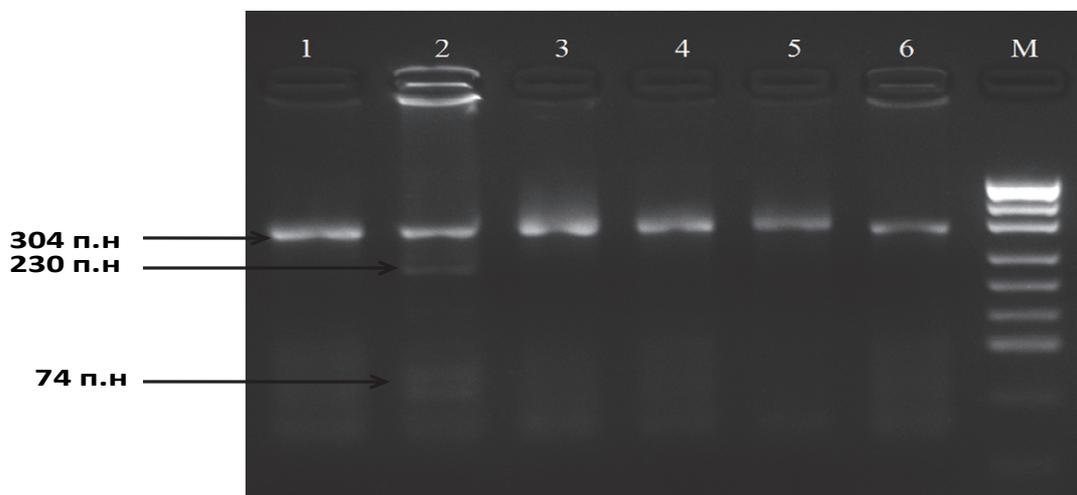


Рис. 2. Лунки 1-6 амплификат фрагмента гена MASP2, рестрицированная эндонуклеазой FOK1, фрагменты после рестрикции 304 п.н., 230 п.н. и 74 п.н., М- ДНК маркер рUC19/MspI.

В наших экспериментах успешно прошла амплификации участка гена SATNL2, на электрофореграмме хорошо видно ПЦР продукт, размером 253 п.н. (рис 3).

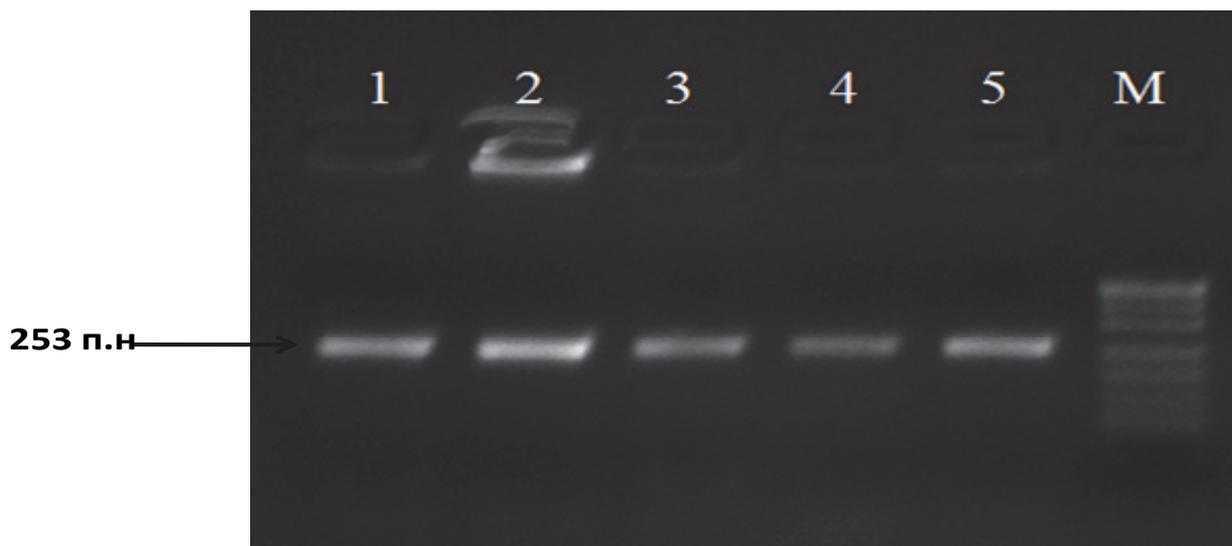


Рис. 3. Лунки 1-5 амплификат гена CATHL2, длина 253 п.н., М- ДНК маркер рUC19/MspI.

Однако, анализ последовательности гена CATHL2 свидетельствует, что амплифицируемый фрагмент гена не имеет сайта рестрикции эндонуклеазы MspI (Т/ТАА). Зарубежными авторами [2], для идентификации аллелей гена CATHL2 была введена замена одного нуклеотида в составе прямого праймера GAGCTAGACCCTACACCCA[A→T]T, благодаря этой замене появляется сайт рестрикции для эндонуклеазы MspI. По нашим данным в последовательности гена CATHL2 (последний нуклеотид прямого праймера) следующий нуклеотид G, таким образом данный фрагмент гена не имеет сайта рестрикции для эндонуклеазы MspI (Т/ТАА).

5'- **gagctagaccctacaccaat**gatgtgagttatgaagggatctgggcagggggccagctagttggggggcaggggagacagatcagaggaagaagaatgagcccaatccagttcccctactttgaccatgaccaggacttgaccagggcaccagaaagcctgtgagcttcagggtgaaggagaccgattgcccaggacaagccagcagcccctggagcagtggtgac**ttcaaggagaatggggtgagcct**-3'.

Имеющиеся в литературе информация [2], что у особей с гетерозиготным генотипом образуются фрагменты с длиной 253 п.н., 233 п.н. и 20 п.н. считаем недостоверной. Нами проведена рестрикция полученного фрагмента гена CATHL2 рестриктазой, однако получили только один фрагмент 253 п.н., что свидетельствует об отсутствии сайта рестрикции для рестриктазы MspI, соответственно отсутствует SNP полиморфизм в составе данного гена.

Выводы. Отбор животных, устойчивых к инфекционным заболеваниям, в том числе к маститам является актуальной проблемой ветеринарной науки. Нами изучен SNP полиморфизм в составе генов MASP2 и CATHL2, однако по обоим локусам не выявлен генетический полиморфизм. В первом случае, локус гена MASP2 имеет очень низкий уровень генетического полиморфизма, протестированы 87 образцов ДНК, только у одного животного был выявлен

гетерозиготный генотип TC/CT:305 п.н., 230 п.н. и 74 п.н., все остальные особи имели гомозиготный генотип TT/CC:305 п.н. Нами по локусу гена CATHL2 у исследуемой популяции доказано отсутствие SNP полиморфизма, проведенный дополнительный анализ последовательности гена CATHL2 подтверждает наше предположение.

Библиографический список

1. Pokorska J., Dusza M., Kułaj D., Żukowski K. and Makulska J. Single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and its association with clinical mastitis incidence in Polish Holstein-Friesian cows. Genetics and Molecular Research 15 (2): gmr.15027247 Published April 27, 2016
2. Hiller S., Kowalewska-Łuczak I., and Czerniawska-Piątkowska E. Associations between CATHL2 Gene Polymorphism and Milk Production Traits and Somatic Cells Count in Dairy Cattle. ISSN 1022-7954, Russian Journal of Genetics, 2020, Vol. 56, No. 3, pp. 383–386.
3. Haiyan Zhang, Yan Wei, Fengying Zhang, Yanyan Liu, Yan Li, Ge Li, Bing Han, Haifeng Wang, Weitao Zhao & Changfa Wang. Polymorphisms of MASP2 gene and its relationship with mastitis and milk production in Chinese Holstein cattle. BIOTECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGICAL EQUIPMENT

УДК: 636.018: 636.4: 575.162

ПРЕИМУЩЕСТВО ПРИМЕНЕНИЯ T-ARMS-PCR РЕАКЦИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ СКРЫТЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

***Бименова Жанат Жолшыбайкызы**, ассоциированный профессор кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства», НАО «КазНАИУ»*

***Махмутов Абзал Касенович**, ассоциированный профессор кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства», НАО «КазНАИУ»*

***Аубекерова Лаура Сатаевна**, научный сотрудник Департамента науки», НАО «КазНАИУ»*

***Шманов Габдолла Сагинтаевич**, заместитель директора по животноводству ТОО «Асыл Логистикс», Северо-Казахстанская область*

***Усенбеков Есенгали Серикович**, заведующий кафедры «Акушерства, хирургии и биотехнологии воспроизводства», НАО «КазНАИУ»*

***Аннотация.** Авторами статьи установлена эффективность применения программы Primer 1 для подбора последовательностей прямого и обратного праймеров (внешних и внутренних) для T-ARMS-PCR реакции. Генотипирование образцов ДНК проведено двумя способами: ПЦР-ПДРФ анализа и с помощью T-ARMS-PCR реакции. Экспериментальным путем определена оптимальная температура отжига праймеров, которая составляет 59°C -60 °C для T-ARMS-PCR реакции (ген APAF1). По предварительным результатам*