

14. Aboneev, V. V. Ob utonenii shersti tonkorunnyh ovec i nekotoryh drugih problemah ovcevodstva // V. V. Aboneev, Ju. A. Kolosov, A. S. Fi-latov // Ovcy, kozy, sherstjanoe delo. – 2014. – №3. – S. 34-36.
15. Bajmishev, M. H. Skorost' rosta baranchikov akzhaikskoj mjaso-sherstnoj porody v zavisimosti ot linejnoy prinadlzhenosti / M. H. Bajmishev, H. B. Bajmishev, K. G. Esengaliev // Sovremennye napravlenija razvitija nauki v zhivotnovodstve i veterinarnoj medicine: Materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii. – Tju-men', 2021. – S. 21-26.
16. Bajmishev, H. B. Kachestvennye pokazateli shersti krossbrednyh jarok akzhaikskoj mjaso-sherstnoj porody v zavisimosti ot podbora rodi-tel'skih par/H.B. Bajmishev, B. B. Traisov, M. I. Selionova, L. N. Skoryh // Izvestija Samarskoj GSHA. – 2016. – №2. – S. 78-82.
17. Marinchenko T.E . Ways of Increasing the Efficiency of Sheep Breeding in the Russian Federation. International Scientific and Practical Conference on Development of the Agro-Industrial Complex in the Context of Robotization and Digitalization of Production in Russia and Abroad, DAICRA 2021. Yekaterinburg15 October 2021 do 16 October 2021. DOI 10.1088/1755-1315/949/1/012096.
18. Sejitpan, K.M. Mjasnaja produktivnost' baranchikov mjasnoj skorospel'noj linij ovec kazahskoj tonkorunnoj porody TOO «Bajserke-Agro». / K.M. Sejitpan, A.A. Esenbaev // Nauka i obrazovanie. – 2020. №3-1. S.118-123.
19. Iskakov, K., Productive and Biological Features of Kazach Fine-Wool Sheep in the Conditions of the Almaty Region / K.Iskakov, B. Kulataev, G. Zhumagaliyeva, Pere Casanova.// Online Journal of Biological Science. - 2017. - Vol.17. - Iss. 3. - P.-219-255.
20. Rajendran, D. Application of encapsulated nano materials as feed additive in livestock and poultry: a review / D. Rajendran, P.B. Ezhuthupurakkal, Lakshman R. and others.// Veterinary Research Communications. – 2022. - 46(2). – R. -315-328

ТҮЙІН

Мақалада ақжайық етті-жүнді қойларының жүн өнімділігін зерттеудің нәтижелері келтірілген: бірінші топ - БАЛИ -1395 желісі бойынша - ірі салмақты мал; екіншісі - БАК-4087 ұзын жүнді селекциялық желісі; үшінші мал тобы – аталық ізден тарамаған топ.

Желілі жануарлар одан әрі жетілдіру үшін ең құнды асыл тұқымды материал болып табылады. Қырқылған жүн өнімділігі бойынша желілі ұрғашы тоқтылары қатарластарынан шамалы мөлшерде асып түсті.

Ең жіңішке жүн талшықтары бойынша БАЛИ-1395 желісі жануарлары ие болды, бұл көрсеткіш бойынша БАК-4087 желісі қатарластарынан 1,45 мкм немесе 5,3% төмен болды. БАЛИ-1395 желісі тобының мен аталық ізден тарамаған тобы арасындағы жүн талшығы жуандылығы айырмашылығы 0,52 мкм немесе 1,9%, сәйкесінше БАК-4087 тобы бойынша 0,93 мкм немесе 3,3% құрады. Барлық ұрғашы тоқтылардың жүн талшығы жуандылығы 58-50 сапада болды және басқа топтардың қойларына қарағанда жіңішке келді.

Табиғи жағдайдағы жүн ұзындығы бойынша ұрғашы тоқтылардың жүндерінің ұзындығы 13,0-15,9 см деңгейінде болды, БАК-4087 желісінің тоқтыларының кішкене артықшылығы байқалды.

Жүндегі майдың құрылымы бойынша желілі ұрғашы тоқтылардың, аталық ізден тарамаған топқа қарағанда басым болды.

ӨОЖ: 619:618.19-002:579.252.55:636.234.1
 ФТАХР:68.41.59; 68.39.13; 68.39.29; 34.23.37

Кужебаева У. Ж., ветеринария ғылымдарының магистрі, **негізгі автор**, <https://orcid.org/0000-0002-7887-3376>

«Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті»КеАҚ, Орал қ, Жәңгір хан 51, көшесі, 090009, Қазақстан, usya_999@mail.ru,

Бейшова И. С., биология ғылымдарының докторы, <https://orcid.org/0000-0001-5293-2190>

«Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті»КеАҚ, Орал қ, Жәңгір хан көш., 51, 090009, Қазақстан, indira_bei@mail.ru

Ульянова Т. В., PhD докторы, <https://orcid.org/0000-0002-4814-2601>

«Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті»КеАҚ, Орал қ, Жәңгір хан 51 көш., 090009, Қазақстан, only.you1993@mail.ru

Ульянов В. А., PhD докторы, <https://orcid.org/0000-0002-7500>

«Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті»КеАҚ, Орал қ, Жәңгір хан көш., 51, 090009, Қазақстан, vadimkst@mail.ru

Ковальчук А. М., биология ғылымдарының кандидаты, <https://orcid.org/0000-0002-4106-4954>

«Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті»КеАҚ, Орал қ, Жәңгір хан көш., 51, 090009, Қазақстан, kovalchuk_s89@mail.ru

Агишева Э. Р., 5-ші курс студенті, <https://orcid.org/0000-0002-9350-6283>

«Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті»КеАҚ, Орал қ, Жәңгір хан 51 көшесі, 090009, Қазақстан, agisevaelvira70@gmail.com

Kuzhebayeva U. Zh., Master of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-7887-3376>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, usya_999@mail.ru,

Beishova I. S., Doctor of Biological Sciences, <https://orcid.org/0000-0001-5293-2190>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, indira_bei@mail.ru

Ulyanova T. V., PhD, <https://orcid.org/0000-0002-4814-2601>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, only.you1993@mail.ru

Ulyanov V. A., PhD, <https://orcid.org/0000-0002-7500>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, vadimkst@mail.ru

Kovalchuk A. M., Candidate of Biological Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-4106-4954>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, kovalchuk_s89@mail.ru

Agisheva E. R., 5th year student, <https://orcid.org/0000-0002-9350-6283>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, agisevaelvira70@gmail.com

БЕТА-ЛАКТОГЛОБУЛИН ГЕНІ БОЙЫНША ПТР-ПДРФ ӘДІСІМЕН МАСТИТПЕН АУЫРАТЫН СИЫРЛАРДЫ ГЕНОТИПТЕУ ПРОЦЕСІН ОҢТАЙЛАНДЫРУ OPTIMIZATION OF THE PROCESS OF GENOTYPING COWS WITH MASTITIS BY THE PCR-PDRF METHOD ON THE BETA-LACTOGLOBULIN GENE

Аннотация

Мастит - бұл тіндердегі және сүт безінің секрециясындағы патологиялық өзгерістермен сипатталатын қауіпті желін ауруы. Маститтің этиологиясы, олардың берілу және емдеу механизмдері туралы көптеген жылдар бойы жүргізілген зерттеулер сиырлардың сүт безінің ауруы көптеген сыртқы және генетикалық факторларға байланысты екенін анықтады. Соңғы онжылдықтардағы әлемдік ғылыми зерттеулер маститке қарсы шаралар жүйесінде патогеннің ДНҚ-ның белгілі бір бөлігін анықтауға ғана емес, сонымен қатар ауруға генетикалық төзімділіктің маркерлерін іздеуге, сондай-ақ олардың полиморфизмінің байланысын зерттеуге негізделген ДНҚ диагностикасы әдісі маңызды орын алуы керек екенін көрсетеді. Біз бұл мақалада ПТР реакция қоспасының компоненттік құрамын таңдау және оңтайландыру нәтижелерін келтірдік. Зерттеу нәтижелері бойынша біз реакция қоспасы мен праймерлердің оңтайлы концентрациясын таңдадық: 10хБуфер – 2,5 мкл; MgCl₂ (25 mM) – 2 мкл; dNTP (25 mM) – 0,2 мкл; праймер F (10 pM) – 1 мкл; праймер R (10 pM) – 1 мкл; Таq-полимераза – 0,25 мкл; ДНҚ – 1 мкл; H₂O – 25 мкл дейін. Амплификация бағдарламасына мыналар кірді: денатурация 94°C – 5 мин, 35 цикл, денатурация 94°C – 30 сек, күйдіру 60°C – 30 сек, элонгация 72°C – 30 сек, пост-репликация 72°C – 1 мин, сақтау 4°C. ПТР-ПДРФ жүргізу арқылы біз келесі

генотиптерді алдық: BLG^{AA} – ұзындығы 148/99 н.ж.; BLG^{AB} – ұзындығы 148/99/74 н.ж.; BLG^{BB} – ұзындығы 99/74 н.ж. Осылайша, біз таңдаған ПТР және ПТР-ПДРФ реакциялық қоспасының компоненттік құрамы, сондай-ақ амплификацияның температуралық-уақыттық режимі амплификацияланатын нуклеин қышқылы мен рестрикт өнімінің қажетті мөлшерін жасау үшін оңтайлы болып табылады.

ANNOTATION

Mastitis is a dangerous disease of the udder, characterized by pathological changes in the tissues and in the secretion of the mammary gland. Long-term studies of the etiology of mastitis, the mechanisms of their transmission and treatment have established that this disease of the mammary gland of cows is caused by many external and genetic factors. World scientific research over the past decades shows that in the system of measures to combat mastitis, an important place should be occupied by the method of DNA diagnostics, based not only on identifying a specific DNA site of the pathogen, but also on finding markers of genetic resistance to the disease, as well as studying the relationship of their polymorphism. We present the results of the selection and optimization of the component composition of the reaction mixture. Based on the results of our studies, we selected the optimal concentration of the reaction mixture and primers as follows: 10xBuffer – 2.5 μ l; $MgCl_2$ (25 mM) – 2 μ l; dNTP (25 mM) – 0.2 μ l; primer F (10 pM) – 1 μ l; primer R (10 pM) – 1 μ l; Taq polymerase – 0.25 μ l; DNA – 1 μ l; H_2O – up to 25 μ l. The amplification program included: pre-denaturation 94°C – 5 min, 35 cycles, denaturation 94°C – 30 sec, annealing 60°C – 30 sec, elongation 72°C – 30 sec, post-replication 72°C – 1 min, storage - 4°C. As a result of PCR-PDRF, we obtained the following genotypes: BLG^{AA} – length 148/99 bp; BLG^{AB} – length 148/99/74 bp; BLG^{BB} – length 99/74 bp. Thus, the component composition of the reaction mixture of PCR and PCR-PDRF selected by us, as well as the temperature-time mode of amplification, is optimal for the production of the required amount of amplified nucleic acid and the restriction product.

Түйін сөздер: мастит, ПТР, бета-лактоглобулин, ПТР-ПДРФ, праймерлер, амплификация.

Keywords: mastitis, PCR, beta-lactoglobulin, PTR-PDRF, primers, amplification.

Кіріспе. Сүт шаруашылығын қарқындалту ҚР-дағы агроөнеркәсіптік кешенді дамытудың 2021-2025 жылдарға арналған ұлттық жобасы тұжырымдамасының басым міндеттерінің бірі болып табылады. Интенсификация процесі сүт өндірісін ұйымдастыруға және дамытуға бағытталған көптеген іс-шараларды қамтиды. Осы іс-шаралардың ішінде маститтің алдын-алу, ең көп таралған желін ауруы ретінде үлкен маңызға ие. Сиырлардың маститіне байланысты сүт өндірудегі экономикалық шығындардың негізгі үлесінің бірі болып табылады [1].

Бұл ауру сүт өнімділігін төмендету, сиырларды шаруашылық пайдалану мерзімін қысқарту және сүт пен сүт өнімдерінің санитарлық-технологиялық сапасын төмендету есебінен мал шаруашылығына үлкен шығын әкеледі [2].

Көбінесе жоғары өнімді сиырлар маститпен ауырады. Ауру кезеңінде және клиникалық қалпына келгеннен кейін бір сиырға сүт жоғалту шығыны жылдық сүттің көлемінен орта есеппен 10-15% құрайды. Жануарлардың бір бөлігінде сүт өнімділігін қалпына келтіру сүт безіндегі қайтымсыз процестерге байланысты мүмкін болмайды, себебі мастит жануарлардың мерзімінен бұрын жойылуына және олардың өнімді пайдалануының төмендеуіне алып келеді [3].

Кейбір табындардағы ауру 35-60%-ға жетеді және бір жыл ішінде табындағы сиырлардың 60-75%-на дейін әсер етуі мүмкін. Кейбір жағдайларда маститтен болатын өлім-жітім басқа аурулардан болатын өлім-жітімнен асып түседі. Ауру кезеңінде және клиникалық сауығудан кейін сиырға сүттің табиғи азаюы орташа есеппен жылдық сүттің 10-15% құрайды [4,5].

Сонымен қатар, маститпен залалданған сүтті тұтыну адамдарға зиянды болуы мүмкін, өйткені микробқа төзімді қоздырғыштар ластанған пастерленбеген сүтпен беріледі, сондықтан бұл маңызды мәселе және қоғамдық денсаулыққа қауіп төндіреді [6].

Сүтті малдың денсаулығын басқарудың құрамдас бөлігі ретінде қазіргі таңда генетикалық жетілдіру стратегияларын қолдануға қызығушылық артып келеді. Денсаулық белгілері туралы ақпаратты қамтитын асылдандыру стратегиялары жануарлардың әл-ауқатын

және сүт өндірісінің жалпы тиімділігін жақсартта алады [7]. Сүтті мал шаруашылығында іздеу жұмыстары гендердің полиморфизмін анықтауға және сиырлардың сүті мен сүт сапасымен байланысты қажетті генотиптерді анықтауға бағытталған [8,9].

Қазіргі уақытта молекулярлық-генетикалық маркерлері бар селекциялық әдістер жүйесі асылдандыру жұмысының тиімділігін арттыруға, экономикалық пайданы ұлғайтуға және өндірісті қарқындатуға мүмкіндік беретін басты бағыт болып табылады. Ірі қара мал өсірудегі ең өзекті бағыт генетикалық маркерлердің экономикалық пайдалы белгілері мен ауруларға төзімділігімен байланысын зерттеу болып табылады. Себебі жеке сиырлар арасында айтарлықтай генетикалық айырмашылықтар бар екені анықталған. Сондықтан маститке деген тұрақтылықты табынның денсаулығы мен әл-ауқатын ұзаққа дейін жақсарту үшін өндірушілерді таңдап жетілдіруге болады [10, 11].

Өлемнің көптеген елдерінің ғалымдарының көп жылдық тәжірибесі сиырлардың мастит ауруын тудыратын көптеген себептердің арасында олардың осы ауруға генетикалық бейімділігі екенін көрсетті. Қазіргі уақытта көптеген гендердің полиморфты нұсқаларының маститке төзімділігімен тығыз байланысы бар, солардың бірі бета-лактоглобулин (*BLG*) гені болып табылады [12-14]. Пазовникова М.В. бірлескен авторлармен атап өткендей, бета-лактоглобулин гені сүт ақуызына әсер етеді [15]. Ғылыми әдебиеттерде сүт ақуыздарының гендерін, соның ішінде *BLG*-ді маститке төзімділіктің әлеуетті маркерлері ретінде қарастыруға болатындығы туралы есептер бар.

Ірі қара малының *BLG* локусы 11-ші хромосомада орналасқан, транскрипция бірлігі 4662 н.ж., 7 экзон мен 6 интроннан тұрады. *BLG* сүт ақуызына және сүттің биологиялық құндылық көрсеткішіне жауап береді. Ірі қара мал тұқымдарының көпшілігінде жиі кездесетін В және А нұсқалары екі аминқышқылын алмастырумен ерекшеленеді (геннің 4-ші экзонндағы нүктелік алмастырулардың нәтижесі) - 64-позицияда (сәйкесінше глицин және аспартат) және 118 (аланин және валин) [16-17]. Қазіргі уақытта *BLG* генінің 10 генетикалық анықталған аллельдік нұсқалары белгілі: А, В, С, D, E, F, G, I, J, W [18]. Олардың ішінде аминқышқылдарының құрамымен бір - бірінен ерекшеленетін 4 аллель - А, В, С, D жиі кездеседі. *BLG* генетикалық нұсқалары сүттегі май мен ақуыздың массалық үлесіне, ақуыз фракцияларының арақатынасына және сүттің технологиялық қасиеттеріне әсер етеді. ВВ генотипі сүттегі май мен казеин ақуыздарының жоғары мөлшерімен сипатталады. АА генотипі сиырлардың жоғары сүттілігіне және сүт құрамында сарысу ақуыздарының болуына жауап береді [19]. Бұл ақуыз биологиялық белсенді пептидтердің маңызды көзі екені белгілі. Пептидтер өз кезегінде иммуномодуляциялық қасиеттерге, микробқа қарсы, гипертензияға қарсы және т. б. сияқты физиологиялық белсенділіктің кең спектріне ие [20].

Жоғарыда айтылғандарға байланысты маститке төзімді сиырлардың генетикалық таңдауы болашақта маститтің алдын алудың маңызды баламасы болуы мүмкін [21].

Бұл мақалада біз ПТР реакциялық қоспасының компоненттік құрамын оңтайландыруды және бета-лактоглобулин генін амплификациялаудың температуралық-уақыттық режимін, сондай-ақ *BLG* генінің полиморфты бөлігі *BsuRI* (*HaeIII*) - шектеудің (рестрикция) ПТР-ПДРФ оңтайлы режимін қарастырамыз.

Зерттеу материалдары мен тәсілдері. Ауру жануарларды диагностикалау және молекулалық-генетикалық зерттеулер, сондай-ақ алынған нәтижелерді өңдеу Жәңгір хан атындағы БҚАТУ Сынау орталығының биотехнология және жұқпалы ауруларды диагностикалау зертханасының базасында жүргізілді.

Зерттеу нысаны Қостанай облысының шаруашылықтарынан мастит (м) диагнозы расталған 158 бас голштейн тұқымынан тұратын ірі қара мал, сондай-ақ 97 бас сау (з) голштейн тұқымынан тұратын эксперименттік топ болды. Зерттеуге арналған материал қыл талшықтары болды. Қыл талшықтары Жәңгір хан атындағы БҚАТУ Сынау орталығының биотехнология және жұқпалы ауруларды диагностикалау зертханасының биоматериалдар банкінен, айқын көрінетін қыл талшықтары бар кемінде 15-20 қылдардан алынды. Қыл талшықтарынан ДНҚ-ны оқшаулау "ДНҚ Экстран-2" коммерциялық жиынтығымен жүзеге асырылды ("Синтол" ЖШС, Мәскеу). Оқшауланған ДНҚ-ны сапалы талдау гельдік электрофорез әдісімен жүргізілді, ДНҚ жақсы сапамен сипатталды, өйткені электрофореграммада спецификалық емес фрагменттер болмады. Сандық талдау Agilent Cary 60 спектрофотометріндегі (Agilent Technologies, Inc,

АҚШ) ДНҚ концентрациясын өлшеу арқылы жүргізілді. ДНҚ-ның орташа концентрациясы 80 ng/ul болды. A260/A280 қатынасы 1,9 құрады.

ПТР жүргізу үшін біз келесі праймер жұбын қолдандық:

BLG 1: 5' TGTGCTGGACACCGACTACAAAAAG 3'

BLG 2: 5' GCTCCCGGTATATGACCACCTCT 3' [22].

ПТР 25 мкл реакция қоспасының көлемінде жүргізілді: 10xБуфер - 2 мкл; MgCl₂ (25 mM) - 2 мкл; dNTP (25 mM) - 0,4 мкл; праймер F (10 пМ) - 1 мкл; праймер R (10 пМ) - 1 мкл; Taq - полимераза - 0,3 мкл; ДНҚ - 1 мкл; H₂O - 25 мкл дейін.

ПТР өнімінің жиналуы 1-кестеде келтірілген бастапқы амплификация режиміне сәйкес ProFlex PCR System амплификаторында (Applied Biosystems, АҚШ) жүргізілді. ДНҚ амплификациясының режимі: пре-денатурация 95°C - 10 мин, 40 цикл, денатурация 94°C - 30 сек, күйдіру 59°C - 60 сек, элонгация 72°C - 30 сек, пост-репликация 72°C - 1 мин, сақтау 4°C.

Электрофорез көлденең электрофорезге арналған Wide Mini-Sub Gell Gt деп аталатын камерада 110 V кернеуде, 400 mA ток күшінде 1 сағат уақыт бойы жүргізілді. Электрофорез үшін 10xTBE-буферінде 2% агароза ерітіндісі қолданылды. Алынған нәтижелерді құжаттау SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) бояуын қолдана отырып, UV transilluminator (Bio rad) гель құжаттау жүйесі көмегімен жүргізілді. Молекулярлық массалардың маркері ретінде «Thermoscientific» фирмасының O,RangeRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use қолданылды.

ПТР-ПДРФ жүргізу үшін 1 сынамаға рестрикт қоспаларын дайындау үшін келесі компоненттер пайдаланылды: H₂O - 2 мкл, 10xBufferR(withBSA) - 2,5 мкл, рестриктаза *BsuRI* (*HaeIII*) - 0,5 мкл. Қоспаның көлемі әр үлгіге 5 мкл, амплификат көлемі - 20 мкл. Рестрикция режимі 37°C температурада 16 сағатты құрайды. Геннің рестрикция өнімін көлденең электрофорезге арналған WideMini-SubGellGt деп аталатын электрофорез камерасында 90 V кернеуде, 400 mA ток күшінде 2 сағат 15 минут уақыт аралығында электрофоретикалық түрде бөліп алдық.

Зерттеу нәтижелері мен талқылаулар. ПТР-дің ерекшелігі, сезімталдығы және амплификацияланатын нуклеин қышқылының мөлшері реакция қоспасының дұрыс таңдалған компоненттеріне және таңдалған ПТР температуралық-уақыттық режиміне байланысты болады.

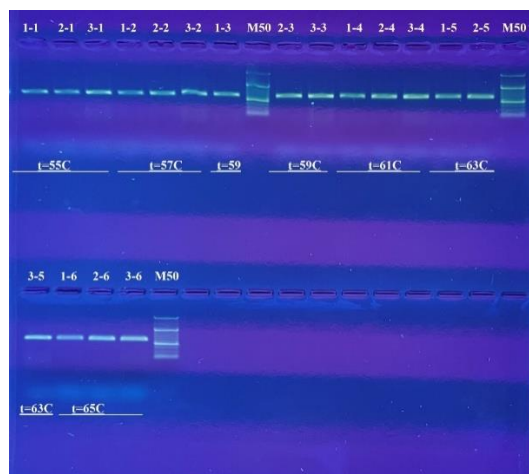
Біз жүргізген зерттеулердің нәтижелері бойынша реакция қоспасының компоненттік құрамын өзгерту кезінде амплификацияланатын нуклеин қышқылының жеткілікті мөлшерін жасау үшін келесі оңтайлы жағдайлар таңдалды (1-кесте).

Кесте 1 - Реакция қоспасының құрамы

Реагенттер	1 реакцию үшін көлемі, мкл
10xБуфер	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTP (25 mM)	0,2
Праймер 1 (F) (10 пМ)	1
Праймер 2 (R) (10 пМ)	1
Taq-полимераза	0,25
ДНҚ	1
H ₂ O	25 мкл-ге дейін

ПТР ағымы, яғни кезеңнен кезеңге және циклден циклге өту температураның өзгеруімен реттеледі. Амплификацияланатын циклдің температуралық профилі ПТР-дің үш дәйекті кезеңіне сәйкес келеді (қыздырылған кезде матрицалық денатурация, бір тізбекті матрицалық праймерлерді күйдіру және термостабильді ДНҚ полимеразасы арқылы екінші тізбекті синтездеу). Әр кезең үшін белгілі бір температура мен уақыт таңдалады.

Біз 55°C, 57°C, 59°C, 61°C, 63°C, 65°C градиентімен оңтайлы күйдіру температурасын таңдадық (сурет 1).



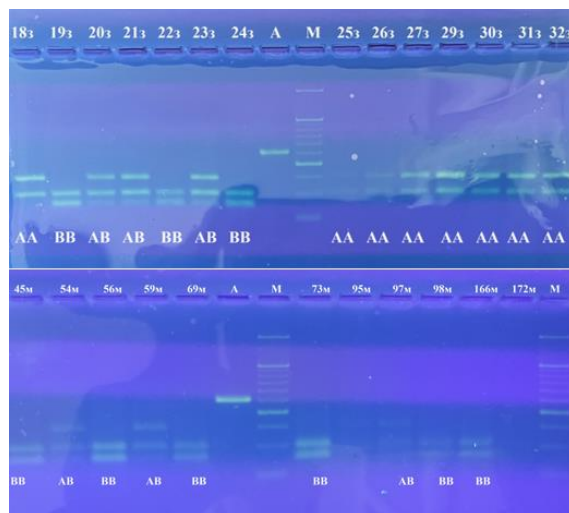
Сурет 1 - Күйдіру температурасы өзгерген кезде ПТР амплификация өнімдерінің электрофореграммасы (М-маркер 50 bp DNA Ladder; 1-сынама 41м; 2-сынама 101з; 3-оң бақылау)

1-ші суреттен көріп отырғанымыздай, 59⁰С және 61⁰С арасындағы күйдіру температурасында амплификацияланатын нуклеин қышқылының ең оңтайлы мөлшері байқалады. Жүргізілген эксперименттердің нәтижелері бойынша температура-уақыт режимінің келесі оңтайлы параметрлері таңдалды:

пре-денатурация: 94⁰С – 5 минут
денатурация: 94⁰С – 30 секунд
күйдіру: 60⁰С – 30 секунд
элонгация: 72⁰С – 30 секунд
пост-репликация: 72⁰С – 1 минут
сақтау 4⁰С – ∞

35 цикл

Келесі кезеңде біз *BLG* гені бойынша ПТР-ПДРФ қойдық (сурет 2).



Сурет 2 - *Bsuri*(*Hae*III) рестрикт өнімінің электрофореграммасы - 3% агарозды геледегі *BLG* генінің полиморфты учаскесі (М – 50 BP DNA Ladder маркері; А - амплификат; з - сау жануарлардан алынған сынамалар; м - маститті жануарлардан алынған сынамалар)

2-суреттен көріп отырғанымыздай, *BLG* гені бойынша амплификация өнімдерін бөлу кезінде келесі генотиптер анықталады: *BLG*^{AA} - ұзындығы 148/99 н.ж.; *BLG*^{AB} -ұзындығы 148/99/74 н.ж.; *BLG*^{BB} - ұзындығы 99/74 н.ж.

Қорытынды. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде ПТР жүргізу үшін реакциялық қоспалар мен праймерлердің оңтайлы концентрациясы келесідей екені анықталды: 10xБуфер - 2,5 мкл; $MgCl_2$ (25 mM) - 2 мкл; dNTP (25 mM) - 0,2 мкл; праймер F (10 пМ) - 1 мкл; праймер R (10 пМ) - 1 мкл; Taq - полимераза - 0,25 мкл; ДНҚ - 1 мкл; H_2O - 25 мкл дейін.

Амплификация бағдарламасына мыналар кірді: пре-денатурация $94^{\circ}C$ - 5 мин, 35 цикл, денатурация $94^{\circ}C$ - 30 сек, күйдіру $60^{\circ}C$ - 30 сек, элонгация $72^{\circ}C$ - 30 сек, пост-репликация $72^{\circ}C$ - 1 мин, сақтау $4^{\circ}C$.

ПТР-ПДРФ жүргізу нәтижесінде біз келесі генотиптерді алдық: BLG^{AA} - ұзындығы 148/99 н.ж.; BLG^{AB} - ұзындығы 148/99/74 н.ж.; BLG^{BB} - ұзындығы 99/74 н.ж. Зерттелген сау жануарлардың 14 сынамасы ішінен BLG^{AA} - 8; BLG^{AB} - 4; BLG^{BB} - 2 генотиптері анықталды. Зерттелген маститпен ауыратын жануарлардың 11 сынамасы ішінен BLG^{AA} - 0; BLG^{AB} - 3; BLG^{BB} - 6 генотиптері анықталды.

Осылайша, біз таңдаған ПТР және ПТР-ПДРФ реакция қоспасының компоненттік құрамы, сондай-ақ амплификацияның температуралық-уақыттық режимі амплификацияланатын нуклеин қышқылы мен рестрикт өнімінің қажетті мөлшерін жасау үшін оңтайлы болып табылады.

Қаржыландыру. Зерттеу жұмысы Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің гранттық қаржыландыру жобасы шеңберінде орындалды: AP13268821 «Жас ғалым» жобасы бойынша 2022-2024 жылдарға арналған «Голштин тұқымды ірі қара малының PRL және BLG гендері бойынша маститке резистенттілігінің генетикалық механизмдері».

ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1 Национальный проект по развитию агропромышленного комплекса Республики Казахстан на 2021-2025 годы; утвержден Постановлением Правительства Республики Казахстанот 12 октября 2021 года № 732[Электронный ресурс] [//https://primeminister.kz/ru/nationalprojects/nacionalnyy-proekt-po-razvitiyu-agropromyshlennogo-kompleksa-respubliki-kazahstan-na-2021-2025-gody-1594449](https://primeminister.kz/ru/nationalprojects/nacionalnyy-proekt-po-razvitiyu-agropromyshlennogo-kompleksa-respubliki-kazahstan-na-2021-2025-gody-1594449).

2 Halasa, T. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review [Текст] / T. Halasa, K. Huijps, O. Østeras, H. Hogeveen // Vet Q. - 2007. - V.29. - P.18-31.

3 Красочко, П.А. Изучение остаточных количеств клоксациллина, амоксициллина и преднизолона в молоке коров после применения препарата "Триолакт" [Текст] / П.А. Красочко, В.В. Ковзов, П.П. Красочко [и др.] // Ученые записки учреждения образования "Витебская ордена "Знак почета" государственная академия ветеринарной медицины". - 2021. - №1. - С. 42-46.

4 Zhumanov, K.T. The study of morphological properties of mastitis pathogens cows [Текст] / K.T. Zhumanov, K.B. Biyashev, B.K. Biyashev, A.R. Sansyzbai, A. Valdovska, S.S. Koshkinbaev // Res. Results. - 2015. - V.3. - P.35-39.

5 Gao, J. Impact of yeast and lactic acid bacteria on mastitis and milk microbiota composition of dairy cows [Текст] / J. Gao, Y.C. Liu, Y. Wang, H. Li, X.M. Wang, Y. Wu, D.R. Zhang, S. Gao, Z.L. Qi, // AMBExpress. - 2020. - V.10. - P.1-12.

6 Oliver, S.P. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens [Текст] / S.P. Oliver, S.E. Murinda // Vet Clin North Am Food Anim Pract. - 2012. - V.28(2). - P.165-185.

7 Parker Gaddis, K.L. Genomic selection for producer-recorded health event data in US dairy cattle [Текст] / K.L. Parker Gaddis, J.B. Cole, J.S. Clay, C. Maltecca // J. Dairy Sci. - 2014. - V.97. - P.3190-3199.

8 Калашникова, Л.А. Полиморфизм гена бета-казеина у коров голштинской породы [Текст] / Л.А. Калашникова, В.Г. Труфанов, Я.А. Хабибрахманова, Т.Б. Ганченкова, Н.В. Рыжова, И.Ю. Павлова // Молочное и мясное скотоводство. - 2021. - №17. - С.19-21.

9 Загидуллин, Л.Р. Молочная продуктивность черно-пестрого скота с разными генотипами пролактина и самотропина [Текст] / Л.Р. Загидуллин, Р.Р. Шайдуллин, Т.М. Ахметов, С.В. Тюлькин, А.Б. Москвичева // Молочное и мясное скотоводство. - 2021. - №4. - С. 21-24.

10 Weigel, K.A. Genetic selection for mastitis resistance [Текст] / K.A. Weigel, G.E. Shook // Vet Clinics: Food Anim Pract. - 2018. - V.34(3). - P.457-472.

- 11 [Miller](#), R.H. Impact of genetic merit for milk somatic cell score of sires and maternal grandsires on herd life of their daughters [Текст] / [R.H. Miller](#), [H.D. Norman](#), [J.R. Wright](#), [J.B. Cole](#) // J Dairy Sci. - 2009. - V.92(5). - P. 2224-2228.
12. Рачкова, Е.Н. Ассоциации генов, связанных с молочной продуктивностью и резистентностью к маститу крупного рогатого скота: дис...канд.биол.наук [Текст] / Е.Е. Рачкова. - Казань. -2017. - 115 с.
13. Yang, F. The effect of genetic polymorphism of the exon 2 of the beta-lactoglobulin gene on the milk composition in Chinese Holstein [Текст] / F. Yang, X.J. Zhou [et al.] // Zhongguo Ying Yong Sheng Li XueZaZhi. - 2011. – V.27(3). - P.333-337.
14. Kontopidis, G. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function [Текст] / G. Kontopidis, C. Holt, L. Sawyer // J Dairy Sci. -2004. – V.87(4). -P. 785-796.
- 15 Позовникова, М.В. Генетическая структура айрширского скота по однонуклеотидным ДНК-маркерам и влияние их генотипов на молочную продуктивность [Текст] / М.В. Позовникова [и др.] // Генетика и разведение животных. -2015. - №2. -С. 22-27.
- 16 Caroli, A.M. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition [Текст] / A.M. Caroli, S. Chessa, G.J.Erhardt // J. Dairy Sci. -2009. - V.92. -P. 5335-5352.
- 17 Perez, A.A. β -Lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids [Текст] / A.A. Perez, R.B. Andermatten, A.C. Rubiolo, L.G. Santiago //Food Chemistry. -2014. - V.158. - P.66-72.
- 18 Уливанова, Г.В. Иммуногенетика и генетический полиморфизм белков [Текст] / Г.В. Уливанова, Г.Н. Глотова //учебно-методическое пособие. - Рязань: РГАТУ. -2015. -С. 79-80.
- 19 Погорельский, И.А. Полиморфизм гена бета-лактоглобулина (BLG) в стаде крупного рогатого скота черно-пестрой породы и взаимосвязь его генотипов с показателями молочной продуктивности [Текст] / И.А. Погорельский, М.В. Позовникова // Генетика и разведение животных. -2014. - №1. -С. 45-48.
- 20 Dziuba, M. Milk proteins as precursors of bioactive peptides [Текст] / M. Dziuba, B. Dziuba, A.Iwaniak//Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. - 2009. - V.8(1). -P.71-90.
- 21 Weigel, K.A. Genetic selection for mastitis resistance [Текст] / K.A. Weigel, G.E. Shook // Vet Clin.-2018. - V.34. -P.457-472.
- 22 Juan, F.M. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis [Текст] / F.M. Juan, Aguilar-CordovaEstuardo // Animal Biotechnology. -1990. – V.1. - P.73-77.

REFERENCES

- 1 Nacional'nyj proekt po razvitiyu agropromyshlennogo kompleksa Respubliki Kazakhstan na 2021-2025 gody; utverzhden Postanovleniem Pravitel'stva Respubliki Kazakhstan ot 12 oktyabrya 2021 goda № 732 [Электронный ресурс] // <https://primeminister.kz/ru/nationalprojects/nacionalnyy-proekt-po-razvitiyu-agropromyshlennogo-kompleksa-respubliki-kazahstan-na-2021-2025-gody-1594449>.
- 2 Halasa, T. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review [Текст] / T. Halasa, K. Huijps, O. Østeras, H. Hogeveen // Vet Q. -2007. -V.29. -P.18-31.
- 3 Krasochko, P.A. Izuchenie ostatochnyh kolichestv kloksacillina, amoksicillina i prednizolona v moloke korov posle primeneniya preparata "Triolakt" [Текст] / P.A. Krasochko, V.V. Kovzov, P.P. Krasochko [et al.] // Uchenye zapiski uchrezhdeniya obrazovaniya "Vitebskaya ordena "Znak pocheta" gosudarstvennaya akademiya veterinarnoj mediciny". - 2021. - No.1. - P. 42-46.
- 4 Zhumanov, K.T.The study of morphological properties of mastitis pathogens cows [Текст] / K.T. Zhumanov, K.B. Biyashev, B.K. Biyashev, A.R. Sansyzbai, A. Valdovska, S.S. Koshkinbaev // Res. Results. -2015. -V.3. -P.35-39.
- 5 Gao, J. Impact of yeast and lactic acid bacteria on mastitis and milk microbiota composition of dairy cows [Текст] / J. Gao, Y.C. Liu, Y. Wang, H. Li, X.M. Wang, Y. Wu, D.R. Zhang, S. Gao, Z.L. Qi // AMBExpress. -2020. -V.10. -P.1-12.
- 6 Oliver, S.P. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens [Текст] / S.P. Oliver, S.E. Murinda// Vet Clin North Am Food Anim Pract. -2012. -V.28 (2). -P.165-185.

- 7 Parker Gaddis, K.L. Genomic selection for producer-recorded health event data in US dairy cattle [Текст] / K.L. Parker Gaddis, J.B. Cole, J.S. Clay, C. Maltecca // J. Dairy Sci. -2014. -V.97. -P.3190-3199.
- 8 Kalashnikova, L.A. Polimorfizm gena beta-kazeina u korov golshtinskoj porody [Текст] / L.A. Kalashnikova, V.G. Trufanov, YA.A. Habibrahmanova, T.B. Ganchenkova, N.V. Ryzhova, I.YU. Pavlova // Molochnoe i myasnoe skotovodstvo. - 2021. - No.17. - P.19-21.
- 9 Zagidullin, L.R. Molochnaya produktivnost' cherno-pestrogo skota s raznymi genotipami prolaktina i samotropina [Текст] / L.R. Zagidullin, R.R. SHajdullin, T.M. Ahmetov, S.V. Tyul'kin, A.B. Moskvicheva // Molochnoe i myasnoe skotovodstvo. - 2021. -No.4. - P. 21-24.
- 10 Weigel, K.A. Genetic selection for mastitis resistance [Текст] / K.A. Weigel, G.E. Shook // Vet Clinics: Food Anim Pract. -2018. -V.34 (3). -P.457-472.
- 11 Miller, R.H. Impact of genetic merit for milk somatic cell score of sires and maternal grandsires on herd life of their daughters [Текст] / R.H. Miller, H.D. Norman, J.R. Wright, J.B. Cole // J Dairy Sci. -2009. -V.92(5). -P. 2224-2228.
12. Rachkova, E.N. Associacii genov, svyazannyh s molochnoj produktivnost'yu i rezistentnost'yu k mastitu krupnogo rogatogo skota: dis...kand.biol.nauk [Текст] / E.E. Rachkova. - Kazan'. - 2017. - 115 p.
13. Yang, F. The effect of genetic polymorphism of the exon 2 of the beta-lactoglobulin gene on the milk composition in Chinese Holstein [Текст] / F. Yang, X.J. Zhou [et al.] // Zhongguo Ying Yong Sheng Li XueZaZhi. -2011. – V. 27(3). -P.333-337.
14. Kontopidis, G. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function [Текст] / G. Kontopidis, C. Holt, L. Sawyer // J Dairy Sci. -2004. – V.87(4). -P. 785-796.
- 15 Pozovnikova, M.V. Geneticheskaya struktura ajrshirskogo skota po odnonukleotidnym DNK-markeram i vliyanie ih genotipov na molochnuyu produktivnost' [Текст] / M.V. Pozovnikova [et al.] // Genetika i razvedenie zhivotnyh. - 2015. - №2. - P. 22-27.
- 16 Caroli, A.M. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition [Текст] / A.M. Caroli, S. Chessa, G.J.Erhardt // J. Dairy Sci. -2009. -V.92. -P. 5335-5352.
- 17 Perez, A.A. β -Lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids [Текст] / A.A. Perez, R.B. Andermatten, A.C. Rubiolo, L.G. Santiago // Food Chemistry. -2014. -V.158. -P.66-72.
- 18 Ulianova, G.V. Immunogenetika i geneticheskij polimorfizm belkov [Текст] / G.V. Ulianova, G.N. Glotova // uchebno-metodicheskoe posobie. - Ryazan': RGATU. - 2015. - p. 79-80.
- 19 Pogorel'skij, I.A. Polimorfizm gena beta-laktoglobulina (BLG) v stade krupnogo rogatogo skota cherno-pestroj porody i vzaimosvyaz' ego genotipov s pokazatelyami molochnoj produktivnosti [Текст] / I.A. Pogorel'skij, M.V. Pozovnikova // Genetika i razvedenie zhivotnyh. - 2014. - №1. - P. 45-48.
- 20 Dziuba, M. Milk proteins as precursors of bioactive peptides [Текст] / M. Dziuba, B. Dziuba, A.Iwaniak // Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. - 2009. - V.8 (1). -P.71-90.
- 21 Weigel, K.A. Genetic selection for mastitis resistance [Текст] / K.A. Weigel, G.E. Shook // Vet Clin. -2018. -V.34. -P.457-472.
- 22 Juan, F.M. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis [Текст] / F.M. Juan, Aguilar-Cordova Estuardo // Animal Biotechnology. -1990. – V.1. - P.73-77.

РЕЗЮМЕ

Мастит – опасное заболевание вымени, характеризующееся патологическими изменениями в тканях и в секрете молочной железы. Многолетние исследования этиологии мастита, механизмов их передачи и лечения установили, что данное заболевание молочной железы коров обусловлено многими внешними и генетическими факторами. Мировые научные исследования за последние десятилетия показывают, что в системе мер борьбы с маститом важное место должен занимать метод ДНК-диагностики, основанный не только на выявлении специфического участка ДНК возбудителя, но и на поиске маркеров генетической устойчивости к болезни, а также изучение взаимосвязи их полиморфизма. Нами приведены

результаты подбора и оптимизации компонентного состава реакционной смеси. По результатам проведенных исследований нами были подобрана оптимальная концентрации реакционной смеси и праймеров следующая: 10xБуфер – 2,5 мкл; $MgCl_2$ (25 мМ) – 2 мкл; dNTP (25 мМ) – 0,2 мкл; праймер F (10 пМ) – 1 мкл; праймер R (10 пМ) – 1 мкл; Taq-полимераза – 0,25 мкл; ДНК – 1 мкл; H_2O – до 25 мкл. Программа амплификации включала: пре-денатурация $94^{\circ}C$ – 5 мин, 35 циклов, денатурация $94^{\circ}C$ – 30 сек, отжиг $60^{\circ}C$ – 30 сек, элонгация $72^{\circ}C$ – 30 сек, пост-репликация $72^{\circ}C$ – 1 мин, хранение $4^{\circ}C$. В результате проведения ПЦР-ПДРФ нами были получены следующие генотипы: BLG^{AA} – длина 148/99 п.н.; BLG^{AB} – длина 148/99/74 п.н.; BLG^{BB} – длина 99/74 п.н. Таким образом, подобранные нами компонентный состав реакционной смеси ПЦР и ПЦР-ПДРФ, а также температурно-временный режим амплификации является оптимальным для наработки необходимого количества амплифицируемой нуклеиновой кислоты и продукта рестрикции.

УДК 619:639.331.7: 579.84
МРНТИ 68.41.33

Нуржанова Ф. Х., магистр ветеринарных наук, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0001-8700-6357>

НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана», г. Уральск, ул. Жангир хана 51, 090009, Казахстан, chinnur71@mail.ru

Абсатиров Г. Г., доктор ветеринарных наук, профессор, <https://orcid.org/0000-0002-8953-7992>. Западно-Казахстанский инновационно-технологический университет, г.Уральск, Ихсанова 44/1, 090006, Казахстан, absatirovgg@yandex.ru

Сидорчук А. А., доктор ветеринарных наук, профессор, <https://orcid.org/0000-0001-9624-0401>. ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Российская Федерация, г. Москва, ул. Академика Скрябина 23, 109472, saa48@mail.ru

Nurzhanova F. Kh, master of veterinary sciences, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0001-8700-6357>.

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, Kazakhstan, chinnur71@mail.ru

Absatirov G. G., doctor of veterinary sciences, professor, <https://orcid.org/0000-0002-8953-7992>. West Kazakhstan innovationand Technology University, Uralsk, Ihsanova 44/1, 090006, Kazakhstan, absatirovgg@yandex.ru

Sidorchuk A. A., doctor of veterinary sciences, professor, <https://orcid.org/0000-0001-9624-0401>. FSBEI of HE “Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MVA named after K.I.Skryabin” (MSAVM&B - MVA named after K.I. Skryabin), Russian Federation, Moscow, Academician Scriabin street, 23, 109472, saa48@mail.ru

КЛИНИЧЕСКИЕ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АЭРОМОНОЗА У ОСЕТРОВЫХ РЫБ В УЗВ CLINICAL AND PATHOMORPHOLOGICAL FEATURES OF AEROMONOSIS IN STURGEON FISH IN THE RAS

Аннотация

Одним из основных препятствий на пути к устойчивому развитию индустриальной аквакультуры, особенно при выращивании в УЗВ, являются болезни рыб, вызванные биотическими и абиотическими факторами. Наиболее часто встречающимися бактериальными агентами, связанными с болезнями рыб, выращиваемых в УЗВ, являются аэромонады, грамотрицательные бациллы. В статье приведены результаты исследований по выявлению причин заболеваний осетровых рыб в рыбоводном хозяйстве ТОО «Учебно-научный комплекс опытно-промышленного производства аквакультуры», выращиваемых в установках замкнутого водоснабжения. Установлено, что этиологическим фактором вспышки заболевания рыб в