

Кужебаева У.Ж., магистр вет. наук, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0002-7887-3376>

НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана», г. Уральск, ул. Жангир хана 51, 090009, Казахстан, usya_999@mail.ru

Гильманов Х.Х., к.б.н., <https://orcid.org/0000-0001-7053-6925>

Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Рязанский пр-т, 24, Москва, 109428, Россия, gilmanov.xx@mail.ru

Бейшова И.С., д.б.н., ассоциированный профессор, <https://orcid.org/0000-0001-5293-2190>

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

Гинаяттов Н.С., PhD, <https://orcid.org/0000-0002-9608-002X>,

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

Ульянов В.А., PhD, основной автор, <https://orcid.org/0000-0002-7500-1601>

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

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

NCJSC «Zhangir Khan West Kazakhstan Agrarian Technical University», Uralsk, Zhangir Khan street, 51, 090009, Kazakhstan, usya_999@mail.ru

Gilmanov Kh.Kh., Candidate of Biological Sciences, <https://orcid.org/0000-0001-7053-6925>

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 24 Ryazan Ave., Moscow, 109428, Russia, gilmanov.xx@mail.ru

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

NCJSC «Zhangir Khan West Kazakhstan Agrarian Technical University», Uralsk, Zhangir Khan street, 51, 090009, Kazakhstan, indira_bei@mail.ru

Ginayatov N.S., PhD, <https://orcid.org/0000-0002-9608-002X>, NCJSC «Zhangir Khan West Kazakhstan Agrarian Technical University», Uralsk, Zhangir Khan street, 51, 090009, Kazakhstan, nginayatov@mail.ru

Ulyanov V.A., PhD, <https://orcid.org/0000-0002-7500-1601>, NCJSC «Zhangir Khan West Kazakhstan Agrarian Technical University», Uralsk, Zhangir Khan street, 51, 090009, Kazakhstan, vadimkst@mail.ru

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ ГЕНА *iNOS* OPTIMIZATION OF PCR AMPLIFICATION CONDITIONS THE *iNOS* GENE

Аннотация

В настоящее время применяют два пути повышения эффективности традиционных противолейкозных мероприятий - разработка методов эффективной ранней диагностики и использование в селекционной практике признака устойчивости к персистентному лимфоцитозу. В этой связи наиболее актуальным направлением является определение механизмов генетической устойчивости к инфекционным заболеваниям в популяции сельскохозяйственных животных. В работе изложены данные результатов сравнительной оценки трех реакционных смесей от разных производителей с оптимизацией условий проведения ПЦР-амплификации по гену *iNOS*. В результате сравнительной оценки трех реакционных смесей «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген»), ООО «СибЭнзайм», ГК «Алкор Био» для постановки ПЦР каждый из них позволяет наработать специфический ПЦР-продукт из выделенного ДНК крупного рогатого скота. Однако полученный ПЦР-продукт имеет разное качество, и стоимость, затраченная на постановку одной пробы также различна. Самое оптимальное количество амплифицируемой

нуклеиновой кислоты при 54°C наблюдается с набором от производителя «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген»). На электрофореграмме виден высокий выход специфичного ПЦР-продукта гена *iNOS* длиной 186 п.н., без образования шмеров и неспецифики. Соответственно для дальнейшего проведения ПЦР-ПДРФ анализа и определения генотипов самым оптимальным является 1-ая реакционная смесь «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген»).

ANNOTATION

Currently, two ways are used to increase the effectiveness of traditional anti-leukemia measures - the development of effective early diagnosis methods and the use of a sign of resistance to persistent lymphocytosis in breeding practice. In this regard, the most relevant direction is to determine the mechanisms of genetic resistance to infectious diseases in the population of farm animals. The article presents the data of the results of a comparative evaluation of three reaction mixtures from different manufacturers with optimization of the conditions for PCR amplification by the *iNOS* gene. As a result of a comparative evaluation of three reaction mixtures "Encyclo Plus PCR kit" (CJSC "Eurogen"), LLC "SibEnzyme", GC "Alkor Bio" for PCR production, each of them allows to develop a specific PCR product from isolated DNA of cattle. However, the resulting PCR product has different quality, and the cost spent on setting up one sample is also different. The most optimal amount of amplified nucleic acid at 54°C is observed with a set from the manufacturer "Encyclo Plus PCR kit" (CJSC "Eurogen"). The electrophoregram shows a high yield of a specific PCR product of the *iNOS* gene with a length of 186 bp, without the formation of bumps and non-specificity. Accordingly, for further PCR-RFLP analysis and genotype determination, the 1st reaction mixture "Encyclo Plus PCR kit" (CJSC "Eurogen") is the most optimal.

Ключевые слова: *олигонуклеотиды, крупный рогатый скот, ген, полимеразная цепная реакция, ДНК*

Key words: *oligonucleotides, cattle, gene, polymerase chain reaction, DNA*

Введение. Вирус лейкоза крупного рогатого скота – РНК содержащий онкогенный вирус, вызывающий злокачественное лимфопролиферативное заболевание животных. В соответствии с классификацией Международного Комитета Таксономии Вирусов (ICTV), относится к семейству Retroviridae (2 подсемейства, 7 родов), подсемейству Orthoretrovirinae, роду Deltaretrovirus, к которому также относятся и Т-лимфотропные вирусы приматов (PTLV) – человека и обезьян (*HTLV* и *STLV*) [1-5].

В настоящее время применяют два пути повышения эффективности традиционных противолейкозных мероприятий - разработка методов эффективной ранней диагностики и использование в селекционной практике признака устойчивости к персистентному лимфоцитозу. В этой связи наиболее актуальным направлением является определение механизмов генетической устойчивости к инфекционным заболеваниям в популяции сельскохозяйственных животных [6,7].

Выяснено, что лейкоз крупного рогатого скота является заболеванием с наследственной предрасположенностью, обусловленный генетическим полиморфизмом, т.е. существование в популяции нескольких форм гена, встречающегося с определенной частотой, служащая мерой генетической изменчивости популяции, а также и слабым иммунитетом часто развивающимся в результате нарушения технологии содержания и кормления [8,9]. Проявление наследственной предрасположенности определяется комплексом наследственных и внешних факторов [10-12]. В качестве генетического маркера для оценки полиморфизма ДНК широко применяют однонуклеотидный полиморфизм (SNP), высокая плотность которых позволяет легко идентифицировать достаточное их число вблизи или внутри необходимого гена. Они являются высоко консервативными, и они позволяют провести гаплотипный анализ относительно коротких ПЦР фрагментов, тем самым повышая точность исследования. Стоит отметить немаловажность проведения анализа ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), при котором фрагмент используется как простейший генетический маркер. Данный анализ позволяет вести поиск аллельных вариантов генов, определяющих устойчивость и восприимчивость животных к инфекциям. Исследования по определению устойчивости

животных к инфекционным заболеваниям и дальнейшей направленной селекцией животных с такими признаками является актуальным.

Важным направлением исследований в плане разработки селекционно-генетических подходов к оздоровлению стад животных от лейкоза является изучение роли аллельной вариативности гена цитокиновой сети (*iNOS*) с восприимчивостью и устойчивостью крупного рогатого скота к лейкозу. Стоит отметить, что механизм устойчивости к вирусу лейкоза крупного рогатого скота остается до сих пор не разгаданным.

Система цитокинов это универсальная, полиморфная, регуляторная сеть медиаторов, предназначенных для контроля процессов пролиферации, дифференцировки, апоптоза и функциональной активности клеточных элементов в кроветворной, иммунной и в других гомеостатических системах организма [13,14]. Цитокины определяют сложные межклеточные кооперативные взаимоотношения иммунокомпетентных клеток и при этом имеют свой генетических маркер [15]. Также стоит отметить, что цитокины играют существенную роль в контроле всех стадий развития аллергических реакций и воспаления, по этой причине анализ регуляции их активности имеет очень большое значение для понимания молекулярных основ патогенеза многих заболеваний [16].

Одним из главных моментов функционирования цитокиновой сети является наличие в этих генах большого числа полиморфных участков в регуляторных промоторных областях. Имеющиеся различия в сайтах транскрипции промоторных областей оказывает большое влияние на уровень синтеза мРНК и продукции белковых молекул этих регуляторных факторов. Индивидуальные различия в этих участках генов оказывают влияние на течение основных систем жизнедеятельности организма и на его состояние здоровья [17].

Цитокины преимущественно образуются в клетках иммунной системы и представляют собой факторы межклеточного взаимодействия, которые дают возможность клеткам контактировать друг с другом на расстоянии и выполнять свои функции. Важнейшей составляющей воспалительного процесса является миграция клеток. Она регулируется специальными цитокинами – хемокинами. Они взаимодействуют с медиатором апоптоза, которые имеют способность предотвращать рост патогенных микроорганизмов, в том числе и вирусов [18].

Оценке полиморфизма генов цитокиновой сети и их роль при патологии вирусных заболеваний, уделяется большое внимание, так как единичные нуклеотидные замены генов, могут оказать влияние на функциональную активность генов, что в свою очередь оказывает воздействие на протекание воспалительного процесса.

Стоит отметить, что нами из большого числа генов-кандидатов цитокиновой сети, для проведения исследований нами были выбран именно ген хемокин (*iNOS*). Это связано с тем, что лейкоз крупного рогатого скота относится к вирусным заболеваниям опухолевой природы, а гены хемокины вовлечены именно в противовирусный и противоопухолевый иммунитет.

Ранее исследования с генами цитокиновой сети проводились американскими учеными Grosse W.M. (1999) и Heaton M.P., (2000, 2001). Ими было исследовано 9 генов цитокиновой сети и выявлено 55 ОНП-маркеров. Чичиной С.В. (2005), были выбраны 4 наиболее информативных генов цитокиновой сети. Ею проводились исследования на территории Новосибирской области и были получены результаты, позволяющие говорить об отличии геномов исследуемых животных по вариативности [19, 20].

Гильмановым Х.Х. (2019) был изучен аллельный полиморфизм гена *iNOS* ассоциированный с устойчивостью и восприимчивостью животных к вирусу лейкоза [21].

В связи с вышеизложенным, целью данной работы является провести оптимизацию условий постановки ПЦР-амплификации гена *iNOS*, для дальнейшей постановки ПЦР-ПДРФ анализа и определения генотипов животных.

Материалы и методы исследования. Исследования проводились в период с сентября по декабрь 2023 года на базе лаборатории биотехнологии и диагностики инфекционных болезней Испытательного центра НАО «Западно-Казахстанского аграрно-технического университета имени Жангир хана». Выделение ДНК проводилось при помощи коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) из трех аналогичных образцов цельной крови крупного рогатого скота, взятого в равном количестве для экстракции. Качественный анализ выделенной ДНК проводился методом гель-электрофореза, при этом ДНК

характеризовалась хорошим качеством, т.к. на электрофореграмме отсутствовали неспецифические фрагменты. Количественный анализ проводился путем измерения концентрации ДНК на спектрофотометре Agilent Cary 60 (Agilent Technologies, Inc, США). Средняя концентрация ДНК составила 80 ng/ul. Отношение A260/A280 составило 1,9.

Для проведения оптимизации параметров постановки ПЦР нами были использована пара олигонуклеотидов синтезированная Applied Biosystems UK, приведенная в таблице 1.

Таблица 1 – Нуклеотидная последовательность праймеров

Наименование праймеров	Последовательности праймеров	Длина праймеров	Ссылка
iNOSF_new	AGA GGC CAG AGA GGA AGA AAG	21 п.н.	[22]
iNOSR_new	GGA CCC TAA CCT CGA AGA CTG	21 п.н.	

При постановке ПЦР нами были использованы компоненты реакционной смеси от разных производителей, для выбора более оптимального. Первым нами была проведена оптимизация с набором реактивов «Epcyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген»), рассчитанный на 200 реакций – 1-ая реакционная смесь. В комплект набора входит: 50х Epcyclo Red буфер (1,2 мл); 50х смесь dNTP (120 мкл); стерильная вода для ПЦР (3х1,5 мл). Далее нами были использованы компоненты реакционной смеси производителя ООО «СибЭнзайм» - 2-ая реакционная смесь: Taq ДНК полимеразы со стандартным буфером (5000ед/мл); смесь dNTP (ферм.) для ПЦР 2.5мМ (1 мл); вода деионизированная, свободная от нуклеаз (45 мл). Состав следующей, нами использованной реакционной смеси включал в себя: Taq полимеразы с реакционным буфером и раствором Mg^{2+} (ГК «Алкор Био») (5000 е.а.), смесь dNTP 25мМ (НПК «Синтол») – 3-ая реакционная смесь. Состав всех трех, использованных реакционных смесей, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Состав реакционной смеси

1-ая реакционная смесь		2-ая реакционная смесь		3-ая реакционная смесь	
Реагенты	Объем на 1 реакцию, мкл	Реагенты	Объем на 1 реакцию, мкл	Реагенты	Объем на 1 реакцию, мкл
5× Encyclo Red буфер	4	1хSE-буфер	2	10хБуфер	2,5
				MgCl ₂	2
50× смесь dNTP	0,4	dNTP	2	dNTP	0,2
iNOSF_new	0,2	iNOSF_new	0,2	iNOSF_new	1
iNOSR_new	0,2	iNOSR_new	0,2	iNOSR_new	1
50×Encyclo полимеразы	0,4	Taq ДНК полимеразы	0,2	Taq-полимеразы	0,25
ДНК	2	ДНК	2	ДНК	2
H ₂ O стерильная	до 20 мкл	H ₂ O стерильная	до 20 мкл	H ₂ O стерильная	до 25 мкл

Наработку ПЦР продуктов проводили в амплификаторе ProFlex PCR System (Applied Biosystems, США). Режимы амплификации приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Режимы амплификации ДНК

	Этап					
	1	2			3	4
	Пре-денатурация	Денатурация	Отжиг	Элонгация	Пост-репликация	Хранение
1-ая реакционная смесь						
Температура	94°C	94°C	52°C 54°C 56°C 58°C	72°C	72°C	4°C
Время	4 мин	10 сек	10 сек	10 сек	5 мин	∞
Число циклов	1	35			1	-
2-ая реакционная смесь						
Температура	94°C	94°C	52°C 54°C 56°C 58°C	72°C	72°C	4°C
Время	4 мин	10 сек	10 сек	10 сек	5 мин	∞
Число циклов	1	35			1	-
3-ая реакционная смесь						
Температура	94°C	94°C	52°C 54°C 56°C 58°C	72°C	72°C	4°C
Время	5 мин	30 сек	30 сек	30 сек	1 мин	∞
Число циклов	1	35			1	-

Электрофорез проводили при напряжении 110 V, сила тока 400 mA в течение 1 часа на камере для горизонтального электрофореза Wide Mini-Sub Gell Gt. Для электрофореза использовали 2,5% раствор агарозы в 10xTBE-буфере. При внесении образцов 2-ой и 3-ей реакционной смеси в лунки геля, образцы в объеме 10 мкл смешивали с 2 мкл загрузочного буфера 6X DNA Loading Dye (Invitrogen, США). Документирование полученных результатов проводили при помощи геля документирующей системы UV transilluminator (Bio rad) с использованием красителя SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). В качестве маркера молекулярных масс использовали 100 bp + 50 bp (11 фрагментов от 50 до 1000 bp), производитель ООО «СибЭнзайм».

Результаты и их обсуждения. От правильно подобранных компонентов реакционной смеси и выбранного температурного-временного режима ПЦР зависит его специфичность, чувствительность и самое главное количество амплифицируемой нуклеиновой кислоты.

На первом этапе провели оптимизацию с набором реактивов «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген»). Проводили разведение на 3 пробы согласно таблице 2, далее применили режим амплификации, указанной в таблице 3 (рисунок 1). Продукт амплификации составляет 186 п.н.

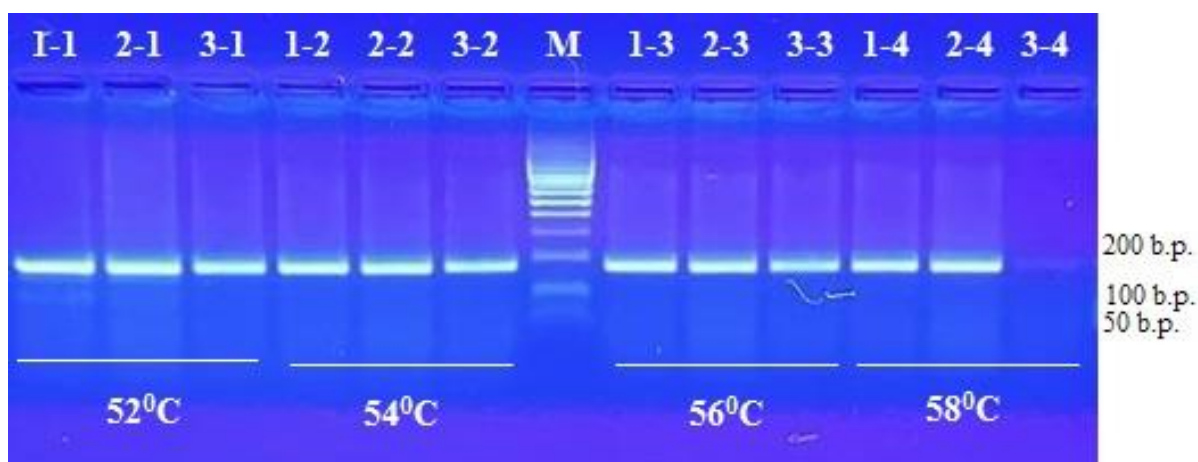


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации ПЦР по гену *iNOS* при изменении температуры отжига (М – маркер; 1-3 пробы) («Encyclo Plus PCR kit» ЗАО «Евроген»)

Как видно из рисунка 1 при температуре отжига между 52°C и 58°C наблюдается самое оптимальное количество амплифицируемой нуклеиновой кислоты при 54°C. Виден высокий выход специфичного ПЦР-продукта гена *iNOS* длиной 186 п.н., без образования шмеров и неспецифики.

На втором этапе были использованы компоненты реакционной смеси производителя ООО «СибЭнзайм». Проводили разведение на 3 пробы согласно таблице 2, далее применили режим амплификации, указанной в таблице 3 (рисунок 2). Продукт амплификации составляет 186 п.н.

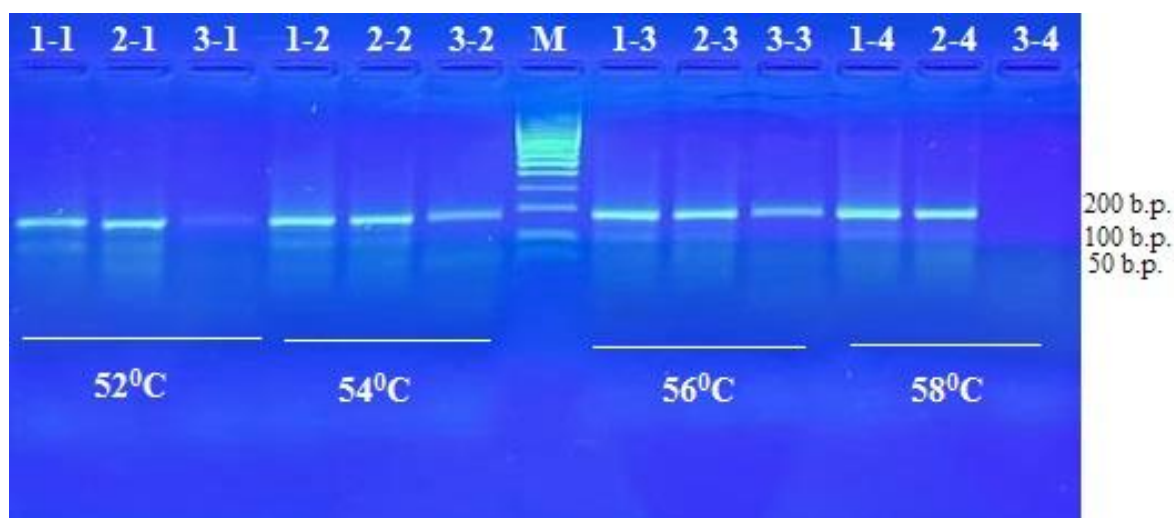


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации ПЦР по гену *iNOS* при изменении температуры отжига (М – маркер; 1-3 пробы) (ООО «СибЭнзайм»)

Как видно из рисунка 2 при температуре отжига между 52°C и 58°C наблюдается самое оптимальное количество амплифицируемой нуклеиновой кислоты при 54°C. Однако также видно, что в образце 3 количество нарабатываемого специфичного ПЦР-продукта меньше, чем в 1 и 2 образцах. Также наблюдается слабовыраженная интенсивность шмеров на фоне.

На третьем этапе были использованы компоненты реакционной смеси Taq полимеразы с реакционным буфером и раствором Mg^{2+} (ГК «Алкор Био»), смесь dNTP 25мМ (НПК «Синтол»). Проводили разведение на 3 пробы согласно таблице 2, далее применили режим амплификации, указанной в таблице 3 (рисунок 3). Продукт амплификации составляет 186 п.н.

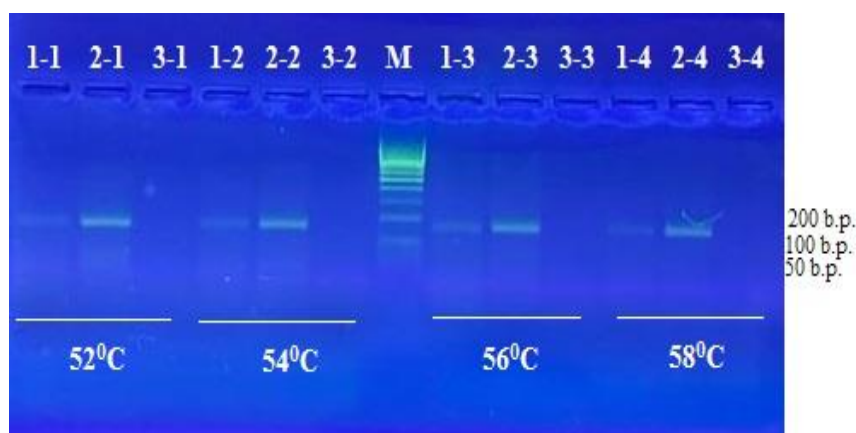


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов амплификации ПЦР по гену *iNOS* при изменении температуры отжига (М – маркер; 1-3 пробы) (ГК «АлкорБио»)

Как видно из рисунка 3 выход специфичного ПЦР-продукта низкий при разном градиенте температур отжига. ПЦР- продукт в 3-ем образце во всех 4-х градиентах температур отжига не образовался.

Таким образом, установлено, что постановка ПЦР с использованием 1-ой реакционной смеси набором реактивов «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген») обеспечивает сравнительно высокий выход специфичного ПЦР-продукта длиной 186 п.н.

Далее нами была проведена сравнительная оценка по стоимости использованных реакционных смесей для постановки ПЦР (таблица 4). Была рассчитана стоимость постановки на одну реакцию.

Таблица 4 – Стоимость постановки одной реакции ПЦР

Наименование набора и компонентов реакционной смеси	Стоимость выделения одного образца, тенге (согласно стоимости набора и компонентов реакционной смеси)
1-ая реакционная смесь	≈930
2-ая реакционная смесь	≈234
3-ая реакционная смесь	≈656

Расчет стоимости постановки ПЦР на одну пробу проводился без учета использования дополнительных материалов и реагентов, трудовых и коммунальных затрат. Для постановки ПЦР использованными реакционными смесями не требовал дополнительных дорогостоящих расходных материалов, временные и трудовые затраты также были сопоставимы.

Таким образом, после проведения сравнительной оценки трех реакционных смесей нами были сделаны следующие выводы:

- Постановка ПЦР с применением 1-ой реакционной смеси «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген») имеет высокую стоимость по сравнению с двумя другими. Однако стоит отметить, что в состав данного набора входят все компоненты необходимые для постановки реакции, нами только были приобретены отдельно праймеры. Расход праймеров на один праймер одинаковый со 2-ой реакционной смесью, однако меньше на 0,8 мкл по сравнению с 3-ей. Время амплификации также меньше по сравнению с 3-ей реакционной смесью на 1 час. Наблюдается самое оптимальное количество амплифицируемой нуклеиновой кислоты при 54°C. На электрофореграмме виден высокий выход специфичного ПЦР-продукта гена *iNOS* длиной 186 п.н., без образования шмеров и неспецифики.

- Постановка ПЦР с применением 2-ой реакционной смеси производителя ООО «СибЭнзайм» имеет самую низкую стоимость на 1 образец. Стоит отметить, что для постановки ПЦР нами были закуплены реактивы по отдельности и дополнительно был приобретен загрузочный буфер 6X DNA Loading Dye (Invitrogen, США) для удобства загрузки в

гель и визуализации амплификата. Расход примеров на один образец и время постановки амплификации одинаков с 1-ой реакционной смесью. Оптимальное количество амплифицируемой нуклеиновой кислоты наблюдается при 54°C. Однако также видно, что в образце 3 количество нарабатываемого специфичного ПЦР-продукта меньше, чем в 1 и 2 образцах. Также наблюдается слабовыраженная интенсивность шмеров на фоне.

- Постановка ПЦР с применением 3-ей реакционной смеси производителей ГК «АлкорБио» имеет среднюю стоимость по сравнению с двумя другими. Для постановки ПЦР нами были закуплены реактивы по отдельности и дополнительно был приобретен загрузочный буфер 6X DNA Loading Dye (Invitrogen, США), также как, и для 2-ой реакционной смеси. Расход примеров на один образец по сравнению с 1-ой и 2-ой реакционной смесями на 0,8 мкл больше. Время постановки амплификации также на 1 час дольше в сравнении с 1-ой и 2-ой реакционными смесями. Нарботка специфичного ПЦР-продукта низкий при разном градиенте температур отжига.

Таким образом по результатам проведенной оптимизации условий постановки ПЦР-амплификации гена *iNOS*, для дальнейшей постановки ПЦР-ПДРФ анализа и определения генотип животных будет использована 1-ая реакционная смесь «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген»).

Закключение. Сравнительная оценка реакционных смесей и наборов для постановки ПЦР показал, что каждый из использованных реакционных смесей позволяет наработать специфический ПЦР-продукт из выделенного ДНК крупного рогатого скота. Однако полученный ПЦР-продукт имеет разное качество, и стоимость, затраченная на постановку одной пробы также различна. Для дальнейшего выполнения поставленной перед нами задачи проведения ПЦР-ПДРФ анализа и определения генотипов самым оптимальным является 1-ая реакционная смесь «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Available online at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>
- 2 Polat, M. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus [Text] / M. Polat, S.N. Takeshima, Y. Aida // Virol J. – 2017. – V.14(1). – P. 209. doi: 10.1186/s12985-017-0876-4.
- 3 Sultanov, A. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan [Text] / A. Sultanov, M. Rola-Luszczak, S. Mamanova et all. // Pathogens. – 2022. – V. 11(2). – P. 180. doi:10.3390/pathogens11020180
- 4 Bartlett, P.C. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus [Text] / P.C. Bartlett, V.J. Ruggiero, H.C. Hutchinson, C.J. Droscha, B. Norby et all. // Pathogens. – 2020. – V. 9(12). – P. 1058. doi: 10.3390/pathogens9121058.
- 5 Hamada, R. Detection and Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus in Egyptian Dairy Cattle [Text] / R. Hamada, S. Metwally, M. Polat et all. // Front Vet Sci. – 2020. – V. 7(608). – P. 1–13. doi: 10.3389/fvets.2020.00608
- 6 Zyrianova, I.M., Bovine leukemia virus pre-miRNA genes' polymorphism [Text] / I.M. Zyrianova, S.N. Koval'chuk // RNA BIOLOGY. – 2018. – V. 15(12). – P. 1440–1447 DOI.org/10.1080/15476286.2018.1555406
- 7 Ladera Gómez, M.E. Altered apoptosis and proliferation in milk cells and PBMc from BLV-infected bovines with different proviral loads: Possible role of the BCL-2 family proteins, TNF-alpha, and receptors [Text] / M.E. Ladera Gómez, M.V. Nieto Farias, M. Rodríguez et all. // Veterinary immunology and immunopathology.– 2024. – V.268. – P.110703. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2023.110703>
- 8 Takeshima, S. Bovine leukemia virus proviral load is more strongly associated with bovine major histocompatibility complex class II DRB3 polymorphism than with DQA1 polymorphism in Holstein cow in Japan [Text] / S. Takeshima, A. Ohno, Y. Aida // Retrovirology. – 2019. – V.16. – P.14. Doi.org/10.1186/s12977-019-0476-z
- 9 Daiji, Y. Enzootic bovine leukosis caused by bovine leukemia virus classified as Group C based on viral whole genome sequencing in a 23-month-old Holstein-Friesian heifer [Text] / Y. Daiji,

M. Maezawa, K. Ishikawa et al. // The Journal of veterinary medical science. – 2023. – V. 85(12). – P.1291–1295. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0354>

10 Гильманов, Х.Х. Способ проведения ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллельным вариантам полиморфного маркера AN13-1 гена iNOS [Текст] / Х.Х. Гильманов, Р.Р. Вафин, Р.Г. Каримова, С.В. Тюлькин // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2018. – № 4. – С. 22–28.

11 Мищенко, В.А. Проблема лейкоза крупного рогатого скота [Текст] / В.А. Мищенко, О.Н. Петрова, А.К. Караулов, А.В. Мищенко // Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ». – 2018. – 38 с.

12 Айтназаров, Р.Б. Ассоциация однонуклеотидного полиморфизма rs110861313 в межгенном районе хромосомы 23 с развитием лейкоза у крупного рогатого скота черно-пестрой породы [Текст] / Р.Б. Айтназаров, Е.В. Игнатъева, Т.А. Агаркова и др. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – №23(8). – С. 999–1005. DOI 10.18699/VJ19.576

13 Сташкевич, Д.С. Актуальные вопросы иммунологии: система цитокинов, биологическое значение, генетический полиморфизм, методы определения : учебное пособие [Текст] / Д.С. Сташкевич, Ю.Ю. Филиппова, А.Л. Бурмистрова // Челябинский государственный университет. – Челябинск: Циперо. – 2016. – 82 с. – ISBN 978-5-91283-776-0. – EDN XHAAQOJ.

14 Ladera Gómez, M.E. Study of the proviral load levels and mRNA expression of cytokines in peripheral blood mononuclear cells and somatic milk cells in cattle with different BLV infection profiles [Text] / M.E. Ladera Gómez, M.V. Nieto Farias, A. Vater // Veterinaria italiana. – 2023. – V. 59(1). – P. 83–92. <https://doi.org/10.12834/VetIt.2718.20143.3>

15 Ризванова, Ф.Ф. Генетическая диагностика: полиморфизм генов цитокинов [Текст] / Ф.Ф. Ризванова, О.И. Пикуза, Р.А. Файзуллина и др. // Практическая медицина. – 2010. – Т.6. – № 45. – С. 41–43.

16 Kurschus, F.C. Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype [Text] / F.C. Kurschus, A.L. Croxford, A.P. Heinen et al. // Eur J Immunol. – 2010. – V. 40(12). – P. 3336–3346. doi: 10.1002/eji.201040755. PMID: 21110317.

17 Коненков, В.И. Сравнительная генетика промоторов генов цитокинов европеоидного населения России [Текст] / В.И. Коненков, А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев, О.В. Голованова // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13. – № 4–5. – С. 539–540.

18 Cheng, Y. Relationship of bovine NOS2 gene polymorphisms to the risk of bovine tuberculosis in Holstein cattle [Text] / Y. Cheng, C. Huang, H. Tsai // J Vet Med Sci. – 2016. – V. 78(2). – P. 281–286. Doi: 10.1292/jvms.15-0295

19 Heaton, M.P. Estimation of DNA sequence diversity in bovine cytokine genes [Text] / M.P. Heaton, W.M. Grosse, S.M. Kappes et al. // Mamm Genome. – 2001. – V.12(1). – P. 32-39. doi: 10.1007/s003350010223.

20 Чичинина, С.В. Роль аллельной вариативности генов цитокинов в формировании резистентности крупного рогатого скота к лейкозу: дис. ... канд. биол. наук: [Текст] / 16.00.03, 03.00.23 / С.В. Чичинина // Новосибирск. – 2005. – 107 с.

21 Гильманов, Х.Х. Генотипирование крупного рогатого скота по генам, определяющим устойчивость к лейкозу, и геноидентификация его этиологического агента: дис... канд.биол.наук [Текст] / Х.Х. Гильманов // Казань. – 2019. – 163 с.

22 Kuzhebayeva, U.Zh. Nutric oxide as an indicator for assessing the resistance and susceptibility of cattle to leukemia [Текст] / U.Zh. Kuzhebayeva, I.M. Donnik, M.V. Petropavlovskiy et al. // Agrarian Bulletin of the Urals. – 2021. – V.10 (213). – P. 48–54.

REFERENCES

1 ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Available online at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>

2 Polat, M. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus [Text] / M. Polat, S.N. Takeshima, Y. Aida // Virol J. – 2017. – V.14(1). – P. 209. doi: 10.1186/s12985-017-0876-4.

3 Sultanov, A. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan [Text] / A. Sultanov, M. Rola-Luszczak, S. Mamanova et al. // Pathogens. – 2022. – V. 11(2). – P. 180. doi:10.3390/pathogens11020180

4 Bartlett, P.C. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus [Text] / P.C. Bartlett, V.J. Ruggiero, H.C. Hutchinson,

C.J. Droscha, B. Norby et al. // *Pathogens*. – 2020. – V. 9(12). – P. 1058. doi: 10.3390/pathogens9121058.

5 Hamada, R. Detection and Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus in Egyptian Dairy Cattle [Text] / R. Hamada, S. Metwally, M. Polat et al. // *Front Vet Sci*. – 2020. – V. 7(608). – P. 1–13. doi: 10.3389/fvets.2020.00608

6 Zyrianova, I.M., Bovine leukemia virus pre-miRNA genes' polymorphism [Text] / I.M. Zyrianova, S.N. Koval'chuk // *RNA BIOLOGY*. – 2018. – V. 15(12). – R. 1440–1447 DOI.org/10.1080/15476286.2018.1555406

7 Ladera Gómez, M.E. Altered apoptosis and proliferation in milk cells and PBMc from BLV-infected bovines with different proviral loads: Possible role of the BCL-2 family proteins, TNF-alpha, and receptors [Text] / M.E. Ladera Gómez, M.V. Nieto Farias, M. Rodríguez et al. // *Veterinary immunology and immunopathology*. – 2024. – V. 268. – P.110703. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2023.110703>

8 Takeshima, S. Bovine leukemia virus proviral load is more strongly associated with bovine major histocompatibility complex class II DRB3 polymorphism than with DQA1 polymorphism in Holstein cow in Japan [Text] / S. Takeshima, A. Ohno, Y. Aida // *Retrovirology*. – 2019. – V.16. – P.14. DOI.org/10.1186/s12977-019-0476-z

9 Daiji, Y. Enzootic bovine leukosis caused by bovine leukemia virus classified as Group C based on viral whole genome sequencing in a 23-month-old Holstein-Friesian heifer [Text] / Y. Daiji, M. Maezawa, K. Ishikawa et al. // *The Journal of veterinary medical science*. – 2023. – V. 85(12). – P.1291–1295. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0354>

10 Gil'manov, H.H. Sposob provedeniya PCR-PDRF dlja genotipirovaniya krupnogo rogatogo skota po allel'nym variantam polimorfnoy markera AH13-1 gena iNOS [Tekst] / H.H. Gil'manov, R.R. Vafin, R.G. Karimova, S.V. Tjul'kin // *Veterinariya, zootehnika i biotekhnologiya*. – 2018. – № 4. – S. 22–28.

11 Mishhenko, V.A. Problema lejkoza krupnogo rogatogo skota [Tekst] / V.A. Mishhenko, O.N. Petrova, A.K. Karaulov, A.V. Mishhenko // *Vladimir: FGBU «VNIIZZh»*. – 2018. – 38 s.

12 Ajtnazarov, R.B. Asociacija odnonukleotidnogo polimorfizma rs110861313 v mezhhennom rajone hromosomy 23 s razvitiem lejkoza u krupnogo rogatogo skota cherno-pestroy porody [Tekst] / R.B. Ajtnazarov, E.V. Ignat'eva, T.A. Agarkova i dr. // *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii*. – 2019. – №23(8). – S. 999–1005. DOI 10.18699/VJ19.576

13 Stashkevich, D.S. Aktual'nye voprosy immunologii: sistema citokinov, biologicheskoe znachenie, geneticheskij polimorfizm, metody opredeleniya : uchebnoe posobie [Tekst] / D.S. Stashkevich, Ju.Ju. Filippova, A.L. Burmistrova // *Cheljabinskij gosudarstvennyj universitet*. – Cheljabinsk: Cicero. – 2016. – 82 s. – ISBN 978-5-91283-776-0. – EDN XHAQOJ.

14 Ladera Gómez, M.E. Study of the proviral load levels and mRNA expression of cytokines in peripheral blood mononuclear cells and somatic milk cells in cattle with different BLV infection profiles [Text] / M.E. Ladera Gómez, M.V. Nieto Farias, A. Vater // *Veterinaria italiana*. – 2023. – V. 59(1). – P. 83–92. <https://doi.org/10.12834/VetIt.2718.20143.3>

15 Rizvanova, F.F. Geneticheskaja diagnostika: polimorfizm genov citokinov [Tekst] / F.F. Rizvanova, O.I. Pikuza, R.A. Fajzullina i dr. // *Prakticheskaja medicina*. – 2010. – T.6. – № 45. – S. 41–43.

16 Kurschus, F.C. Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype [Text] / F.C. Kurschus, A.L. Croxford, A.P. Heinen et al. // *Eur J Immunol*. – 2010. – V. 40(12). – P. 3336–3346. doi: 10.1002/eji.201040755. PMID: 21110317.

17 Konenkov, V.I. Sravnitel'naja genetika promotorov genov citokinov evropeoidnogo naselenija Rossii [Tekst] / V.I. Konenkov, A.V. Shevchenko, V.F. Prokof'ev, O.V. Golovanova // *Medicinskaja immunologiya*. – 2011. – T. 13. – № 4–5. – S. 539–540.

18 Cheng, Y. Relationship of bovine NOS2 gene polymorphisms to the risk of bovine tuberculosis in Holstein cattle [Text] / Y. Cheng, C. Huang, H. Tsai // *J Vet Med Sci*. – 2016. – V. 78(2). – P. 281–286. Doi: 10.1292/jvms.15-0295

19 Heaton, M.P. Estimation of DNA sequence diversity in bovine cytokine genes [Text] / M.P. Heaton, W.M. Grosse, S.M. Kappes et al. // *Mamm Genome*. – 2001. – V.12(1). – P. 32–39. doi: 10.1007/s003350010223.

20 Chichinina, S.V. Rol' allel'noj variabel'nosti genov citokinov v formirovanii rezistentnosti krupnogo rogatogo skota k lejkozu: dis. ... kand. biol. nauk: [Tekst] / 16.00.03, 03.00.23 / S.V. Chichinina // Novosibirsk. – 2005. – 107 s.

21 Gil'manov, H.H. Genotipirovanie krupnogo rogatogo skota po genam, opredelajushhim ustojchivost' k lejkozu, i genoidentifikacija ego jetiologicheskogo agenta: dis... kand.biol.nauk [Tekst] / H.H. Gil'manov // Kazan'. – 2019. – 163 s.

22 Kuzhebayeva, U.Zh. Nutric oxide as an indicator for assessing the resistance and susceptibility of cattle to leukemia [Tekst] / U.Zh. Kuzhebayeva, I.M. Donnik, M.V. Petropavlovskiy et all. // Agrarian Bulletin of the Urals. – 2021. – V.10 (213). – P. 48–54.

ТҮЙІН

Қазіргі уақытта дәстүрлі лейкозға қарсы шаралардың тиімділігін арттырудың екі жолы қолданылады - тиімді ерте диагностика әдістерін әзірлеу және селекциялық тәжірибеде тұрақты лимфоцитозға төзімділік белгісін қолдану. Осыған байланысты ең өзекті бағыт ауылшаруашылық жануарларының популяциясындағы жұқпалы ауруларға генетикалық төзімділік механизмдерін анықтау болып табылады.

Жұмыста iNOS гені бойынша ПТР-күшейтуді жүргізу шарттарын оңтайландыра отырып, әртүрлі өндірушілердің үш реакциялық қоспасын салыстырмалы бағалау нәтижелерінің деректері баяндалған. "Encyclo Plus PCR kit" ("Евроген"), "СибЭнзайм" ЖШҚ, "Алкор Био" МК ПТР қою үшін үш реакциялық қоспаны салыстырмалы бағалау нәтижесінде олардың әрқайсысы бөлінген ірі қара малдың ДНҚ-сынан арнайы ПТР өнімін жасауға мүмкіндік береді. Дегенмен алынған ПТР өнімі әртүрлі сапаға ие және бір үлгіні қоюға жұмсалған шығындар да әртүрлі. 54°C күйдіру температурасы кезінде нуклеин қышқылының ең оңтайлы мөлшері "Encyclo Plus PCR kit" ("Евроген") өндірушінің жиынтығымен байқалады. Электрофореграммада ұзындығы 186 ж.н. болатын iNOS генінің ПТР-өнімінің жоғары өнімділігі көрінеді, шимер түзілмейді және спецификацияланбайды. Сәйкесінше ПТР- РФҰП талдауын әрі қарай жүргізу және генотиптерді анықтау үшін "Encyclo Plus PCR kit" ("Евроген") 1-ші реакциялық қоспасы ең оңтайлы болып табылады.

UDC: 619:616.995.121
IRSTI: 68.41.55

DOI 10.52578/2305-9397-2024-1-1-128-135

Aitpayeva Z. S., PhD, Acting Associate Professor, the main author <https://orcid.org/0000-0002-4814-2804>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, zulya08@mail.ru

Sariev N.Zh., Candidate of Veterinary Sciences, assistant professor, <https://orcid.org/0000-0001-6116-7523>

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

Davletova A.M., Ph.D, Acting Associate Professor, <https://orcid.org/0000-0002-3178-3277>,

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

Tagayev O. O., Doctor of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-1980-4936>

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

Habaev I.M., Student at the Institute of Veterinary Medicine and Animal Husbandry <https://orcid.org/0000-0001-2345-6789>

NJSC «West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir khan», Uralsk, st. Zhangir khan 51, 090009, iskanderhabaev645@gmail.com