

ТҮЙІН

Жасырын эндометриттен ауырған сиырлардың жатыр қабырғасының эндометриясына гистологиялық зерттеу жүргізілді. Микроскопиялық талдау және суретке түсіру Nikon digital Sight DS-Fi1 камерасымен жабдықталған Nikon Eclipse 50i микроскопымен жүзеге асырылады.

Салыстырмалы талдау үшін сиырдың аналық безі мен жатырындағы патогистологиялық өзгерістерді сипаттамас бұрын жоғарыда аталған органдардың әрқайсысының қалыпты микроқұрылымына қысқаша сипаттама берілді. Гистологиялық зерттеулерге арналған Материал биотоманың көмегімен дөңгелек пышақпен жүргізілді, оның көмегімен жатыр қабырғасының сынамалары алынды. Микроскопиялық талдау үшін аналық без, мүйіз (екеуі де), дене және жатыр мойны тіндерінің үлгілері алынып, 10% бейтарап формалин ерітіндісіне бекітілді. Жалпы шолу үшін гистологиялық бөлімдер гематоксин мен эозинмен боялған. Жасырын эндометриттен зардап шегетін сиырларда жатыр қабырғасының эндометриясын гистологиялық зерттеу кезінде эндометрия шырышты қабығының дәнекер тінінің орташа ісінуі, гиперемия, эндоваскулит және тамырлы ортаның ашылуы, сондай-ақ жатырдың айналасындағы орташа қалыңдықтағы толқынды коллаген талшықтары түріндегі тамырлы реакция анықталды. Бездердің қабырғаларында және олардың эндометриялық шырышты қабаттарында қабыну ошақтары болды.

УДК: 618.19-002:575.22:636.234.1
МРНТИ 68.41.49

DOI 10.52578/2305-9397-2024-2-1-69-83

Мүслимова Ж.У., магистр сельскохозяйственных наук, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0003-3485-7240/print>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, пр. Абая 8, 050010, Казахстан, info@kaznaru.edu.kz

Нусупова С. Т., кандидат ветеринарных наук, <https://orcid.org/0000-0002-3706-7802>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, пр. Абая 8, 050010, Казахстан, info@kaznaru.edu.kz

Омарбекова У. Ж., кандидат ветеринарных наук, <https://orcid.org/0000-0002-2459-5438>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, пр. Абая 8, 050010, Казахстан, info@kaznaru.edu.kz

Ибрагимов П.Ш., доктор ветеринарных наук, <https://orcid.org/0000-0002-5639-1798>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, пр. Абая 8, 050010, Казахстан, info@kaznaru.edu.kz

Усенбеков Е. С., кандидат биологических наук, <https://orcid.org/0000-0001-9508-4179>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, пр. Абая 8, 050010, Казахстан, info@kaznaru.edu.kz

Muslimova Zh. U., master of Agricultural Sciences, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0003-3485-7240/print>

NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty, Abai Ave 8, 050010, Kazakhstan, info@kaznaru.edu.kz

Nussupova S.T., Candidate of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-3706-7802>

NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty, Abai Ave 8, 050010, Kazakhstan, info@kaznaru.edu.kz

Omarbekova U.Zh., Candidate of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-2459-5438>

NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty, Abai Ave 8, 050010, Kazakhstan, info@kaznaru.edu.kz

Ibragimov P.Sh., Doctor of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-5639-1798>

NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty, Abai Ave 8, 050010, Kazakhstan, info@kaznaru.edu.kz

Ussenbekov Y. S., Candidate of Biological Sciences, <https://orcid.org/0000-0001-9508-4179>

NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty, Abai Ave 8, 050010, Kazakhstan, info@kaznaru.edu.kz

РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КОРОВ ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ ПО ЛОКУСАМ ГЕНОВ TLR6, BRCA1, АССОЦИИРОВАННЫХ С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К МАСТИТАМ

RESULTS OF GENOTYPING OF HOLSTEIN COWS FOR THE TLR6, BRCA1 GENES ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO MASTITIS

Аннотация

Мастит один из основных факторов снижения молочной продуктивности коров в Республике Казахстан. Целью работы было проведение генотипирования коров голштинской породы по локусам генов TLR6, BRCA1, ассоциированных с резистентностью к маститам, выявление животных с желательными генотипами не подверженных болезням молочной железы племенного хозяйства ТОО «Амиран» Талгарского района Алматинской области. По локусу гена TLR6 в подконтрольной популяции были выявлены все три генетических варианта, частота генотипов составила: ТТ – 0,94, СТ – 0,03, СС – 0,03, однако был выявлен минимальный уровень генетического полиморфизма по данному локусу гена. По локусу гена BRCA1 обнаружен более высокий уровень генетического полиморфизма, встречаемость генетических вариантов была: АА – 0,06, АВ – 0,42, ВВ – 0,52. По первому локусу гена TLR6 выявлено нарушение генного равновесия между теоретическим и фактическим распределением генотипов и вследствие чего, установлено увеличение значения χ^2 до 41,484, тогда как по второму локусу гена BRCA1 наблюдается равномерное распределение генетических вариантов и вследствие чего, значение χ^2 было минимальным, 0,0317. По локусу гена TLR6 у исследуемых животных не удалось определить животных с желательным генотипом, резистентных к маститам, так как все особи оказались с гомозиготным ТТ генотипом. Анализ заболеваемости коров клиническим и субклиническим маститом свидетельствует, что коровы с гомозиготными АА и ВВ генотипами по локусу гена BRCA1 более устойчивы к клиническим и субклиническим формам маститов. Распространенность клинического и субклинического мастита у коров с гетерозиготным генотипом по локусу гена BRCA1 составила 5,12% и 12,82%, соответственно. На основании полученных результатов рекомендуется использовать SNP G22231T полиморфизм по локусу гена BRCA1 для прогнозирования устойчивости к клиническим и субклиническим маститам у коров голштинской породы.

ANNOTATION

Mastitis is one of the main factors in reducing the milk productivity of cows in the Republic of Kazakhstan. The purpose of the work was to genotype Holstein cows at the TLR6, BRCA1 gene loci associated with resistance to mastitis, to identify animals with the desired genotypes that are not susceptible to mammary gland diseases at the breeding farm of Amiran LLP in the Talgar district of the Almaty region. At the TLR6 gene locus, all three genetic variants were identified in the controlled population; the frequency of genotypes was: TT – 0,94, CT – 0,03, CC – 0,03, however, a minimal level of genetic polymorphism was identified at this gene locus. A higher level of genetic polymorphism was found at the BRCA1 gene locus; the occurrence of genetic variants was: AA – 0,06, AB – 0,42, BB – 0,52. For the first locus of the TLR6 gene, a violation of the gene balance between the theoretical and actual distribution of genotypes was revealed and, as a result, an increase in the χ^2 value was found to 41,484, while for the second locus of the BRCA1 gene, a uniform distribution of genetic variants was observed and, as a result, the χ^2 value was minimal, 0,0317. Based on the TLR6 gene locus in the studied animals, it was not possible to identify animals with the desired genotype that were resistant to mastitis, since all individuals turned out to have a homozygous TT genotype. Analysis of the incidence of clinical and subclinical mastitis in cows indicates that cows with homozygous AA and BB genotypes at the BRCA1 gene locus are more resistant to clinical and subclinical forms of mastitis. The prevalence of clinical and subclinical mastitis in cows with a heterozygous genotype for the BRCA1 gene locus was 5,12% and 12,82%, respectively. Based on the results obtained, it is recommended to use SNP G22231T polymorphism at the BRCA1 gene locus to predict resistance to clinical and subclinical mastitis in Holstein cows.

Ключевые слова: ДНК маркеры, SNP полиморфизмы, гены TLR6, BRCA1, гены резистентности к маститам, ПЦР-ПДРФ, желательный генотип, субклинический мастит.

Key words: *DNA markers, SNP polymorphisms, TLR6, BRCA1 genes, mastitis resistance genes, PCR-RFLP, desired genotype, subclinical mastitis.*

Введение. В последние 20-25 лет в молочном скотоводстве селекция проводилась в основном по параметрам молочной продуктивности: удой за лактацию, содержание жира и белка в молоке, репродуктивные способности, устойчивость к патологиям конечностей и т.д. Отбор животных по признаку устойчивости к маститам не проводился, вследствие чего наблюдалась тенденция увеличения заболеваемости молочного скота клиническими и субклиническими формами маститов. Следовательно, наличие отрицательной генетической корреляции между признаками молочной продуктивности и снижением устойчивости к различным заболеваниям, в том числе к маститам является важным элементом селекционной работы. Бактериальный мастит является наиболее распространенным, который может быть вызван инфекционными возбудителями или патогенами окружающей среды [1]. Мастит у коров является серьезной проблемой в молочном скотоводстве и наносит значительный экономический ущерб: снижение удоя и биологического качества молока, технологических свойств молока, затраты на лечение животных и преждевременная выбраковка больных коров. Известны определенные рецепторы, которые ассоциированы с резистентностью к маститам, такие как, G-протеин связанный с хемокином, рецепторы цитокинов и врожденного иммунитета, Toll-подобные рецепторы, селектины, интегрины [2]. Отбор животных, толерантных к маститу, всегда востребованы исследователями ввиду экономической важности мастита. Толерантность к маститу является пороговым признаком, стратегия выбора немного отличаются от традиционных подходов к количественным признакам. В ветеринарной практике определение количества соматических клеток в молоке (SCC) является косвенным показателем клинического мастита у коров [3].

В настоящее время известно ген рака молочной железы 1 (BRCA1) у крупного рогатого скота, аллели которого ассоциируются с воспалением молочной железы и показателями молочной продуктивности. Результаты анализа хи-квадрата свидетельствуют, что существует значительная ассоциация обоих SNP, G43737229T ($P < 0,01$) и G43761121A ($P < 0,05$) полиморфизмов с частотой клинических маститов у коров. Установлено, что коровы с генотипом GG (SNP G43737229T) были менее восприимчивы к маститу по сравнению с коровами с гомозиготным TT генотипом. По другому SNP G43761121A, животные с гомозиготным AA генотипом были менее склонны к клиническому маститу по сравнению с носителями GG генотипа. Таким образом, гаплотип GT и комбинированный генотип GGTT показали максимальную заболеваемость маститом. Для идентификации аллелей в 13 экзонной части гена BRCA1 была использована эндонуклеаза HpyI88I и в 6 интронной части рестриктаза Hha I [4]. Была изучена взаимосвязь SNP гена BRCA1 (G22231T, T25025A и C28300A) с субклиническим маститом, а также удоями молока в течение четырех периодов лактации у коров голштинской породы. Авторами работы генотипирование 151 образца ДНК по следующим локусам: SNP G22231T, T25025A и C28300A гена BRCA1 проводилось методом ПЦР-ПДРФ анализа. Субклинический мастит у животных определяли с помощью Калифорнийского теста. Статистическая значимость данных была определена с помощью критерия хи-квадрат Пирсона. Связь между SNP C28300A, который был мономорфным, и субклиническим маститом не анализировалась. В исследованных выборках разница между пропорциональным распределением генотипов SNP G22231T и T25025A у коров с субклиническим маститом и у здоровых животных не была статистически значимой ($P > 0,05$). В результате проведенного анализа хи-квадрат (χ^2) было обнаружено, что крупный рогатый скот голштинской породы находился в равновесии Харди-Вайнберга с точки зрения SNP G22231T и T25025A. Учитывая физиологические процессы, в которых участвует ген BRCA1, считалось, что эти гены и SNP следует оценивать с использованием большего количества образцов в исследованиях устойчивости к маститу [5]. В другой работе было проверено влияние аллелей гена BRCA1 (рака молочной железы крупного рогатого скота 1) на заболеваемость маститом в популяции крупного рогатого скота Китая. Всего были изучены 51 SNP полиморфизма, из них три SNP (с.5682 G>C, с.26198 C>T, с.46126 G>T) полиморфизма были определены с помощью ПЦР-ПДРФ. Таким образом, значительная связь содержание соматических клеток в молоке была обнаружена у животных с.46126 G>T полиморфизмом. Результаты комбинированного анализа генотипов трех SNP показали, что коровы с комплексным HHLLNN генотипом были более восприимчивы к маститу, тогда как у особей с комбинированным GGKKMM генотипом содержание соматических клеток в молоке было самым низким, что свидетельствует об резистентности животных к маститу [6]. Ген BRCA1 является геном-супрессором опухолей, который в основном

участвует в восстановлении повреждений ДНК, регуляции клеточного цикла, поддержании геномной стабильности и других важных физиологических процессов. В медицине доказаны, что мутации или дефекты в части гена BRCA1 значительно увеличивает риск рака молочной железы, яичников, простаты и других форм рака [7]. В медицинской практике установлено, что в развитии рака молочной железы участвуют многие факторы, включая генетические, экологические, приобретенные. Среди всех этих факторов в семьях с раком молочной железы в анамнезе на протяжении нескольких поколений является генетический фактор, как предрасполагающий к развитию этого заболевания. Таким образом, раннее выявление носители мутаций в этих генах, в свою очередь, могут сыграть важную роль в предотвращении онкологических заболеваний у женщин. Поскольку это заболевание имеет высокая распространенность среди населения, женский скрининг зарегистрированных мутаций в предрасполагающих генах (BRCA1, BRCA2), которые наблюдались у больных раком молочной железы, является необходимым исследованием [8].

Согласно результатам исследования гены toll-like receptors (TLR) играют роль в реакции организма на различные патогены, в том числе вызывающие маститы у коров. Зарубежными учеными был исследован полиморфизм генов TLR2, TLR4, TLR6 и TLR9 у крупного рогатого скота голштинской породы и их возможная связь с клиническим маститом, с количеством соматических клеток в молоке (SCS) и с показателями молочной продуктивности. Установлено, что аллели гена toll-like receptors 6 (TLR6) оказывают ассоциативное влияние на содержание жира и соматических клеток в молоке, существует положительная корреляция аллелей гена TLR6 с максимальным удоем у молочных коров, также установлена связь генетических вариантов данного локуса с резистентностью к маститам. Известен, SNP полиморфизм (TLR6/TaqI) в кодирующей части гена TLR6, который используется в качестве ДНК маркера устойчивости к маститам [9]. Толл-подобные рецепторы (TLR) играют решающую роль в регуляция как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Известно, что связывание лиганды с TLR активирует сигнальный каскад и приводит к активации множественных противовоспалительных генов. Вариации этого иммунного ответа находится под генетическим контролем. Полиморфизмы генов, связанных с воспалительным процессом влияют на исход патологического процесса. Например TLR2 образует гетеродимер с TLR1 или TLR6 и распознает широкий спектр микробных лиганд [10]. Рецепторы (TLR) играют важную роль в обеспечении иммунного ответа, реакция на различные микробы, такие как бактерии, вирусы, паразиты и грибы, во врожденном и адаптивном иммунитете. Десять функциональных TLR генов (от TLR1 до TLR10) были идентифицированы и картированы у крупного рогатого скота, причем каждый TLR распознает определенные патоген-ассоциированные молекулярные закономерности. Вариации генов, контролирующих иммунный ответ способствует восприимчивости или устойчивости к различным инфекционным заболеваниям, такие как мастит, туберкулез, паратуберкулез. Поскольку мастит является воспалительным заболеванием, TLR рецепторы играют центральную роль в воспалительном процессе. Исследованиями установлены, что функциональные полиморфизмы TLR рецептора влияют на репродуктивную и молочную продуктивность у коров [11].

Мастит у коров сопровождается снижением иммунитета, повышенной выраженностью воспалительных процессов, с увеличением соматических клеток в молоке. Традиционная селекция на устойчивость к маститу является трудоемким из-за низкого коэффициента наследственности 0,10-0,16. Таким образом, селекция по генетическим маркерам с целью улучшения генетики устойчивости к маститам привлекла значительное внимание во всем мире. Более того, было доказано, что геномный отбор может быть эффективным и быстрым методом скрининга молочного скота, который генетически устойчив к маститу в очень раннем возрасте. В настоящее время у голштинской породы известны множественные ДНК маркеры невосприимчивости к маститам, такие как CD4, CD14, CD46, TRAPPC9, JAK2, Tf, Lf, TLRs, CXCL8, CXCR1, CXCR2, C4A, C5, MASP2, MBL1, MBL2, LBP, NCF1, NCF4, MASP2, A2M, CLU, IL-6, IFN-g, IL17, IL8 [12]. Инфекционные заболевания оказывают серьезное негативное воздействие на животноводство, как с точки зрения экономики и защиты животных. Потеря эффективности производства молока у животных, инфицированных туберкулезом достигает до 10-25 %. Существуют традиционные меры борьбы, такие как вакцинация, лечение и искоренение, повышение генетической устойчивости поголовья скота к заболеваниям. Отбор животных по генетическим признакам является эффективной альтернативной стратегией борьбы с заболеваниями, поскольку генетический фактор носит накопительный и постоянный характер. Гены, связанные с иммунными реакциями молочной железы, являются

потенциальными генетическими маркерами из-за их важности при мастите. Кроме того, гены, связанные с функцией нейтрофилов, являются потенциальными генетическими маркерами мастита, поскольку миграция нейтрофилов из крови в места инфекции важна для разрешения большинства возбудителей мастита. Определенные ассоциации были обнаружены между SNP генов цитокинов (IFNG-639T/C, IFNG+432 G/A, IFNGR1+132 G/T, IFNGR1 +523 A/G) с количеством соматических клеток и продолжительностью лактации у коров. Было обнаружено, что гомозиготный генотип по локусу TLR4 (+2021 C/T) в значительной степени связан с заболеваемостью маститом. Полиморфизмы в локусах TLR4 (+1656 C/T) и TLR4 (+2021 C/T) были связаны с показателями соматических клеток в популяции коров голштинской породы Канады. В 2012 году сообщалось о комбинированном анализе генотипов трех SNP (G22231T, T25025A, C28300A в гене BRCA1 крупного рогатого скота) и установлена связь генотипа BBDDFF с самым высоким содержанием SCS, что указывало на восприимчивость к маститу [13]. Существуют ряд генов-кандидатов, полиморфные варианты которых влияют на резистентность организма к маститам, среди которых особый интерес представляют гены, влияющие на защитные функции организма: ген лактоферрина (LTF) и маннозосвязывающего лектина (MBL1). Результаты, полученные в исследовании, дают важную информацию, которая может быть использована в будущих программах разведения и селекции с помощью маркеров для крупного рогатого скота. Изучение распределения интересующих аллелей и генотипов позволяет выявить корреляцию преобладающих, либо редко встречающихся генотипов, с хозяйственно-полезными признаками, устойчивостью к заболеваниям и адаптационными свойствами животных [14].

Казахстанскими учеными проведена работа по изучению связи полиморфных вариантов генов TLR9, MBL1, LTF с заболеваемостью хламидиозом, бруцеллезом и маститом у голштинских коров. Установлено, что генотипы TLR9-BfaI AA и MBL1-HaeIII CC являются генетическими маркерами повышенной устойчивости к хламидиям. Генотип LTF-EcoRI AA являлся генетическим маркером повышенного риска мастита, наоборот генотип LTF-EcoRI AB был ассоциирован с устойчивостью к маститу [15,16]. Авторами исследования проведено ДНК тестирование 181 образца коров черно-пестрой породы Костанайской области по локусам генов GH, LTF, MBL1. По результатам генотипирования и ассоциативного анализа носителей комбинированных генотипов с признаками молочной продуктивности установлены, что коровы MBL1-HaeIIITC, LTF-EcoRIAB, GH-AluIVV с комбинированными генотипами имеют более высокую молочную продуктивность, по сравнению с особями, носителями MBL1-HaeIIICC, LTF-EcoRIAA, GH-AluILL генотипов [17]. Известно, что 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 ACRS и PCR-RFLP методы. Согласно результатам проведенных экспериментов частота генетических вариантов по локусу гена CATHL2, SNP 807G>A 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 [18]. По мнению авторов, регрессионный анализ показывает, что существует значительная связь между генотипом CC с.+365T>C по локусу гена CXCR1 и восприимчивостью коров к клиническому маститу с достоверностью $P=0,047$. Частота комбинации гаплотипов CCCATA/CCCATA была значительно высокой у коров, подверженных маститу с достоверностью $P=0,062$ [19]. Первичным возбудителем мастита является широкий спектр бактериальных штаммов, однако вирусный мастит тоже встречается достаточно часто. Было доказано, что ген MX dynamin-like GTPase 1 (MX1) обеспечивает положительный противовирусный эффект, отвечает на многие вирусы и может быть подходящим геном-кандидатом для изучения устойчивости к болезням молочной железы у крупного рогатого скота [20]. Учеными рассмотрены Toll-подобные рецепторы (TLR), гены врожденного иммунитета, непосредственно участвующие в распознавании патогенов и активации иммунного ответа, поскольку появляются все больше исследований, проверяющих предположения о сбалансированном отборе в этих генах. Таким образом, исследование механизма взаимодействия организма и патогена, процесс балансирующего отбора в генах врожденного иммунитета приобретают все большее теоретическое и практическое значение, особенно относительно угроз, связанных с возникающими зоонозными заболеваниями [21]. Анализ отечественной литературы показывает,

что имеются публикации Казахстанских ученых по изучению ассоциативного влияния аллелей генов LTF, TLR6, MASP2, CATHL2, MX1, CXCR1, BRCA1 на содержание соматических клеток в молоке, с резистентностью к маститам у коров [22,23,24]. Целью настоящего исследования было проведение генотипирования коров голштинской породы по локусам генов TLR6, BRCA1, ассоциированных с резистентностью к маститам и изучение влияния аллелей изучаемых генов, на заболеваемость клиническим и субклиническим маститом в условиях Алматинской области.

Материалы и методы исследований. В качестве материала для генотипирования по локусам генов TLR6, BRCA1 были использованы замороженные образцы крови коров голштинской породы племенного хозяйства ТОО «Амиран», расположенное в Талгарском районе Алматинской области. Средний удой на молочной ферме составляет 9000-9500 кг молока за лактацию. Кровь для экстракции ДНК взяли из яремной, в отдельных случаях из хвостовой вены в объёме 2 мл в вакуумные пробирки с ЭДТА. Экстракция геномной ДНК из замороженной крови проводилась в лаборатории «Зеленой биотехнологии и клеточной инженерии» Казахстанско-Японского инновационного центра Казахского национального аграрного исследовательского университета двумя способами: классическим фенольным методом и с помощью коммерческого набора PureLink™ Genomic DNA Mini Kit согласно инструкции производителя. Качество изолированной ДНК оценивали путём измерения концентрации с помощью микроспектрофотометрического анализа (NanoDrop™ 2000), степень очистки ДНК была определена соотношением показателей A260/A280. Для дизайна последовательности прямого и обратного праймеров использовали программу Primer 3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), которая позволяет определить последовательности праймеров, оптимальную температуру отжига праймеров, содержания GC. Для генотипирования коров по локусам генов – TLR6, BRCA1 были использованы последовательности рекомендованных праймеров, а также были подобраны последовательности праймеров с помощью программы Primer 3, для идентификации аллелей гена TLR6. Идентификация аллелей гена TLR6 была осуществлена путём рестрикции ПЦР продукта эндонуклеазой TagI, с сайтом узнавания – T/CGA по локусу гена BRCA1, рестриктазой NheI с сайтом рестрикции – GCG/C. Рестрикция проводилась с соответствующим буфером в течение 5-6 часов, взяли 15 мкл амплификата и добавляли 5-10 U соответствующей рестриктазы. Температура отжига праймеров приведена в таблице 1, доля GC в последовательности прямого и обратного праймеров колебались от 40,0 % до 50%. Результаты амплификации проверяли с помощью горизонтального электрофореза в 3-4% агарозном геле. В нашей работе теоретическую частоту генетических вариантов и значение χ^2 определяли с помощью компьютерной программы Equilibrium Hardy-Weinberg (<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>). Регистрацию и документирование результатов проводили с помощью геля документирующей системы Infinity VX2 3026, WL/LC/26M X-Press (VilberLourmat, США). В период с апреля по декабрь 2023 года ежеквартально проводилась диагностика на клинический и субклинический мастит экспресс-методом с помощью набора DeLaval mastitis test.

Таблица 1 – Последовательности праймеров для генотипирования коров по локусам генов TLR6, BRCA1

Название гена	Последовательности праймеров	Доля GC, %	Температура отжига	Авторы
TLR6	F- 5'-AAAGAATCTCCCATCAGAAG-3'	40,00	60°C	Elmaghraby M. et al [9]
TLR6	R- 5'-GAAGGATACAACCTTAGGTGC-3'	45,00	60°C	
TLR6	F-5'-TCTGAGCTTCACCTGTCTGA-3'	50,00	58°C	Усенбеков Е.С., и др. [25]
TLR6	R- 5'-TAGGTGCAAGTGAGCAATGG-3'	50,00	58°C	
BRCA1	F-5'-CTTCAGAACCTGTACTTGTAACC-3'	43,47	55°C	Fadime D. Et al [5]
BRCA1	R- 5'-CAAGGAATATTTACTGAGCACC-3'	40,90	55°C	

Таблица 2 – Условия проведения полимеразной цепной реакции для генотипирования образцов ДНК коров голштинской породы по локусам генов TLR6, BRCA1

Условия амплификации	TLR6	TLR6 патент	BRCA1 SNP G22231T
Первоначальная денатурация	95°C – 5 мин	95°C – 5 мин	94°C – 5 мин
Денатурация	94°C – 30 с	94°C – 60 с	94°C – 30 с
Отжиг	63°C – 30 с	58°C – 30 с	55°C – 30 с
Элонгация	72°C – 30 с	72°C – 60 с	72°C – 30 с
Количество циклов	35 циклов	35 циклов	32 цикла
Финальный синтез	72°C – 5 мин	72°C – 10 мин	72°C – 7 мин

Таблица 3 – SNP полиморфизмы в кодирующей части генов TLR6, TLR6 и места локализации точечной мутации, используемые рестриктазы, размеры фрагментов ДНК в зависимости от генотипа животных

Характеристики	Название SNP полиморфизма	
Название гена и SNP	TLR6/Taq1	BRCA1/ HhaI
Локализация гена	на 6 хромосоме	на 19 хромосоме
Длина гена	40 980 п. н.	70 992 п. н.
Место локализации точечной мутации	ATTTAGACCTCTCATTTCAA TGACTT/CGATGCCCTGCCC ATCTGTAAGGAATTTG	GTGTGTTCTTTACCA CTAGCG/CCACCTGGG AAGCC CTGCC
Размер ПЦР продукта	515 п. н., [9], 324 п.н. [25]	321 п. н. [5]
Рестриктаза с сайтом узнавания	Tag1 T/CGA	HhaI GCG/C
Фрагменты после рестрикции, в зависимости от генотипа	CC-515 п.н. CT-515 п.н., 380 п.н., 135 п.н. TT- 380 п.н., 135 п.н. [9]	BB-321 п.н. AB-321 п.н., 272 п.н., 49 п.н., AA-272 п.н., 49 п.н.
Фрагменты после рестрикции, в зависимости от генотипа по методике КазНАИУ	CC 324 п.н. CT-324 п.н., 209 п.н., 115 п.н., TT-209 п.н., 115 п.н. [25]	

Результаты и их обсуждение. Средняя концентрация в образцах ДНК коров ТОО «Амиран» была оптимальной и составила 199,4 ng/μl, содержание ДНК в образцах колебалось от 3,2 ng/μl до 647,33 ng/μl. Объем реакционной смеси был 25 мкл, имеющий следующий состав: 2,5 мкл 10 X буфера для ПЦР с KCL, 1,5 mM MgCl₂, 1,0 мкл 25 мкМ прямого и обратного праймеров, 2 мкл 0,2 mM концентрации каждого dNTP, 0,2 мкл фермента Taq Polymerase с активностью 5u/μl, 3 мкл ДНК и 13,8 мкл бидистиллированной воды. Генотипирование образцов ДНК коров по локусу гена TLR6/Taq1 проводилось двумя способами: с использованием праймеров, рекомендованными зарубежными учеными [9] и с помощью праймеров, разработанными учеными КазНАИУ [25], по локусу гена BRCA1 идентификацию аллелей осуществляли путем гидролиза полученного ПЦР продукта эндонуклеазой HhaI, как описано в работе Fadime D. et al [5]

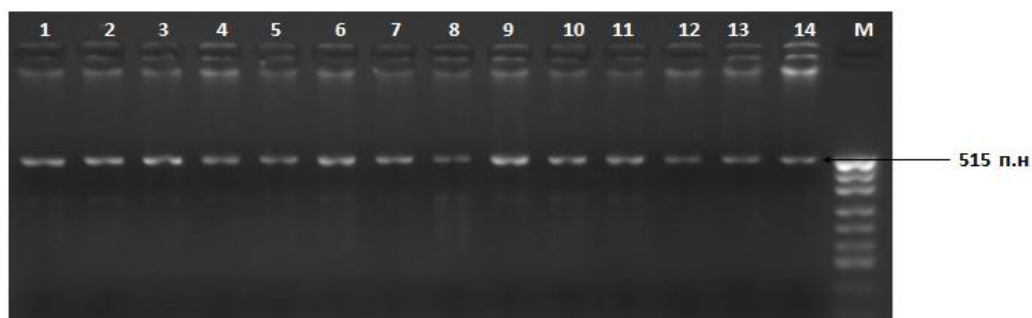


Рисунок 1 – Электрофореграмма амплификата гена TLR6, 2,0% агароза, лунки 1-14 ПЦР продукт, фрагмент 515 п.н., М-ДНК маркер рUC19/MspI

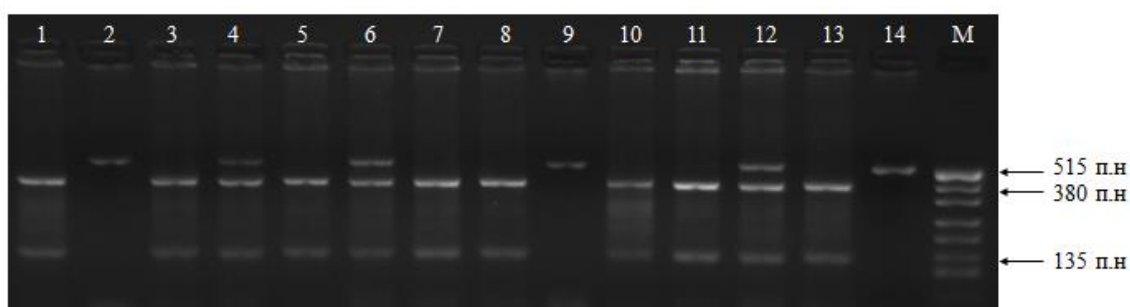


Рисунок 2 – Электрофореграмма амплификата гена TLR6 после рестрикции эндонуклеазой TaqI, 2,5% агароза, лунки 2,9,14 гомозиготный СС генотип (515 п.н.), лунки 4,6,12 гетерозиготный генотип СТ (515 п.н., 380 п.н., 135 п.н.), лунки 1,3,5,7,8,10,11,13 гомозиготный генотип ТТ (380, 135 п.н.), М-ДНК маркер рUC19/MspI

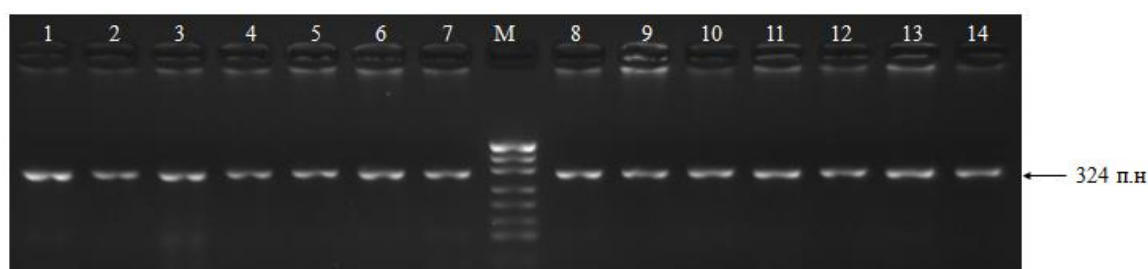


Рисунок 3 – Электрофореграмма амплификата гена TLR6, 3,0% агароза, лунки 1-7, 8-14 ПЦР продукт, фрагмент 324 п.н., М-ДНК маркер рUC19/MspI

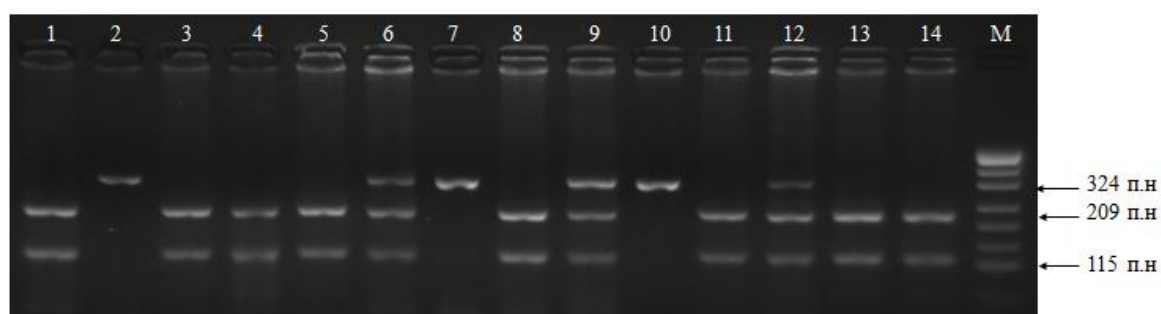


Рисунок 4 – Электрофореграмма амплификата гена TLR6 после рестрикции эндонуклеазой TaqI, 3% агароза, лунки 2,7,10 гомозиготный СС генотип (324 п.н.), лунки 6,9,12 гетерозиготный генотип СТ (324 п.н., 209 п.н., 115 п.н.), лунки 1,3-5,8,11,13,14 гомозиготный генотип ТТ (209 п.н., 115 п.н.), М-ДНК маркер рUC19/MspI

В результате амплификации участка гена TLR6 были получены амплификаты размерами 515 п.н. и 324 п.н., для детекции аллелей С и Т была использована рестриктаза TagI с сайтом

рестрикции T/CGA (рис1,2,3,4). Анализ электрофореграммы показывает (рис 5), что оптимальной температурой отжига праймеров для гена BRCA1 является 55°C, длительностью 30 сек, конечная концентрация MgCl₂ составила 1,5 мМ. В качестве ДНК маркера была использована плаزمида рUC19 рестрицированная рестриктазой MspI в количестве 5,0 мкл.

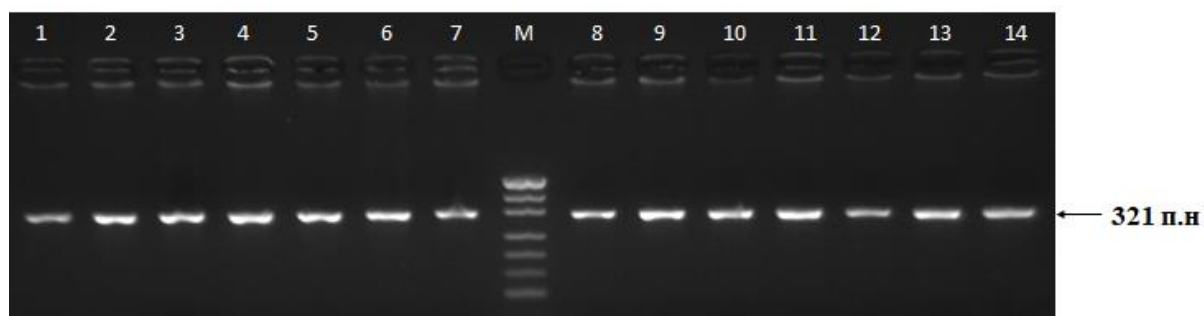


Рисунок 5 – Электрофореграмма амплификата гена BRCA1, 3,0% агароза, лунки 1-7, 8-14 ПЦР продукт, фрагмент 321 п.н., М-ДНК маркер рUC19/MspI

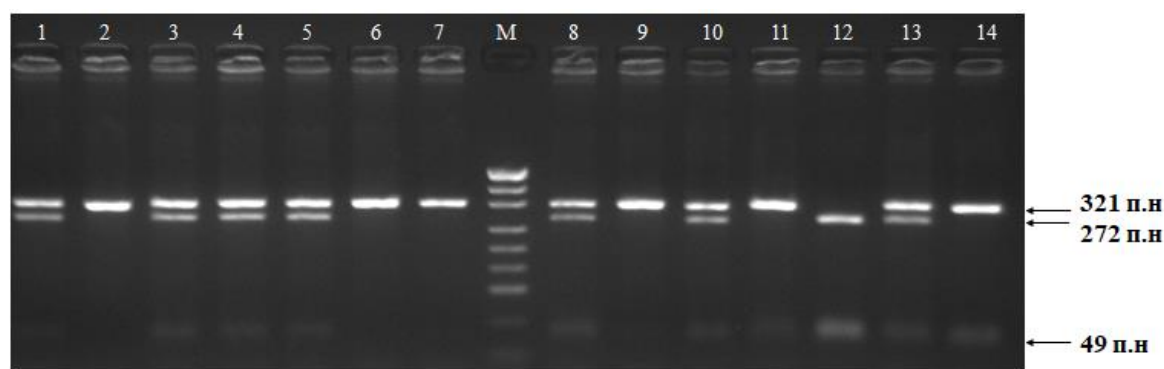


Рисунок 6 – Электрофореграмма амплификата гена BRCA1 после рестрикции эндонуклеазой NhaI, 3% агароза, лунки 2,6,7,9,11,14 гомозиготный BB генотип (321 п.н.), лунка 12 гомозиготный генотип AA (272 п.н., 49 п.н.), лунки 1,3-5, 8, 10, 13 гетерозиготный генотип AB (321 п.н., 272 п.н., 49 п.н.), М-ДНК маркер рUC19/MspI

Следует обратить внимание, что при рестрикции ПЦР продукта гена BRCA1 эндонуклеазой NhaI образуются фрагменты, размерами 321 п.н., 272 п.н. и 49 п.н., на электрофореграмме хорошо видны бэнды 321 п.н., и 272 п.н., из-за небольшого размера фрагмента, бэнд 49 п.н. слабо видно на электрофореграмме. Таким образом по локусу гена TLR6 были протестированы 98 образцов ДНК, по локусу гена BRCA1 94 образца ДНК и по обоим локусам генов у исследуемой группы животных выявлен генетический полиморфизм.

Таблица 4 – Фактическое и теоретическое распределение генетических вариантов по локусам генов TLR6, BRCA1 у исследуемой группы коров голштинской породы

Группы	Исследуемый локус гена и число животных							
	TLR6 (n=98), ТОО «Амиран»				BRCA1 (n=94), ТОО «Амиран»			
	ТТ	СТ	СС	χ^2	АА	АВ	ВВ	χ^2
	Фактическое распределение				Фактическое распределение			
Коровы	92	3	3		6	39	49	
	Теоретическое распределение				Теоретическое распределение			
Коровы	89,20	8,586	0,206	41,484	6,32	35,34	49,32	0,0317
Отклонение	+2,80	-5.586	+2.794		-0.32	+3,66	-0.32	

Анализ результатов генетической паспортизации показывает, что по локусу гена TLR6 у исследуемых коров обнаружен генетический полиморфизм, были выявлены все три генетических варианта – гомозиготный генотип ТТ, гетерозиготный СТ и другой гомозиготный СС генотипы. Следует отметить, что среди протестированных животных в основном преобладают особи с гомозиготным генотипом (92 голов, 95,85%), доля гетерозиготных СТ и гомозиготных СС генотипами была одинаковой и составила 3 головы (3,06%). По локусу гена TLR6 наблюдается отклонение фактического распределения генетических вариантов от теоретического распределения, так по гомозиготным генетическим вариантам СС и ТТ, наблюдается избыточная встречаемость (+2,794 и +2,80 особей), соответственно, по другому генетическому варианту (гетерозиготный СТ) наблюдается дефицит встречаемости -5,586 особей. Цифровое значение χ^2 для локуса гена TLR6 в наших экспериментах было высоким и составило 41,484, что косвенно свидетельствует о нарушении генного равновесия.

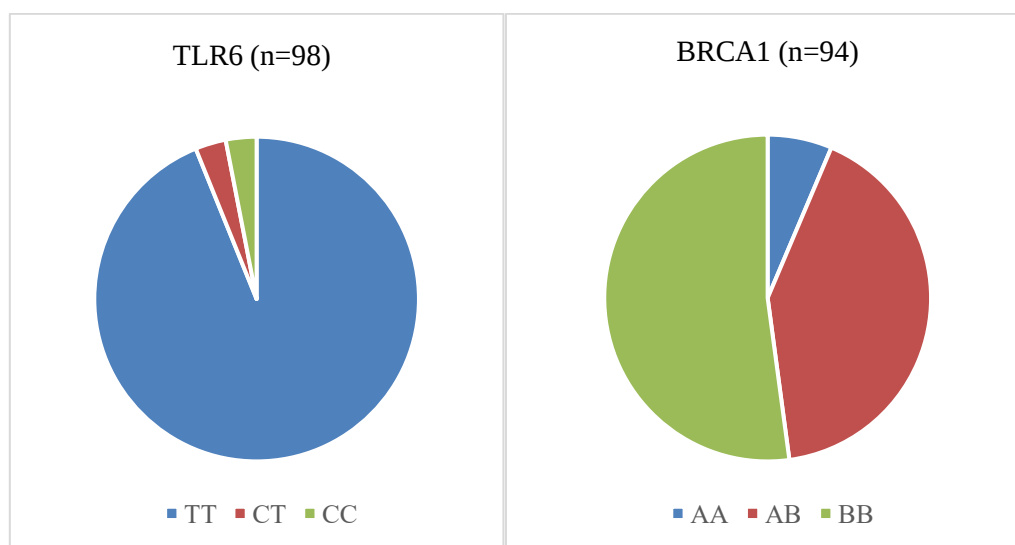


Рисунок 7 – Диаграмма фактического распределения генетических вариантов по локусам генов TLR6, BRCA1 у исследуемых животных

Было прогенотипировано 94 образца ДНК коров голштинской породы ТОО «Амиран» по локусу гена BRCA1, где по результатам фактического распределения генетических вариантов преобладают животные с гомозиготным BB генотипом (49 голов, 51,52%), уровень встречаемости гетерозиготного AB и другого гомозиготного AA генотипа был 39 (41,48%) и 6 (6,38%) голов. По результатам генотипирования по локусу гена BRCA1 отклонение фактического распределения генетических вариантов от теоретического распределения было минимальным, по сравнению с локусом гена TLR6, где встречаемость гомозиготного ТТ генотипа достигла до 95,85% (рис 7).

Проведен анализ заболеваемости коров голштинской породы клиническим и субклиническим маститом в период с апреля по декабрь 2023 года (таблица 5). По локусу гена TLR6 были прогенотипированы всего 98 коров, из них большая часть особей имели гомозиготный ТТ (n=92), встречаемость клинических форм мастита у животных с данным генотипом (ТТ) была 5,43%, субклинического мастита была выше и составила 13,04%, у животных с другими генетическими вариантами СТ (n=3) и СС (n=3) клинические и субклинические формы мастита не были зарегистрированы. По второму локусу гена, BRCA1 (n=94) (SNP G22231T полиморфизм) высокая распространенность клинического и субклинического мастита была обнаружена у коров с гетерозиготным АВ генотипом 5,12% и 12,82%, соответственно. По локусу гена BRCA1 у исследуемой группы коров были выявлены всего 49 особей с гомозиготным ВВ генотипом, что составляет от исследованных животных 52,12%, у данной группы животных были выявлены больные клиническим маститом 1 корова (2,04%), субклиническим маститом 3 животные (6,12%). В условиях хозяйства для выявления субклинических форм мастита был использован экспресс-метод диагностики с помощью коммерческого набора DeLaval mastitis test.

Таблица 5 – Распространенность клинических и субклинических форм мастита у коров ТОО «Амиран» с разными генотипами по локусам генов TLR6, BRCA1 в период с апреля по декабрь 2023 года

Генотипы коров и число животных	Выявлены формы мастита	
	Клинический мастит	Субклинический мастит
по локусу гена TLR6 (n=98)		
ТТ (n=92)	5/5,43%	12/13,04%
СТ (n=3)	0	0
СС (n=3)	0	0
Всего (n=98)	5/5,10%	12/12,24%
по локусу гена BRCA1, SNP G22231T, (n=94)		
АА (n=6)	0	0
АВ (n=39)	2/5,12%	5/12,82%
ВВ (n=49)	1/2,04%	3/6,12%
Всего (n=94)	3/3,19%	8/8,51%

Выводы. По результатам генотипирования коров голштинской породы племенного хозяйства ТОО «Амиран», проведенного методом ПЦР-ПДРФ анализа у исследуемых животных по локусу гена TLR6 обнаружен генетический полиморфизм, были выявлены все три генетических варианта: ТТ, СТ и СС, однако полиморфность данного генетического локуса была минимальной, так как уровень встречаемости гомозиготного генотипа была высокой и составила 93,87%, частота других генетических вариантов СТ и СС составила всего лишь 3,06%. Данный факт свидетельствует о нарушении генного равновесия по изучаемому локусу гена, вследствие длительного интенсивного селекционного процесса, отбора животных по молочной продуктивности. По другому локусу гена BRCA1 выявлены все три генетических варианта генотипа: АА – 6,38%, АВ – 41,48%, ВВ – 52,12%, наблюдается относительно равномерное распределение генетических вариантов у исследуемых коров по сравнению с локусом гена TLR6. Считаем проведение анализа заболеваемости клиническим и субклиническим маститом коров по локусу гена TLR6 нецелесообразным, так как практически более 93,0% животных имеют гомозиготный ТТ генотип. Результаты мониторинга встречаемости клинических и субклинических маститов у коров, протестированных по локусу гена BRCA1 показывают, что более восприимчивы маститам обеих форм мастита коровы с гетерозиготным АВ генотипом, где распространенность клинического мастита составила 5,12%, субклинического мастита 12,82%. Аналогичные показатели у коров с гомозиготным ВВ генотипом были 2,04% и 6,12%, по результатам обследования клинические и субклинические формы мастита не были выявлены у коров с гомозиготным АА генотипом (0,0%). Однако, неравномерное распределение генетических вариантов генотипа по локусу гена BRCA1 у исследуемой группы животных затрудняет проведение статистической обработки полученных результатов генотипирования. Таким образом, полученные предварительные результаты генотипирования образцов ДНК по локусу гена BRCA1 позволяет предполагать, что животные с генотипами АА и ВВ более устойчивы к маститам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Awale, M.M., Dudhatra, G.B., Kumar, A., Chauhan, B.N., Kamani, D.R., Modi, C.M., Patel, H.B. and Mody SK. Bovine mastitis: A threat to the economy. [Text] / Awale, M.M // Rep., 1: 295. (2012)
- 2 Magdalena Dusza, Joanna Pokorska, Joanna Makulska, Dominika Kulaj1, Michal Cupial. L-Selectin Gene Polymorphism and Its Association with Clinical Mastitis, Somatic Cell Score, and Milk Production in Polish Holstein-Friesian Cattle. [Text] / Magdalena Dusza // Czech J. Anim. Sci., 63, 2018 (7): 256–262 <https://doi.org/10.17221/96/2017-CJAS>
- 3 Zhang C., Wang Y., Chen H., Gu C. and Fang, X. SLC11A1 gene polymorphisms are not associated to somatic cell score and milk yield in Chinese Holstein. [Text] / Zhang C // Vet. Immunol. Immunopathol., 127(3-4): 389-292. (2009)

- 4 Ankit Magotraa, I.D. Gupta, Tavsief Ahmad, Rani Alex. Polymorphism in DNA repair gene BRCA1 associated with clinical mastitis and production traits in indigenous dairy cattle. [Text] / Ankit Magotraa // Research in Veterinary Science 133 (2020) 194–201
- 5 Fadime Daldaban, Korhan Arslan, Aytaç Akçay, Mahmodul Hasan Sohel, Bilal Akyüz. Association of BRCA1 (G22231T, T25025A, C28300A) polymorphisms with subclinical mastitis and milk yields in Holstein Cattle. [Text] / Fadime DALDABAN // Harran Üniv Vet Fak Derg, 2021; 10 (1): 12-19
- 6 Zhengrong Yuan, Junya Li, Jiao Li, Lupei Zhang, Xue Gao, Hui Jiang Gao, Shangzhong Xu. Investigation on BRCA1 SNPs and its effects on mastitis in Chinese commercial cattle. [Text] / Zhengrong Yuan // Gene 505 (2012) 190–194
- 7 Xiaoyu Fu, Wei Tan, Qibin Song, Huadong Pei and Juanjuan Li. BRCA1 and Breast Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. Frontiers in Cell and Developmental Biology [Text] / Xiaoyu Fu // www.frontiersin.org March 2022 | Volume 10 | Article 813457
- 8 Amir Mehrigou, Mansoureh Akouchekian. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. [Text] / Amir Mehrigou // Med J Islam Repub Iran 2016 (<http://mjiri.iums.ac.ir> 15 May). Vol. 30:369.
- 9 Elmaghraby, M. M., El-Nahas, A. F., Fathala, M. M., Sahwan, F. M. and Tag EL-Dien, M. A. Association of toll-like receptors 2 and 6 polymorphism with clinical mastitis and production traits in Holstein cattle. [Text] / Elmaghraby, M. M // Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University. Vol 19., No 3., Ser. No. 64, 2018.
- 10 Mamoon Noreen, Muhammad Arshad. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. [Text] / Mamoon Noreen // Immunol Res (2015) 62:234–252 DOI 10.1007/s12026-015-8640-6
- 11 M. Maurić Maljković, I. Vlahek, A. Piplica, A. Ekert Kabalin, V. Sušić, V. Stevanović. Prospects of toll-like receptors in dairy cattle breeding. [Text] / M. Maurić Maljković // Animal Genetics. 2023;54:425–434.
- 12 Muhammad Zahoor Khan, Jingjun Wang, Yulin Ma, Tianyu Chen, Mei Ma, Qudrat Ullah, Ibrar Muhammad Khan, Adnan Khan, Zhijun Cao and Shuai Liu. Genetic polymorphisms in immune- and inflammation-associated genes and their association with bovine mastitis resistance/susceptibility. [Text] / Muhammad Zahoor Khan // Frontiers in Immunology. 10.3389/fimmu.2023.1082144
- 13 Sushil Kumar, Ran Vir Singh, Anuj Chauhan, Arvind Sonwane and Subodh Kumar. Candidate Gene Polymorphism vis-a-vis Immune Response to Important Infectious Diseases in Bovines. [Text] / Sushil Kumar // Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci (2018) 7(8): 1820-1834
- 14 Белая Е.В., Ульянов В.А., Чужебаева Г.Д., Бейшова И.С., Нургалиев Б.Е., Ульянова Т.В. Характеристика генетической структуры коров голштинской и черно-пестрой пород по генам лектина, связывающего маннозу и лактоферрина. [Text] / Белая Е.В // Ғылым және білім. Том 1 № 2 (67) (2022) стр 3-14 DOI 10.56339/2305-9397-2022-1-2-3-14
- 15 Indira Beishova, Birzhan Nurgaliyev, Alena Belaya, Gulzhagan Chuzhebayeva, Vadim Ulyanov, Tatyana Ulyanova, Alexandr Kovalchuk, Laura Dushayeva, Kenzhebek Murzabayev, Ainura Taipova, Aizhan Zholdasbekova and Azamat Isabaev. Marking of Genetic Resistance to Chlamydia, Brucellosis and Mastitis in Holstein Cows by Using Polymorphic Variants of LTF, MBL1 and TLR9 Genes. [Text] / Indira Beishova // American Journal of Animal and Veterinary Sciences Volume 18 No. 2, 2023, 89-97 DOI: <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2023.89.97>
- 16 Бейшова И.С., Нургалиев Б.Е., Белая Е.В., Тайпова А. Комбинированные фенотипические эффекты полиморфных вариантов генов LTF, MBL1 и TLR-9 как маркер устойчивости к бруцеллезу у голштинского скота казахстанской селекции. [Text] / Бейшова И.С // Ғылым және білім. №2-3 (68) 2022 стр 17-26 DOI 10.52578/2305-9397-2022-3-2-17-28
- 17 Ульянов В.А., Гинаятов Н.С., Байменов Б.М., Мәлікзада Қ.М., Мендыбаева А.Б. Предпочтительные и нежелательные генотипы генов GH, IGF-1, MBL1 и LTF среди поголовья черно-пестрой породы по признакам молочной продуктивности и качества молока. [Text] / Ульянов В.А // Ғылым және білім Том 1 № 1 (70) (2023) DOI 10.52578/2305-9397-2023-1-1-78-87
- 18 Hiller S., Kowalewska-Luczak I., and Czerniawska-Piatkowska E. Associations between CATHL2 Gene Polymorphism and Milk Production Traits and Somatic Cells Count in Dairy Cattle. [Text] / Hiller S // ISSN 1022-7954, Russian Journal of Genetics, 2020, Vol. 56, No. 3, pp. 383–386.

19 Pokorska J., Dusza M., Kulaj 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. [Text] / Hiller S // Genetics and Molecular Research 15 (2): gmr.15027247 Published April 27, 2016

20 Ningbo Chen, Fengqiao Wang, Nongqi Yu, Yuan Gao, Jieping Huang, Yongzhen Huang, Xianyan Lan, Chuzhao Lei, Hong Chen, Ruihua Dang. Genetic Variations of the Bovine MX1 and Their Association with Mastitis. [Text] / Ningbo Chen // Czech J. Anim. Sci., 62, 2017 (4): 157–167

21 Piotr Minias and Michal Vinkler. Selection Balancing at Innate Immune Genes: Adaptive Polymorphism Maintenance in Toll-Like Receptors. [Text] / Piotr Minias // Mol. Biol. Evol. 39(5):msac102 <https://doi.org/10.1093/molbev/msac102> Advance Access publication May 16, 2022

22 Усенбеков Е.С. Исследование полиморфизма генов LTF и GDF 9 у коров голштинской породы методом ПЦР-ПДРФ анализа. [Text] / Усенбеков Е.С. // Журнал «Вестник государственного университета имени Шакарима города Семей» №2 (74) 2016, стр 170-173

23 Муслимова Ж.У., Ерназарова С.Т., Усенбеков Е. С. ДНК маркеры устойчивости к маститам у коров голштинской породы и методы их идентификации. [Text] / Муслимова Ж.У // Селекционные и технологические аспекты интенсификации производства продуктов животноводства сборник статей по материалам Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 150-летию со дня рождения академика М.Ф. Иванова 3-4 марта 2022 г. ЧАСТЬ I Москва стр 44-49

24 Муслимова Ж.У., Chandra S P., Зиябек Д.Б., Усенбеков Е.С. О предварительных результатах генотипирования коров голштинской породы по локусу гена TLR6 методом ПЦР-ПДРФ анализа. [Text] / Муслимова Ж.У // Сборник международной научно-практической конференции на тему «Перспективные задачи разработки и внедрения инновационных технологий в ветеринарии и животноводстве», 14-15 октябрь, 2022 г Самарканд, стр 1327-1330

25 Усенбеков Е.С., Муслимова Ж.У., Бименова Ж.Ж., Ахметова М.С., Махмудов А.К., Алимбекова М.Е., Хусаинов Д.М. Способ генотипирования крупного рогатого скота по локусу гена TLR6 методом ПЦР-ПДРФ анализа. [Text] / Усенбеков Е.С // 2023. Патент на изобретение РК № 36469

REFERENCES

1 Awale, M.M., Dudhatra, G.B., Kumar, A., Chauhan, B.N., Kamani, D.R., Modi, C.M., Patel, H.B. and Mody SK. Bovine mastitis: A threat to the economy. [Text] / Awale, M.M // Rep., 1: 295. (2012)

2 Magdalena Dusza, Joanna Pokorska, Joanna Makulska, Dominika Kulaj1, Michal Cupial. L-Selectin Gene Polymorphism and Its Association with Clinical Mastitis, Somatic Cell Score, and Milk Production in Polish Holstein-Friesian Cattle. [Text] / Magdalena Dusza // Czech J. Anim. Sci., 63, 2018 (7): 256–262 <https://doi.org/10.17221/96/2017-CJAS>

3 Zhang C., Wang Y., Chen H., Gu C. and Fang, X. SLC11A1 gene polymorphisms are not associated to somatic cell score and milk yield in Chinese Holstein. [Text] / Zhang C // Vet. Immunol. Immunopathol., 127(3-4): 389-292. (2009)

4 Ankit Magotraa, I.D. Gupta, Tavsief Ahmad, Rani Alex. Polymorphism in DNA repair gene BRCA1 associated with clinical mastitis and production traits in indigenous dairy cattle. [Text] / Ankit Magotraa // Research in Veterinary Science 133 (2020) 194–201

5 Fadime Daldaban, Korhan Arslan, Aytac Akçay, Mahmodul Hasan Sohel, Bilal Akyüz. Association of BRCA1 (G22231T, T25025A, C28300A) polymorphisms with subclinical mastitis and milk yields in Holstein Cattle. [Text] / Fadime DALDABAN // Harran Üniv Vet Fak Derg, 2021; 10 (1): 12-19

6 Zhengrong Yuan, Junya Li, Jiao Li, Lupei Zhang, Xue Gao, Hui Jiang Gao, Shangzhong Xu. Investigation on BRCA1 SNPs and its effects on mastitis in Chinese commercial cattle. [Text] / Zhengrong Yuan // Gene 505 (2012) 190–194

7 Xiaoyu Fu, Wei Tan, Qibin Song, Huadong Pei and Juanjuan Li. BRCA1 and Breast Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. Frontiers in Cell and Developmental Biology [Text] / Xiaoyu Fu // www.frontiersin.org March 2022 | Volume 10 | Article 813457

- 8 Amir Mehrgou, Mansoureh Akouchekian. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. [Text] / Amir Mehrgou // Med J Islam Repub Iran 2016 (<http://mjiri.iums.ac.ir> 15 May). Vol. 30:369.
- 9 Elmaghraby, M. M., El-Nahas, A. F., Fathala, M. M., Sahwan, F. M. and Tag EL-Dien, M.A. Association of toll-like receptors 2 and 6 polymorphism with clinical mastitis and production traits in Holstein cattle. [Text] / Elmaghraby, M. M // Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University. Vol 19., No 3., Ser. No. 64, 2018.
- 10 Mamoon Noreen, Muhammad Arshad. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. [Text] / Mamoon Noreen // Immunol Res (2015) 62:234–252 DOI 10.1007/s12026-015-8640-6
- 11 M. Maurić Maljković, I. Vlahek, A. Piplica, A. Ekert Kabalin, V. Sušić, V. Stevanović. Prospects of toll-like receptors in dairy cattle breeding. [Text] / M. Maurić Maljković // Animal Genetics. 2023;54:425–434.
- 12 Muhammad Zahoor Khan, Jingjun Wang, Yulin Ma, Tianyu Chen, Mei Ma, Qudrat Ullah, Ibrar Muhammad Khan, Adnan Khan, Zhijun Cao and Shuai Liu. Genetic polymorphisms in immune- and inflammation-associated genes and their association with bovine mastitis resistance/susceptibility. [Text] / Muhammad Zahoor Khan // Frontiers in Immunology. 10.3389/fimmu.2023.1082144
- 13 Sushil Kumar, Ran Vir Singh, Anuj Chauhan, Arvind Sonwane and Subodh Kumar .Candidate Gene Polymorphism vis-a-vis Immune Response to Important Infectious Diseases in Bovines. [Text] / Sushil Kumar // Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci (2018) 7(8): 1820-1834
- 14 Belaya E.V., Ul'yanov V.A., Chuzhebaeva G.D., Bejshova I.S., Nurgaliev B.E., Ul'yanova T.V. Harakteristika geneticheskoy struktury korov golshtinskoj i cherno-pestroj porod po genam lektina, svyazyvayushchego mannozu i laktoferrina. [Text] / Belaya E.V // Fylym zhəne bilim. Tom 1 № 2 (67) (2022) str 3-14 DOI 10.56339/2305-9397-2022-1-2-3-14
- 15 Indira Beishova, Birzhan Nurgaliyev, Alena Belaya, Gulzhagan Chuzhebayeva, Vadim Ulyanov, Tatyana Ulyanova, Alexandr Kovalchuk, Laura Dushayeva, Kenzhebek Murzabayev, Ainura Taipova, Aizhan Zholdasbekova and Azamat Isabaev. Marking of Genetic Resistance to Chlamydia, Brucellosis and Mastitis in Holstein Cows by Using Polymorphic Variants of LTF, MBL1 and TLR9 Genes. [Text] / Indira Beishova // American Journal of Animal and Veterinary Sciences Volume 18 No. 2, 2023, 89-97 DOI: <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2023.89.97>
- 16 Bejshova I.S., Nurgaliev B.E., Belaya E.V., Tajpova A. Kombinirovannye fenotipicheskie efekty polimorfnykh variantov genov LTF, MBL1 i TLR-9 kak marker ustojchivosti k brucellezu u golshtinskogo skota kazahstanskoy selekcii. [Text] / Bejshova I.S // Fylym zhəne bilim. №2-3 (68) 2022 str 17-26 DOI 10.52578/2305-9397-2022-3-2-17-28
- 17 Ul'yanov V.A., Ginayatov N.S., Bajmenov B.M., Məlikzada K.M., Mendybaeva A.B. Predpochtitel'nye i nezhelatel'nye genotipy genov GH, IGF-1, MBL1 i LTF sredi pogolov'ya cherno-pestroj porody po priznakam molochnoj produktivnosti i kachestva moloka. [Text] / Ul'yanov V.A // Gylym žəne bilim Tom 1 № 1 (70) (2023) DOI 10.52578/2305-9397-2023-1-1-78-87
- 18 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. [Text] / // ISSN 1022-7954, Russian Journal of Genetics, 2020, Vol. 56, No. 3, pp. 383–386.
- 19 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. [Text] / Hiller S // Genetics and Molecular Research 15 (2): gmr.15027247 Published April 27, 2016
- 20 Ningbo Chen, Fengqiao Wang, Nongqi Yu, Yuan Gao, Jieping Huang, Yongzhen Huang, Xianyan Lan, Chuzhao Lei, Hong Chen, Ruihua Dang. Genetic Variations of the Bovine MX1 and Their Association with Mastitis. [Text] / Ningbo Chen // Czech J. Anim. Sci., 62, 2017 (4): 157–167
- 21 Piotr Minias and Michal Vinkler. Selection Balancing at Innate Immune Genes: Adaptive Polymorphism Maintenance in Toll-Like Receptors. [Text] / Piotr Minias // Mol. Biol. Evol. 39(5):msac102 <https://doi.org/10.1093/molbev/msac102> Advance Access publication May 16, 2022
- 22 Usenbekov E.S. Issledovanie polimorfizma genov LTF i GDF 9 u korov golshtinskoj porody metodom PCR-PDRF analiza. [Text] / Usenbekov E.S // Zhurnal «Vestnik gosudarstvennogo universiteta imeni SHakarima goroda Semej» №2 (74) 2016, str 170-173

23 Muslimova ZH.U., Ernazarova S.T., Usenbekov E. S. DNK markery ustojchivosti k mastitam u korov golshtinskoj porody i metody ih identifikacii. [Text] / Muslimova ZH.U // Selekcionnye i tekhnologicheskie aspekty intensivizatsii proizvodstva produktov zhivotnovodstva sbornik statej po materialam Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoj 150-letiyu so dnya rozhdeniya akademika M.F. Ivanova 3-4 marta 2022 g. CHAST' I Moskva str 44-49

24 Muslimova ZH.U., Chandra S P., Ziyabek D.B., Usenbekov E.S. O predvaritel'nyh rezul'tatah genotipirovaniya korov golshtinskoj porody po lokusu gena TLR6 metodom PCR-PDRF analiza. [Text] / Muslimova ZH.U // Sbornik mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii na temu «Perspektivnye zadachi razrabotki i vnedreniya innovacionnyh tekhnologij v veterinarii i zhivotnovodstve», 14-15 oktyabr', 2022 g Samarkand, str 1327-1330

25 Usenbekov E.S., Muslimova ZH.U., Bimenova ZH.ZH., Ahmetova M.S., Mahmutov A.K., Alimbekova M.E., Husainov D.M. Sposob genotipirovaniya krupnogo rogatogo skota po lokusu gena TLR6 metodom PCR-PDRF analiza. [Text] / Usenbekov E.S // 2023. Patent na izobretenie RK № 36469

ТҮЙІН

Желінсау Қазақстан Республикасында сиырлардың сүт өнімділігін төмендететін негізгі факторлардың бірі болып табылады. Сондықтан жұмыстың алдына қойған мақсаты, Алматы облысы Талғар ауданында «Амиран» ЖШС-нің сүт-тауарлы фермасында сиырлардағы желінсауға төзімділігімен байланысты TLR6, BRCA1 ген локустары бойынша голштин тұқымдас сиырларына генотиптеу жүргізу және сүт бездерінің ауруларына төзімді генотиптері бар жануарларды анықтау. TLR6 ген локусы бойынша бақыланатын популяцияда барлық үш генетикалық нұсқа анықталды: TT – 0,94, CT – 0,03, CC – 0,03, алайда бұл гендік локуста генетикалық полиморфизмнің минималды деңгейі екені анықталды. Зерттелген BRCA1 генінің локусында генетикалық полиморфизмнің жоғары деңгейі анықталды: AA – 0,06, AB – 0,42, BB – 0,52. TLR6 генінің локусы бойынша генотиптердің теориялық және нақты таралуы арасындағы гендік тепе-теңдіктің бұзылуы анықталды және χ^2 көрсеткішінің сандық мәні 41,484-ке дейін жоғарылауы анықталды, ал екінші BRCA1 локусы бойынша генетикалық нұсқалардың біркелкі таралуы байқалды және нәтижесінде χ^2 мәні минималды болды, ол 0,0317 құрады. Зерттелетін жануарлардағы TLR6 генінің локусы негізінде желінсауға төзімді генотипі бар жануарларды анықтау мүмкін болмады, өйткені барлық сиырлар гомозиготалы TT генотипіне ие болып шықты. Сиырлардағы клиникалық және субклиникалық желінсаумен ауруы туралы ақпаратты талдау көрсеткеніндей, BRCA1 генінің локусыбойынша гомозиготалы AA және BB генотиптері бар сиырлар желінсаудың клиникалық және субклиникалық түрлеріне төзімдірек екенін көрсетеді. BRCA1 генінің локусы бойынша гетерозиготалы сиырлардағы клиникалық және субклиникалық желінсаудың таралуы сәйкесінше 5,12% және 12,82% құрады. Алынған нәтижелер негізінде голштин тұқымдас сиырларда клиникалық және субклиникалық желінсауларға төзімділігін болжау үшін BRCA1 ген локусы бойынша SNP G22231T полиморфизмін зерттеуді ұсынамыз.

УДК 619:616.2:632.3:636.2

DOI 10.52578/2305-9397-2024-2-1-83-95

МРНТИ 68.41.35, 68.41.63, 68.41.67

Борсынбаева А. М., PhD, ведущий научный сотрудник, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0002-2722-2020>

ТОО «Казахский научный исследовательский ветеринарный институт», Алматы, ул. Райымбека 223, 050016, Республика Казахстан, asiajan@mail.ru

Тургенбаев К.А., доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник, <https://orcid.org/0000-0002-0982-1863>

ТОО «Научно производственный центр «БиоВет», Алматы, ул. Карасай Батыра 191 литер А, 050008, Республика Казахстан, biovet.kaz@mail.ru