

с минимальной инвазивностью до 9,5 %. В осенний период, в конце пастбищного сезона, наблюдалась самая высокая инвазивность крупного рогатого скота, достигшая 25,6 %. В 2023 году самый низкий показатель зафиксирован зимой и составил 17,6 %, а пик зафиксирован в осенние месяцы – 35,1 %. В статье также публикуются результаты лечебных мероприятий эффективными препаратами, применяемыми против стронгилятозов пищеварительного тракта.

УДК 619:578.828.11:636.2

DOI 10.52578/2305-9397-2024-2-1-181-190

МРНТИ 68.41.41; 68.41.53; 68.41.63; 68.41.67; 68.41.05

Канатбаев С.Г., доктор биол. наук, профессор, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0003-0640-4316>

ЧВПОУ «Западно-Казахстанский инновационно-технологический университет», Уральск, пр. Достык, 194, 090000, Казахстан, serik_kg@mail.ru

Петропавловский М.В., доктор вет. наук, <https://orcid.org/0000-0002-9892-6092>

Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, ул. Белинского, 112а, 620142, Россия petropavlovsky_m@mail.ru

Кужебаева У.Ж., магистр вет. наук, <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

Безбородова Н.А., кандидат вет. наук, <https://orcid.org/0000-0003-2793-5001>

Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», Екатеринбург, ул. Белинского, 112а, 620142, Россия, n-bezborodova@mail.ru

Тажбаева Д.Т., магистр вет. наук, <https://orcid.org/0000-0001-7429-7781>

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

Мартынов Н.А., лаборант отдела геномных исследований и селекции животных <https://orcid.org/0000-0001-9251-0056>

Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», Екатеринбург, ул. Белинского, 112а, 620142, Россия, martynov_kolya98@mail.ru

Kanatbayev S.G., doctor of Biological Sciences, professor, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0003-0640-4316>

West Kazakhstan innovative and technological University, Uralsk, Kazakhstan, serik_kg@mail.ru

Petropavlovskiy M.V., doctor of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-9892-6092>

Ural Federal Agrarian Scientific Research Center of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 112a Belinsky str., 620142, Russia, Petropavlovsky_m@mail.ru

Kuzhebayeva U. Zh., Master of Veterinary Sciences, <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

Bezborodova N.A., Candidate of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0003-2793-5001>

Ural Federal Agrarian Scientific Research Center of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 112a Belinsky str., 620142, Russia, n-bezborodova@mail.ru

Tazhbayeva D.T., Master of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0001-7429-7781>

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

Martynov N.A., Laboratory assistant at the Department of Genomic Research and Animal Breeding <https://orcid.org/0000-0001-9251-0056>

Ural Federal Agrarian Scientific Research Center of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 112a Belinsky str., 620142, Russia, martynov_kolya98@mail.ru

**ДИЗАЙН ПРАЙМЕРОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛОВ ПЦР-ПДРФ
ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ УСТОЙЧИВЫХ К ЛЕЙКОЗУ
АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА BOLA-DRB3
PRIMER DESIGN AND OPTIMIZATION OF PCR- RFLP RESEARCH
PROTOCOLS FOR THE IDENTIFICATION OF LEUKEMIA-RESISTANT ALLELIC
VARIANTS OF THE BOLA-DRB3 GENE**

Аннотация

Лейкоз крупного рогатого скота - широко распространенное во всем мире вирусное заболевание. Болезнь встречается как у молочных, так и у мясных пород крупного рогатого скота, однако распространенность заболевания лейкозом выше у высокопродуктивных животных молочного направления. Разработка современных эффективных решений по борьбе с патогеном связана во многом с изучением механизмов устойчивости к лейкозу и в настоящее время работы в этом направлении являются актуальными. Механизмы устойчивости к инфекции связаны с главным комплексом гистосовместимости и цитокиновой сетью, ассоциированными с различными генами. Исследователями установлена взаимосвязь между генотипом BoLA-DRB3 и устойчивостью к лейкозу. Известно, что аллель BoLA класса II DRB3*0902 играет важную иммунологическую роль в подавлении репликации вируса, что приводит к устойчивости к прогрессированию заболевания и снижению вирусной нагрузки. Данные исследования имеют большое значение в разработке эффективных программ борьбы с вирусом лейкоза крупного рогатого скота. В результате проведенной нами работы были подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать высокополиморфный целевой участок гена BoLA-DRB3 длиной в 284 п.н. Оптимизирован и отработан оптимальный протокол постановки ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). На электрофореграммах результатов типирования особей крупного рогатого скота по гену BoLA-DRB3 после обработки ПЦР-продукта эндонуклеазой рестрикции Rsa I, BstY I и Hae III были получены продукты рестрикции, соответствующие конкретным аллельным вариантам гена.

ANNOTATION

Bovine leukemia is a widespread viral disease worldwide. The disease occurs in both dairy and meat breeds of cattle, however, the prevalence of leukemia is higher in highly productive dairy animals. The search for an effective solution to the issue of selection and production of animals resistant to leukemia is relevant. The mechanisms of resistance to infection are associated with the main histocompatibility complex and the cytokine network associated with various genes. Researchers have established a relationship between the BoLA-DRB3 genotype and leukemia resistance. It is known that the BoLA allele class II DRB3*0902 plays an important immunological role in suppressing viral replication, which leads to resistance to disease progression and a decrease in viral load. These studies are of great importance in the development of effective programs to combat the bovine leukemia virus. As a result of our work, primers were selected that allow us to amplify a highly polymorphic target region of the BoLA-DRB3 gene with a length of 284 bp. The optimal protocol for setting PCR-RFLP (polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism) was optimized and worked out. On the electrophoregram of the results of typing cattle individuals according to the BoLA-DRB3 gene, after PCR treatment of the product with restriction endonuclease Rsa I, BstY I and Hae III, restriction products corresponding to allelic variants were obtained.

Ключевые слова: вирус лейкоза, крупный рогатый скот, полимеразная цепная реакция, аллели генов, полиморфизм генов

Key words: leukemia virus, cattle, polymerase chain reaction, gene alleles, gene polymorphism

Введение. Лейкоз крупного рогатого скота - это широко распространенное во всем мире, в том числе и в Республике Казахстан, хроническое вирусное заболевание животных, вызываемое вирусом из семейства *Retroviridae* [1, 2].

Известно, что лейкоз крупного рогатого скота является заболеванием с наследственной предрасположенностью, обусловленной генетическим полиморфизмом [3-5]. Проявление наследственной предрасположенности определяется комплексом генетических и внешних

факторов. В связи с большими экономическими издержками [6, 7], вызванными заболеванием, важным направлением научно-исследовательских работ является изучение генетических механизмов устойчивости животных к лейкозу [8]. Механизмы устойчивости к инфекции связаны с главным комплексом гистосовместимости и цитокиновой сетью, ассоциированными с различными генами. Ген BoLA-DRB3 является одним из ключевых генов главного комплекса гистосовместимости, определяющим первичный иммунный ответ организма на вирусные инфекции [9-14]. Установлена взаимосвязь между генотипом BoLA-DRB3 и устойчивостью к лейкозу [15, 16]. Аллель BoLA класса II DRB3*0902 играет важную иммунологическую роль в подавлении репликации вируса, что приводит к устойчивости к прогрессированию заболевания, снижению провирусной нагрузки (PVL) [17-20]. Это имеет большое значение для разработки эффективных программ борьбы с вирусом лейкоза крупного рогатого скота.

Следует также отметить активное развитие во всем мире маркер-ориентированной селекции крупного рогатого скота, основанной на применении ДНК-маркеров хозяйственно-ценных признаков и устойчивости к инфекционным заболеваниям. Данный факт делает актуальным выбранное нами направление исследований, связанное с оценкой полиморфизма генов устойчивости к лейкозу крупного рогатого скота.

В системе BoLA наиболее полиморфным геном является BoLA - DRB3, а именно второй экзон. В настоящее время согласно базе данных IPD-MHC, существует 384 аллельных варианта данного локуса. Таким образом изучение разнообразия аллелей BoLA-DRB3 гена, распространенных у различных пород крупного рогатого скота в разных географических регионах представляет собой особый интерес, в том числе при разработке стратегии селекции для получения в дальнейшем стад устойчивых к инфекционным заболеваниям. При исследовании голштинской породы крупного рогатого скота, иностранными исследователями было установлено, что основные аллели DRB3 гена, отвечающие за устойчивость к BLV-инфекции являлись *015:01 и *010:01, а аллель *12:01 была связана с восприимчивостью к инфекционному заболеванию [21, 22]. На территории РФ у голштинской породы коров известны наиболее распространенные генотипы - *23/*24, *24/*24, *16/*16, *24/*28, *9/*38, а в исследованной выборке животных большинство аллелей (*2, *9, *26, *37, *38) являлись нейтральными, аллели *23, *24 и *28 связывали с устойчивостью к BLV, а аллель *16 – с восприимчивостью к вирусу лейкоза [14].

В ряде исследований было показано, что полиморфизм BoLA-DRB3 связан с разной степенью восприимчивости к PVL. В частности, отмечается, что аллель DRB3*009:02 ассоциирован с устойчивостью к высокой PVL, а DRB3*011:01 является аллелем устойчивости к лимфоме в большинстве проведенных ассоциативных исследований. Однако другие аллели, коррелирующие с восприимчивостью, различаются у разных пород крупного рогатого скота. Таким образом, стоит более подробно изучить связь между аллельными вариантами BoLA-DRB3 и BLV в разных регионах Республики Казахстан у распространенных в данном регионе пород крупного рогатого скота [23, 24].

Цель исследований - подбор гомологичных праймеров к аллелям гена BoLA-DRB3, отвечающих за устойчивость или восприимчивость к BLV крупного рогатого скота с разработкой оптимального протокола ПЦР-ПДРФ и дальнейшей идентификацией аллельных вариантов BoLA-DRB3 у животных.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена в Западно-Казахстанском инновационно-технологическом университете, лаборатории лейкоза отдела мониторинга и прогнозирования инфекционных болезней животных совместно с отделом геномных исследований и селекции животных Уральского НИВИ – структурного подразделения ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН. Объект исследования – крупный рогатый скот казахской белоголовой породы, разводимый на территории Западно-Казахстанской области. Отбор проб крови производили одноразовыми вакуумными системами в стерильные пробирки типа ЭДТА К3 для молекулярно – генетических и гематологических исследований в количестве 44.

Выделение ДНК из цельной крови осуществляли с использованием набора «Diatom DNA Prep 200» (ООО «ИзоГен», Россия). Качество выделенной ДНК оценивали методом гель-электрофореза. Количественное измерение ДНК проводили на приборе Qubit 4 (Invitrogen, США). Для постановки ПЦР, выявления участков генов BoLA-DRB3 и рестрикции использовали реагенты производства Сибэнзим (Россия).

Для генотипирования крупного рогатого скота с целью оценки аллельного разнообразия в популяции, были подобраны праймеры, способствующие амплификации второго экзона BoLA-DRB3. Для этого был произведен анализ, литературных данных с целью поиска уже существующих синтетических олигонуклеотидов. В результате, была подобрана система праймеров, предложенная van Eijk et al [25], позволяющая производить амплификацию высокополиморфного целевого участка длиной в 284 п.н. (Таблица 1). Для апробации праймерной системы в работе были использовано 10 проб крови крупного рогатого скота, отобранных на территории Западно-Казахстанской области.

Таблица 1 – Характеристика предлагаемых праймеров для амплификации второго экзона BoLA-DRB3 гена

Этапы ПЦР	Праймеры
1 этап ПЦР	HL030: 5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3' HL031: 5'-TTTAAATTTCGCGCTCACCTCGCCGC -3'
2 этап ПЦР	HL030: 5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3' HL032: 5'-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC -3'

Данные праймеры были дополнительно исследованы на специфичность, а также на способность образовывать вторичные структуры (димеры праймеров). Специфичность подобранных праймеров оценивали с использованием онлайн инструмента nucleotide-BLAST [26]. Оценку праймеров на способность образовывать вторичные структуры, проводили с использованием онлайн ПО Multi Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США).

Так же был произведен подбор наиболее оптимального протокола ПЦР, обеспечивающего наработку ПЦР продукта в 284 п.н. без образования неспецифичных фрагментов. Для этого была произведена постановка реакции по градиенту температур и содержанию ионов Mg^{2+} . Градиент температур составлял от 56°C до 64°C, концентрация солей магния варьировали от 0,6мМ до 1,7 мМ.

Для проведения ПЦР-ПДРФ анализа были использованы эндонуклеазы рестрикции, предложенные van Eijk et al [25] (таблица 2).

Таблица 2 – Продукты расщепления эндонуклеаз рестрикции

	RsaI	BstYI	Hae III
a	78/33/30/39/54/50	199/85	167/52/65
b	111/30/39/54/50	284	219/65
c	111/30/93/50	196/85	167/49/65
d	111/30/143	87/197	190/29/65
e	141/39/51/50	87/112/85	167/117
f	141/39/54/50		167/48/65
g	141/39/104		
h	111/69/54/50		
i	180/54/50		
j	78/63/93/50		
k	78/156/50		
l	234/50		
m	111/69/104		
n	180/104		
o	284		
p	111/30/39/51/50		
q	141/90/50		
r	111/30/90/50		
s	141/93/50		

Интерпретацию продуктов гидролиза, также проводили согласно таблице 3.

Таблица 3 – Интерпретация аллельных вариантов BOLA-DRB3 на основании результатов ферментативного гидролиза ПЦР продукта

Аллель	RsaI	BstYI	Hae III
1	a	a	a
2	b	b	a
3	b	b	b
4	c	a	a
5	r	c	c
6	d	a	a
7	e	c	c
8	f	a	a
9	f	d	a
10	f	b	a
11	g	e	a
12	h	a	a
13	h	b	a
14	h	b	b
15	i	b	a
16	j	b	d
17	k	b	d
18	l	b	f
19	s	b	b
20	l	b	b
21	l	b	e
22	m	b	a
23	n	b	a
24	n	b	b
25	o	a	a
26	o	a	b
27	o	b	f
28	o	b	d
29	p	c	c
30	q	c	c

Результаты и их обсуждения. В результате проведенной работы анализ качества выделенной ДНК характеризовали на хорошем уровне, в связи с отсутствием на электрофореграмме неспецифических фрагментов. Среднее значение концентрации выделенной геномной ДНК составляло 80 нг/мкл.

Разработка протокола ПЦР включала в себя подбор компонентов реакционной смеси и оптимизацию температурных циклов. В состав реакционной смеси для 1 этапа ПЦР входили: SE-Буфер производства SibEnzyme (60 mM Трис-НСl (pH 8,6), 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0.1% Трион X-100); 0,18 mM каждого dNTP, по 0,35 мкМ HL030 и HL031; 1,7 mM MgCl₂; 0,31 ед. Таq-полимеразы (SibEnzyme); 30-80 нг ДНК. Амплификацию проводили с использованием

термоциклера SimpliAmp, по оптимизированной программе термоциклирования: начальная денатурация при 95°C в течение 5 минут, затем 10 циклов денатурации при 94°C - 20 секунд, отжиг при 59°C - 20 секунд, синтез при 72°C - 20 секунд, заключительная элонгация при 72°C в течение 10 минут.

В состав реакционной смеси для 2 этапа ПЦР входили: SE-Буфер производства SibEnzyme (60 mM Трис-HCl (pH 8,6), 25 mM KCl, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0.1% Трион X-100); 0,18 mM каждого dNTP, по 0,35 мкМ HL030 и HL032; 1,7 mM MgCl₂; 0,31 ед. Taq-полимеразы (SibEnzyme); 1 мкЛ ПЦР-продукта после 1-го раунда. Амплификацию проводили по схеме: начальная денатурация 95°C - 5 минут, затем 24 цикла денатурации при 94°C - 20 секунд, отжиг при 65°C - 20 секунд, полимеризация при 72°C - 20 секунд, элонгация при 72°C в течение 10 минут.

Ферментативный гидролиз нуклеиновых кислот осуществляли с применением эндонуклеаз рестрикции: *Rsa* I, *Bst*Y I и *Hae* III. Каждый исследуемый образец по завершении реакции ПЦР в концентрации 20 нг/мкл, обрабатывали 5 единицами фермента. Образцы, обрабатываемые *Rsa* I и *Hae* III термостатировали при температуре 37°C, а *Bst*Y I при 65°C в течение 12 часов. Разделение продуктов ПЦР-ПДРФ анализа осуществляли при помощи горизонтального фореа, где в качестве среды для разделения использовали агарозу в концентрации от 5% до 7%. На рисунках 1, 2 и 3 показана электрофореграмма результатов типирования особей крупного рогатого скота по гену *BoLA-DRB3* после обработки ПЦР продукта эндонуклеазой рестрикции *Rsa* I, *Bst*Y I и *Hae* III.

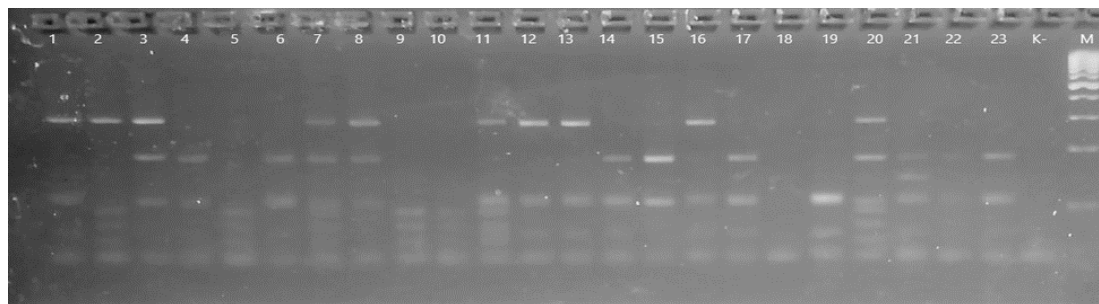


Рисунок 1 – Электрофореграмма результатов типирования особей крупного рогатого скота по гену *BoLA-DRB3* после обработки ПЦР продукта эндонуклеазой рестрикции *RSA* I.

Обозначение: 1-23 – номера проб, К – отрицательный контроль,
М – размерный стандарт шаг 100 п.н.

На рисунке 1 представлена электрофореграмма ПЦР-продукта после обработки эндонуклеазой рестрикции. Расщепление целевого фрагмента *Rsa* I может приводить к образованию различного рода длин фрагментов от 33 п.н. до 284 (при условии отсутствия сайтов узнавания) (Таблица 2).

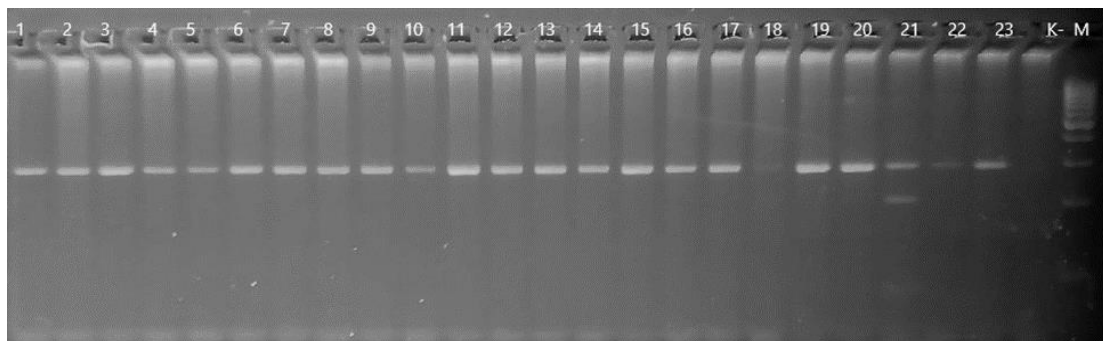


Рисунок 2 – Электрофореграмма результатов типирования особей крупного рогатого скота по гену *BoLA-DRB3* после обработки ПЦР продукта эндонуклеазой рестрикции *BST* YI.

Обозначение: 1-23 – номера проб, К – отрицательный контроль,
М – размерный стандарт, шаг 100 п.н

На рисунке 2, приведено изображение электрофореграммы обработки ПЦР-продукта эндонуклеазой рестрикции *BstYI*. На изображении видно, что это привело к образованию трех длин фрагментов – 284 п.н, 196 и 85 п.н.

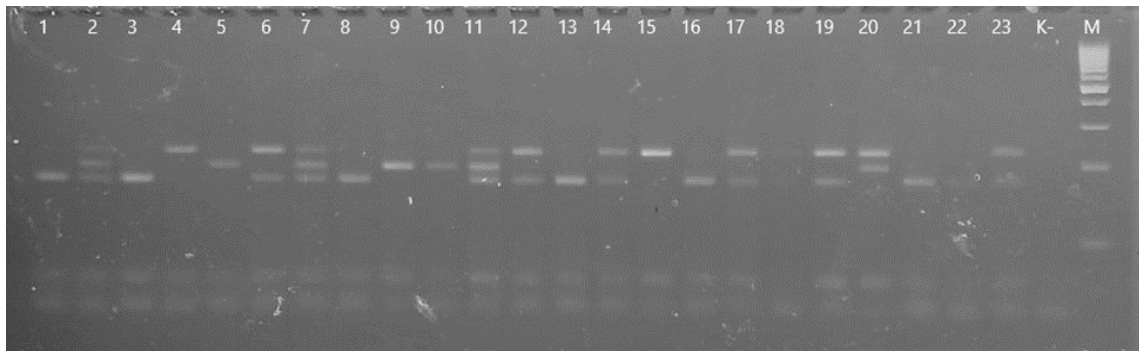


Рисунок 3 – Электрофореграмма результатов типирования особей крупного рогатого скота по гену *HAE III*. Обозначение: 1-23 – номера проб, К- – отрицательный контроль, М – размерный стандарт, шаг 100 п.н.

На рисунке 3, приведено изображение электрофореграммы обработки ПЦР-продукта эндонуклеазой рестрикции *Hae III*. Обработка данным ферментом приводит к образованию шести различного рода генетических паттернов.

Следует отметить, что при интерпретации результатов могут возникнуть трудности, связанные с тем, что некоторые генетические паттерны имеют различия в несколько нуклеотидов. Такие различия сложно обнаружить в системе горизонтального гель-фореза с применением агарозы.

Закключение. Таким образом нами были отработаны праймеры, позволяющие производить амплификацию высокополиморфного целевого участка гена *BoLA-DRB3* длиной в 284 п.н. Также были подобраны оптимальные протоколы постановки ПЦР и ПЦР-ПДРФ. На электрофореграммах результатов типирования особей крупного рогатого скота по гену *BoLA-DRB3* после обработки ПЦР продукта эндонуклеазой рестрикции *Rsa I*, *BstYI* и *Hae III* были получены продукты рестрикции, соответствующие аллельным вариантам продуктов расщепления эндонуклеаз рестрикции. Данные протоколы в дальнейшем будут применяться на биоматериале, полученном из разных регионов Республики Казахстан.

Финансирование. Работа выполнялась в рамках проекта грантового финансирования Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан на 2023-2025 гг. AP19678641 «Оценка полиморфизма гена *BoLA-DRB3*, ассоциированного с устойчивостью к лейкозу, для разработки научно-обоснованных подходов к маркер-ориентированной селекции крупного рогатого скота».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Aida, Y. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus [Text] / Y. Aida, H. Murakami, M. Takahashi et al. // Front. Microbiol. – 2013. – V.4. – P. 328. doi: 10.3389/fmicb.2013.00328.
- 2 Gillet, N. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human [Text] / N. Gillet, A. Florins, M. Boxus et al. // Retrovirology. – 2007. – V. 4. – P.18. doi: 10.1186/1742-4690-4-18.
- 3 Avci, O. BoLA-DRB3.2 gene polymorphism in cattle naturally infected with bovine leukemia virus [Text] / O. Avci, O. Bulut, I. Dik et al. // Pakistan Veterinary Journal. – 2023. – V. 43. – № 1. – P. 174-178. – DOI: 10.29261/pakvetj/2023.001.
- 4 Takeshima, S.N. 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.N. Takeshima, A. Ohno, Y. Aida // Retrovirology. – 2019. – V. 16. – P.10–15. doi: 10.1186/s12977-019-0476-z.

- 5 Lo, C.-W. BoLA-DRB3 polymorphism is associated with differential susceptibility to bovine leukemia virus-induced lymphoma and proviral load [Text] / C.-W. Lo, L. Borjigin, S. Saito et al. // *Viruses*. – 2020. – V.12. – P. 352. doi: 10.3390/v12030352.
- 6 Nekouei, O. Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows [Text] / O. Nekouei, J. VanLeeuwen, H. Stryhn et al. // *Prev. Vet. Med.* – 2016. – 133:1–9. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.09.011.
- 7 Nakada, S. Estimation of economic loss by carcass weight reduction of Japanese dairy cows due to infection with bovine leukemia virus [Text] / S. Nakada, Y. Fujimoto, J. Kohara et al. // *Prev. Vet. Med.* – 2021. – 198:105528. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105528.
- 8 Bai, L. Kinetic Study of BLV Infectivity in BLV Susceptible and Resistant Cattle in Japan from 2017 to 2019 [Text] / L. Bai, L. Borjigin, H. Sato et al. // *Pathogens*. – 2021. – V. 10. – № 10. – P. 1281. – DOI: 10.3390/pathogens10101281.
- 9 Yoshida, T. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows [Text] / T. Yoshida, H. Furuta, Y. Kondo et al. // *Anim. Sci. J.* – 2012. – V. 83. – P. 359–366. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00972.x.
- 10 Rupp, R. Association of Bovine Leukocyte Antigen (BoLA) DRB3.2 with Immune Response, Mastitis, and Production and Type Traits in Canadian Holsteins [Text] / R. Rupp, A. Hernandez, B.A. Mallard // *J. Dairy Sci.* – 2007. – V. 90. – P. 1029–1038. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71589-8
- 11 Duangjinda, M. Association of BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment [Text] / M. Duangjinda, Y. Jindatajak, W. Tipvong et al. // *Vet. Parasitol.* – 2013. – V. 196. – P. 314–320. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.03.005.
- 12 Othman, O.E. Five BoLA-DRB3 genotypes detected in Egyptian buffalo infected with Foot and Mouth disease virus serotype O [Text] / O.E. Othman, M.G. Khodary, A.H. El-Deeb et al. // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* – 2018. – V. 16. – P. 513–518. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.02.009.
- 13 Morales, J.P.A. Association of BoLA DRB3 gene polymorphisms with BoHV-1 infection and zootechnical traits [Text] / J.P.A. Morales, A. López-Herrera, J.E. Zuluaga // *Open Vet. J.* – 2020. – V. 10. – P. 331–339. doi: 10.4314/ovj.v10i3.12.
- 14 Безбородова, Н.А. Оценка частоты распространения аллельных вариантов полиморфизма экзона 2 гена BoLA-DRB3 с использованием ПЦР-ПДРФ / Н. А. Безбородова, М. В. Бытов, Н. А. Мартынов и др. [Текст] // *Российская сельскохозяйственная наука*. – 2023. – № 4. – С. 52-55. DOI 10.31857/S2500262723040105.
- 15 Behl, J.D. The major histocompatibility complex in bovines: a review [Text] / J.D. Behl, N.K. Verma, N. Tyagi et al. // *ISRN veterinary science*. – 2012. – P. 1-12. DOI: 10.5402/2012/872710.
- 16 Takeshima, S. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan [Text] / S. Takeshima, N. Saitou, M. Morita et al. // *Gene*. – 2003. – V. 316. – P. 111–118. – DOI: 10.1016/s0378-1119(03)00744-3.
- 17 Gutiérrez, S.E. Major Histocompatibility Complex-Associated Resistance to Infectious Diseases: The Case of Bovine Leukemia Virus Infection [Text] / S.E. Gutiérrez, E.N. Esteban, C.M. Lützelshwab et al. // *InTech*. – 2017. – P. 1-27. DOI: 10.5772/65804.
- 18 Lo, C.-W. Association of BoLA-DRB3 with bovine leukemia virus [Text] / C.-W. Lo, Y. Aida // *Major Histocompatibility Complex*. – 2022. – V. 29. – №3. – P. 158-167. – DOI: 10.12667/mhc.29.158.
- 19 Nakatsuchi, A. BoLA-DRB3 Polymorphism Controls Proviral Load and Infectivity of Bovine Leukemia Virus (BLV) in Milk [Text] / A. Nakatsuchi, S. Watanuki, L. Borjigin et al. // *Pathogens*. – 2022. – V. 11. – P. 210. doi: 10.3390/pathogens11020210.
- 20 Borjigin, L. Risk assessment of bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles for perinatal transmission of bovine leukemia virus [Text] / L. Borjigin, C.-W. Lo, L. Bai et al. // *Pathogens*. – 2021. – V. 10. – P. 502. doi: 10.3390/pathogens10050502
- 21 Hamada, R. BoLA-DRB3 Polymorphism Associated with Bovine Leukemia Virus Infection and Proviral Load in Holstein Cattle in Egypt [Text] / R. Hamada, S. Metwally, R. Matsuura et al. // *Pathogens*. – 2023. – V. 12(12) – P. 1451. doi:10.3390/pathogens12121451
- 22 Dung, T. Association between BoLA-DRB3 polymorphism and bovine leukemia virus proviral load in Vietnamese Holstein Friesian cattle [Text] / T. Dung, L. Vu, S. Nguyen et al. // *HLA*. – 2022. – V. 99. – P. 105–112. doi: 10.1111/tan.14503.

23 Farias, M.V.N. novel association of BoLA DRB3 alleles in BLV infected cattle with different proviral loads [Text] / M.V.N. Farias, M.E. Caffaro et all. // Archives. – 2017. – V. 54 (3). – P. 215–224. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.123769.

24 Hayashi, T. Cattle with the BoLA class II DRB3*0902 allele have significantly lower bovine leukemia proviral loads [Text] / T. Hayashi, H. Mekata, S. Sekiguchi et all. // J. Vet. Med. Sci. – 2017. – V. 79. – P. 1552–1555. doi: 10.1292/jvms.16-0601.

25 Van Eijk, M.J.T. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP [Text] / M.J.T. Van Eijk, J.A. Stewart-Haynes, H.A. Lewin // Animal genetics. – 1992. – T. 23. – №. 6. – P. 483–496.

26 Ye, J. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction [Text] / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya et all. // BMC bioinformatics. – 2012. – V. 13. – P. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

REFERENCES

1 Aida, Y. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus [Text] / Y. Aida, H. Murakami, M. Takahashi et all. // Front. Microbiol. – 2013. – V.4. – P. 328. doi: 10.3389/fmicb.2013.00328.

2 Gillet, N. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human [Text] / N. Gillet, A. Florins, M. Boxus et all. // Retrovirology. – 2007. – V. 4. – P.18. doi: 10.1186/1742-4690-4-18.

3 Avci, O. BoLA-DRB3.2 gene polymorphism in cattle naturally infected with bovine leukemia virus [Text] / O. Avci, O. Bulut, I. Dik et all. // Pakistan Veterinary Journal. – 2023. – V. 43. – № 1. – P. 174–178. – DOI: 10.29261/pakvetj/2023.001.

4 Takeshima, S.N. 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.N. Takeshima, A. Ohno, Y. Aida // Retrovirology. – 2019. – V. 16. – P.10–15. doi: 10.1186/s12977-019-0476-z.

5 Lo, C.-W. BoLA-DRB3 polymorphism is associated with differential susceptibility to bovine leukemia virus-induced lymphoma and proviral load [Text] / C.-W. Lo, L. Borjigin, S. Saito et all. // Viruses. – 2020. – V.12. – P. 352. doi: 10.3390/v12030352.

6 Nekouei, O. Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows [Text] / O. Nekouei, J. VanLeeuwen, H. Stryhn et all. // Prev. Vet. Med. – 2016. – 133:1–9. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.09.011.

7 Nakada, S. Estimation of economic loss by carcass weight reduction of Japanese dairy cows due to infection with bovine leukemia virus [Text] / S. Nakada, Y. Fujimoto, J. Kohara et all. // Prev. Vet. Med. – 2021. – 198:105528. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105528.

8 Bai, L. Kinetic Study of BLV Infectivity in BLV Susceptible and Resistant Cattle in Japan from 2017 to 2019 [Text] / L. Bai, L. Borjigin, H. Sato et all. // Pathogens. – 2021. – V. 10. – № 10. – P. 1281. – DOI: 10.3390/pathogens10101281.

9 Yoshida, T. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows [Text] / T. Yoshida, H. Furuta, Y. Kondo et all. // Anim. Sci. J. – 2012. – V. 83. – P. 359–366. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00972.x.

10 Rupp, R. Association of Bovine Leukocyte Antigen (BoLA) DRB3.2 with Immune Response, Mastitis, and Production and Type Traits in Canadian Holsteins [Text] / R. Rupp, A. Hernandez, B.A. Mallard // J. Dairy Sci. – 2007. – V. 90. – P. 1029–1038. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71589-8

11 Duangjinda, M. Association of BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment [Text] / M. Duangjinda, Y. Jindatajak, W. Tipvong et all. // Vet. Parasitol. – 2013. – V. 196. – P. 314–320. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.03.005.

12 Othman, O.E. Five BoLA-DRB3 genotypes detected in Egyptian buffalo infected with Foot and Mouth disease virus serotype O [Text] / O.E. Othman, M.G. Khodary, A.H. El-Deeb et all. // J. Genet. Eng. Biotechnol. – 2018. – V. 16. – P. 513–518. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.02.009.

13 Morales, J.P.A. Association of BoLA DRB3 gene polymorphisms with BoHV-1 infection and zootechnical traits [Text] / J.P.A. Morales, A. López-Herrera, J.E. Zuluaga // Open Vet. J. – 2020. – V. 10. – P. 331–339. doi: 10.4314/ovj.v10i3.12.

- 14 Bezborodova, N.A. Ocenka chastoty rasprostraneniya allel'nyh variantov polimorfizma ekzona 2 gena BoLA-DRB3 s ispol'zovaniem PCR-PDRF / N.A. Bezborodova, M.V. Bytov, N.A. Martynov i dr. [Tekst] // Rossijskaya sel'skohozyajstvennaya nauka. – 2023. – № 4. – S. 52-55. DOI 10.31857/S2500262723040105.
- 15 Behl, J.D. The major histocompatibility complex in bovines: a review [Text] / J.D. Behl, N.K. Verma, N. Tyagi et al. // ISRN veterinary science. – 2012. – P. 1-12. DOI: 10.5402/2012/872710.
- 16 Takeshima, S. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan [Text] / S. Takeshima, N. Saitou, M. Morita et al. // Gene. – 2003. – V. 316. – P. 111–118. – DOI: 10.1016/s0378-1119(03)00744-3.
- 17 Gutiérrez, S.E. Major Histocompatibility Complex-Associated Resistance to Infectious Diseases: The Case of Bovine Leukemia Virus Infection [Text] / S.E. Gutiérrez, E.N. Esteban, C.M. Lützelshwab et al. // InTech. – 2017. – P. 1-27. DOI: 10.5772/65804.
- 18 Lo, C.-W. Association of BoLA-DRB3 with bovine leukemia virus [Text] / C.-W. Lo, Y. Aida // Major Histocompatibility Complex. – 2022. – V. 29. – №3. – P. 158-167. – DOI: 10.12667/mhc.29.158.
- 19 Nakatsuchi, A. BoLA-DRB3 Polymorphism Controls Proviral Load and Infectivity of Bovine Leukemia Virus (BLV) in Milk [Text] / A. Nakatsuchi, S. Watanuki, L. Borjigin et al. // Pathogens. – 2022. – V. 11. – P. 210. doi: 10.3390/pathogens11020210.
- 20 Borjigin, L. Risk assessment of bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles for perinatal transmission of bovine leukemia virus [Text] / L. Borjigin, C.-W. Lo, L. Bai et al. // Pathogens. – 2021. – V. 10. – P. 502. doi: 10.3390/pathogens10050502
- 21 Hamada, R. BoLA-DRB3 Polymorphism Associated with Bovine Leukemia Virus Infection and Proviral Load in Holstein Cattle in Egypt [Text] / R. Hamada, S. Metwally, R. Matsuura et al. // Pathogens. – 2023. – V. 12(12) – P. 1451. doi:10.3390/pathogens12121451
- 22 Dung, T. Association between BoLA-DRB3 polymorphism and bovine leukemia virus proviral load in Vietnamese Holstein Friesian cattle [Text] / T. Dung, L. Vu, S. Nguyen et al. // HLA. – 2022. – V. 99. – P. 105–112. doi: 10.1111/tan.14503.
- 23 Farias, M.V.N. novel association of BoLA DRB3 alleles in BLV infected cattle with different proviral loads [Text] / M.V.N. Farias, M.E. Caffaro et al. // Archives. – 2017. – V. 54 (3). – P. 215–224. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.123769.
- 24 Hayashi, T. Cattle with the BoLA class II DRB3*0902 allele have significantly lower bovine leukemia proviral loads [Text] / T. Hayashi, H. Mekata, S. Sekiguchi et al. // J. Vet. Med. Sci. – 2017. – V. 79. – P. 1552–1555. doi: 10.1292/jvms.16-0601.
- 25 Van Eijk, M.J.T. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP [Text] / M.J.T. Van Eijk, J.A. Stewart-Haynes, H.A. Lewin // Animal genetics. – 1992. – T. 23. – №. 6. – P. 483-496.
- 26 Ye, J. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction [Text] / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya et al. // BMC bioinformatics. – 2012. – V. 13. – P. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

ТҮЙІН

Ірі қара малдың лейкозы бүкіл әлемде кең таралған вирустық ауру. Ауру ірі қара малдың сүтті және етті тұқымдарында кездеседі, алайда лейкоз ауруының таралуы сүтті бағытындағы жоғары өнімді жануарларда жоғары. Лейкозға төзімді жануарларды іріктеу және өндірудің тиімді шешімін табу өзекті мәселе болып табылады. Инфекцияға төзімділік механизмдері әртүрлі гендермен ассоциацияланған негізгі гистосәйкестік кешенімен және цитокиндік желімен байланысты. Зерттеушілер BoLA-DRB3 генотипі мен лейкозға төзімділік арасында байланысы бар екенін анықталды. DRB3*0902 II класты BoLA аллелі вирустың репликациясын басуда маңызды иммунологиялық рөл атқаратыны белгілі, бұл аурудың өршуіне төзімділікке және вирустық жүктеменің төмендеуіне әкеледі. Бұл зерттеулер малдың лейкоз вирусымен күресудің тиімді бағдарламаларын әзірлеуде үлкен маңызға ие. Біз жүргізген жұмыстың нәтижесінде ұзындығы 284 ж.н. BoLA-DRB3 генінің жоғары полиморфты арнайы бөлігін күшейтуге мүмкіндік беретін праймерлер таңдалды. ПТР- РФҰП (полимеразды тізбекті реакция - рестрикциялық фрагменттерінің ұзындығының полиморфизмі) қояудың оңтайлы хатамасы оңтайландырылды және пысықталды. Rsa I, BstY I және Hae III эндонуклеазді рестрикциямен ПТР өнімін өңдеуінен кейін BoLA-DRB3 гені бойынша ірі қара мал үлгілерін типтеу нәтижесінде электрофореграммаларда аллельді нұсқаларға сәйкес келетін рестрикция өнімдері алынды.