С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған **«Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру»** атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының **материалдары** = **Материалы** Республиканской научно-теоретической конференции **«Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее»**, посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - **2017. - Т.I, Ч.2. -** Б.3-7

РЕПРОДУКТИВТІК ҚЫЗМЕТТІ БАҒАЛАУДЫҢ ЗАМАНАУИ МОЛЕКУЛЯРЛЫҚ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ӘДІСТЕРІ

***Бименова Ж.Ж.**, PhD докторант*
***Усенбеков Е.С.,** кафедра меңгерушісі, б.ғ.к.*
«Қазақ ұлттық аграрлық университеті»
коммерциялық емес акционерлік қоғамы, Алматы қ.

Америка ғалымдарыұрықтану индексі жоғары және ұрықтану индексі төмен асыл тұқымды бұқалардың шәуетін молекулярлық-генетикалық әдістермен бағалап, осы тексерілген тест жүйелерінің нәтижелері мен спермийлердің ұрықтану қабылеті арасындағы оң корреляцияны анықтаған. Сперматогенез үрдісі аталық жануарларда енде орналасқан ирек түтікшелерде жүреді және осы процесстің ұзақтығы 30-40 тәулікті құрайды, нәтижесінде ұрықтануға жарамды белсенді спермийлер түзіледі. Зерттеулерге сәйкес, спермийлер құрамында протамин және гистон протеиндері бар, спермийлердің жетілу дәрежесіне қарай протамин мен гистонның ара қатынасы өзгереді.

Авторлар өз жұмыстарында асыл тұқымды бұқалардың шәуетіндегі спермийлердегі ДНҚ фрагментациясының деңгейін және спермийлердің ядросындағы протамин мен гистон протеиндерінің мөлшерін анықтаған. Спермийлердің ұрықтану қабылеті спермийлердің хроматиндерінің сақталуымен тікелей байланысты және түрлі қолайсыз факторлар (шәует қатыру кезіндегі технологиялық ақаулар, қатыруға қолданатын криогендік компоненттердің қорғаныс қабылетінің төмен болуы) спермийлердің ДНҚ фрагментациясына ұшырауына әкеліп соқтырады, соның нәтижесінде спермийлердің ұрықтану қабылеті төмендейді. Алынған нәтижелерге сәйкес ұрықтану индексі төмен бұқаларда ДНҚ фрагментациясы деңгейі жоғары болған және ол7,01 (±0.71) құраған, ал ұрықтану индексі жоғары бұқаларда аталған көрсеткіш төмен болған 4,13 (± 0,26) [1].

Спермийлер түзілу процессінде және жетілуінде аса маңызды сатылардың бірі спермийлер құрамындағы гистон протеинінің протаминге айналуы. Қалыпты жағдайда жетілген спермилердің хроматинінде шамамен 85%-дан төмен емес деңгейде протамин болады, ал спермийлер толықтай жетілмеген кездерде керісінше гистонның мөлшері 15%-дан жоғары көтеріліп кетеді. Протаминдер жоғарғы деңгейдегі протеиндер болып табылады, олардың құрамында көп мөлшерде аргинин және аз мөлшерде цистеин амин қышқылдары бар. Спермийлердің ядросындағы протеиндердің мөлшерін анықтауға келесі қағидаларға негізделген, құрамында көп

мөлшерде лизин амин қышқылы болатын гистон протеині «Aniline Blue» бояуымен бояғанда (спермийлердің бастары қаныққан көк түске) қаныққан көк түске боялады, ал құрамында аргинин және цистеин аминқышқылдары көп протамин протеині күлгін түске боялады.

Аталған әдіс жиі медицинада, ер адамдардың шәуетіндегі спермилер ядросындағы протамин және гистон протеиндерінің мөлшерін анықтауға кең қолданылады. Әдіс жедел жүргізіледі, ер адамға байланысты болған бедеулікке балау жасауда аса маңызды зерттеу тәсілі болып табылады және спермийлер түзілуіне байланысты болған бедеулікті анықтауға мүмкіндік береді [2].

Жапон ғалымдары сиырлардың көбею қызметі мен TNFα (tumor necrosis factor – ісік некрозы факторы) локусы бойынша генетикалық варианттары, аллельдерідің арасындағы байланысты зерттеген және осы ген аллельдерінің сиырлардың репродуктивтік қызметі, иммундық деңгейі арасындағы корреляцияны анықтаған. Зерттеу нәтижесінде тәжірибе тобындағы сиырларда TNFα генінің промоторлық және экзондық бөліктерінде кездесетін, келесі генетикалық варианттардыңсәйкесінше, промоторлық және экзондық бөліктеріндеA/A, A/G, G/G және T/T, T/C, C/C бар екенін дәлелдеген.

Сиырларда TNFαлокусы бойынша генетикалық варианттар мен осы ген аллельдерінің арасында сиырлар туғаннан кейін мерзім мен бірінші овуляция аралығында, сиырлардың иммундық жүйесі арасында байланыстар анықталған. ДНҚ полиморфизмі TNFαпромоторлық және экзондық бөліктерінде кездескен. Молекулярлық-генетикалық зерттеулер нәтижесі, аталған геннің экспрессия деңгейі осы локус бойынша сиырларды генотиптеу практикалық тұрғыдан маңызды екенін көрсеткен. Сиырлардың генотипін анықтауға полимераздық тізбек реакциясы (ПТР), рестриктелган фрагменттер ұзындықтарының полиморфизмі (РФҰП) тәсілдері қолданылған[3].

Арнайы әдебиетке жүргізілген шолу көрсеткеніндей, сиырлардың жыныстық қызметін болжау және оңтайлы генотипті төлдер алу үшін ДНҚ маркерлерін, соның ішінде TNFα,GDF 9 локустары бойынша генотип анықтаудың маңызы отандық ғалымдардың зерттеулерінде көрсетілген. Қазіргі таңда, аналық жануарларда репродуктивтік қызметті (фолликулогенез, овуляция, доминатты фолликулдер даму ерекшеліктері) реттейтін гендердің маңызы үлкен[4].

Зерттеу жұмыстарының мақсаты – бұқа шәуетіндегі спермийлердің ұрықтану қабылетін in vitro жағдайында молекулярлық-генетикалық әдістермен балау, асыл тұқымды сиырларды TNFα локусы бойынша генотиптеу арқылы олардың репродуктивтік қызметіне болжау жасау.

Материалдар мен зерттеу әдістері.Алматы облысы Талғар ауданы «Амиран» ЖШС шаруашылығында қолдан ұрықтандыруға қолданылатын 6 бас асыл тұқымды бұқалардың қатырылған шәуетіндегі спермийлердің ұрықтану қабылетін анықтау жұмыстары 2016 -2017 жылдары Қазақ ұлттық аграрлық университетінің акушерлік, хирургия және өсіп-өну

биотехнологиясы кафедрасының зертханасында Үндінің «Sperm Processor Pvt. Ltd» компаниясы өндіретін «Nuclear Protein Assay» sperm nuclear protein assay using «Aniline Blue» жиынтығын пайдалану арқылы жүргізілді.

Қатырылған, көлемі 100 мкл шәует үлгісіне 400 мкл физиологиялық ерітінді қосып, оны центрифугада жылдамдығы 2000g айналымда 2-3 минут ішінде айналдырдық. Қатырылған бұқа шәуетін,1 мл шәуеттегі спермийлер саны 40-60 млн болатындай етіп сұйылттық. Сосын, дозатордың көмегімен жоғарғы бөліктегі сұйытықты алып тастап, тұнба бөлігінен 5 мкл сұйықтық алып, заттық шыныға жағынды дайындадық, 5-7 минут ішінде ауада құрғаттық. Заттық шыныны горизонтальдық жағдайда қойып, жағындының үстіне 1 мл бекемдейтін ерітінді тамыздық, ерітінді жағындыны толықтай жабуы керек, ұстау уақытысы 5 минут. 5 минут уақыт өткен соң, бекемдейтін ерітіндіні төгіп, заттық шыныны ішінде дисдильденген су бар ыдыста ұстадық, жағындыны бекемдейтін ерітіндіден тазарттық. Келесі сатыда, заттық шыныны кептіріп, 5 минут ішінде №1 бояумен боядық, көлемі 1мл, жағындыны толықтай жабатындай бояу қостық. Сосын бояуды дисдильденген сумен шайып, ауада кептіріп, осы сатыны №2 бояумен қайталадық, ұстау уақытысы 2 минут.

Осылай дайындалған препаратты микроскоптың 100Хұлғайтуымен иммерсиялық майды қолдана отырып зерттедік. Көру алаңында басы күлгін түске боялған спермийлер санын (құрамында протамин бар екенін көрсетеді) санадық және басы қанық көк түске боялған спермийлер санын анықтадық (құрамында гистон бар екенін көрсетеді). Барлығы бірнеше көру алаңдарында 200 спермийлер санап, құрамында протамин, жетілген спермийлер және гистон, жетілмеген спермийлердің мөлшерін пайызбен есептедік.

ДНҚ фрагментация әдісімен спермийлерді зерттеуҮндінің «Sperm Processor Pvt. Ltd» компаниясы өндіретін «DNA Fragmentation User Manual sperm chromatin dispersion test» жиынтығын пайдалану арқылы «Амиран» ЖШС асыл тұқымды бұқаларында 2016-2017 жылдары жиынтықтың нұсқауына сәйкес жүргізілді. Арнайы бояулармен бояу арқылы дайындалған үлгілерді микроскоппен иммерсиялық майдың көмегімен зерттеп, онда спермийлердің үш түрін анықтадық: фрагментацияға ұшырамаған спермийлер, фрагментацияға ұшыраған және дегенерация болған спермийлер.

Голштеин тұқымдас сиырларды TNFαлокусы бойынша генотиптеу жұмыстары Алматы облысы Талғар ауданы «Байсерке-Агро» ЖШС шаруашылығында 2015-2017 жылдары 152 бас сиырларда жүргізілді. Зерттеуге қажетті қанды сиырлардың күре тамырынан ваккумдық, ішіде ЭДТА бар пробиркаларға алдық. Алынған қан үлгілерінен ДНҚ бөлу Ресей Федерациясы Бүкілресейлік генетика және малды өсіру ҒЗИ, Санкт-Петербург-Пушкин қаласында молекулярлық цитогенетика зертханасында жүргізілді. TNFα локусы бойынша сиырлады генотиптеу Қазақ ұлттық аграрлық университетіне қарасты Қазақ-Жапон инновациялық орталығындағы ДНҚ технологиясы зертханасында жүргізілді.

Қаннан ДНҚ бөлу үшін фенол әдісін қолдандық. Көлемі 1 $см^3$болатын қан үлгісіне көлемі теңдей, құрамы төмендегідей буфер қостық 100 мМ Трис-20 мМ ЭДТА-10 мМ NaCl, pH = 8,0 және 5 минут ішінде центрифугада жылдамдығы 5000g айналыммен айналдырдық. Алынған тұнбаны осылай екінші рет жоғарыда аталған буфермен, көлемі 400 мкл шайып алдық. Сосын, дайындалған суспензияға 5 мкл протеиназа К (20 мг/мл) ферментін және 25 мкл додецилсульфат натрийдің (ДСН). 10% ерітіндісін қостық. Мұхият араластырдық. Келесі саты, 3 сағат ішінде температурасы 55°С термостатта ұстадық. Сосын (pH = 8,0) фенолды теңдей көлемде қосып, алынған қоспаны 15 минут ішінде шайқадық, сосын жылдамдығы 10000g айналымда центрифугада айналдырдық, жоғарғы фазадағы ДНҚ ерітіндісі бар судан тұратын бөлігін мұхият дозатордың көмегімен сорып алдық. Центрифугада айналдырғанда, пробиркада келесідей 4 фаза пайда болады: 1) пробирка түбіндегі тұнба, торшалардың қалдықтары, 2) фенолдан тұратын фаза, құрамында еріген протеиндер бар, 3) интерфаза, құрамында денатурацияға ұшыраған, бірақ ерімеген протеиндер бар, 4) жоғарғы фаза, тазартылған ДНҚ сумен бірге. Фенолмен тазалауды екі рет қайталадық, толықтай интерфазада протеиндерден арылу үшін. Алынған ДНҚ-ның судағы ерітіндісіне 1/10 қатынасындай көлемде 3М натрий ацетаты ерітіндісін және ½ қатынасындай көлемде салқын температурадағы этанолды қостық. Осы кезде ДНҚ көзге көрінетін сәті, сосын ДНҚ 70° этанолмен тұздардың қалдықтары мен фенолдан тазарту үшін шайдық. ДНҚ-ны бөлме температурасында шамалы кептіріп, бөлініп алынған ДНҚ-ны ТЕ буферінде ерітеміз. Осылай бөлініп алынған ДНҚ температурасы -20 °Стоңазтқышта сақталады.

TNFα генінің қажетті фрагментін амплификациялау үшін әдебиеттен алынған келесі праймерлер қолданылды[3], праймерлер тізбектері тура праймерF 5′-GAGAAATGGGACAACCTCCA-3′және кері праймер R: 5′-CCAGGAACTCGCTGAAACTC - 3′. Аталған праймерлер қолдану TNFα генінің 249 ж.н. тұратын фрагментін амплификациялауға мүмкіндік берді, ал алынған ПТР өнімін идентификациялау үшін, генотипін анықтау мақсатында SacI рестриктазасын пайдаландық, оның сайт рестрикциясы келесі тізбектерден GAGCT/C тұрады.

Полимераздық тізбек реакциясын қою кезінде амплификацияның сәтті жүруі екі түрлі маңызды факторларға байланысты: реакциялық қоспа құрамындағы $MgCl_2$ концентрациясына және праймерлердің жабысу температурасына. Магний хлоридтің реакциялық қоспадағы концентрациясы жоғарылаған сайын ДНҚ молекуласының синтезделуі артады, бірақ қажетті емес амплификация қатар жүреді (арнайы емес амплификация). Біздің эксперименттерде амплификация магний хлоридтің концентрациясы реакциялық қоспада 1,5 мМ болған жағдайда жүрді, ал праймерлер жабысуының қолайлы температурасы 60 ^{0}С болды. ПТР жүргізетін реакциялық қоспаның көлемі 50 мкл құрады, оның құрамы келесі компоненттерден тұрды: 5 мкл 10Х ПТР буфері, 1,5 мМ $MgCl_2$, 2,5 мкл 25 мкМ тура және кері праймерлерден, 5 мкл 0,2 мМ концентрациялыәрбір

dNTP, 0,4 мкл белсенділігі 5U/мклTaq Polymerase ферментінен, 5 мкл ДНҚ үлгісінен және 26,5 мкл бидистилденген судан.

Зерттеу нәтижелері және талдау.Бүгінгі таңда сиырлар мен құнажындарда қолдан ұрықтандыру кезінде ұрықтану индексі жоғары болып отыр, сондықтан шәуетті бағалауға дәстүрлі әдістермен қатар заманауи молекулярлық-генетикалық әдістерді енгізу өндіріс талабына сәйкес келеді. «Амиран» ЖШС қарасты 6 бас асыл тұқымды бұқалардың қатырылған шәуетіндегі спермийлер құрамында тек протамин бар екені анықталды, ол спермийлер толық жетілген, ұрықтану қабылеті жоғары екенін көрсетеді.

ДНК фрагментация әдісімен барлығы 6 бас асыл тұқымды бұқалардың спермийлері тексерілді, зерттеу үлгілеріндегі ДНҚ фрагментацияға ұшырамаған спермийлер саны 80,65 %-дан 86,1% аралығында болды, ал ДНҚ фрагментацияға ұшыраған спермийлер мөлшері 17,15%- және 13,0 %-құрады, дегенерацияға ұшыраған спермийлер 2,2 % - 0,9% көлемінде болды. Экспериментальдық жолмен түрлі теріс факторлардың, спермийлердің ДНҚ фрагментациясына ұшырауына әкеліп соқтыратыны анықталды, спермий үлгілерін бір тәулік бөлме температурасында сақтап, осы әдіспен ДНҚ фрагментациясын анықтағанда, 100%-спермийлерде ДНҚ фрагментация және дегенерация болғаны анықталды.

Экспериментальдық жолмен TNFα локусы бойынша ПТР жүргізудің қолайлы параметрлері анықталған: алғашқы ДНҚ денатурациясы 94 °С – 5 минут, екінші сатыда - денатурация 94 °С – 30 сек, праймерлердің жабысуы – 60 °С 30 сек және элонгация 72 °С температурасында 30 сек, циклдер саны 35, алынған амплификат ұзындығы 249 жұп нуклеотид, алынған ПТР өнімін SacI рестриктазасымен кескенде түзілетін фрагменттер: 249 ж.н., 168 ж.н. және 81 ж.н. үлгілердегі сиырлардың генотиптеріне байланысты

Голштеин тұқымдас 152 бас сиырлардың генотипі TNFα локусы бойынша полимераздық тізбек реакциясымен және алынған ПТР өнімін SacI рестриктазасымен кесу арқылы зерттегенде кездескен генетикалық варианттар: генотип GG - 21 баста, AG -97 баста, AA - 34 баста кездесті, немесе олардың таралуы сәйкесінше, 13,81%, 63,81% және 22,38% құрады, кең таралған сиырлардағы генотип гетерозиготалыAG генотипі болды, ал TNFα генінің алелльдерінің жиілігі А- 54, G-46.

Сүт өндіретін ірі қара мал шаруашылықтарында сиырлар мен құнажындардың генетикалық потенциалын көтеру мақсатында оладың генотиптерін TNFα локусы бойынша анықтау, оңтайлы генотипті төлдер алуға мүмкіндік береді. Асыл тұқымды бұқалардың спермийлерінің ұрықтану қабылетін in vitro жағдайында анықтауға дәстүрлі әдістермен қатар спермийлердегі ДНҚ фрагментация деңгейін анықтауды және спермий ядроларындағы протамин және гистон протеиндерінің мөлшерін зерттеуді ұсынамыз.

Әдебиеттер тізімі

1Sule Dogan, Peter Vargovic, Rodrigo Oliveira, Lauren E. Belser, Abdullah Kaya, Arlindo Moura, Peter Sutovsky, John Parrish, Einko Topper, and

Erdog˘an Memili. Sperm Protamine-Status Correlates to the Fertility of Breeding Bulls. BIOLOGY OF REPRODUCTION (2015) 92(4):92, 1–9

2David Miller, Martin Brinkworth and David Iles. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sumof its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. Reproduction (2010) 139 287–301

3Yurie Kawasaki , Yuka Aoki , Fumie Magata , Akio Miyamoto, Chiho Kawashima, Takuo Hojo, Kiyoshi Okuda , Koumei Shirasuna and Takashi Shimizu. The Effect of Single Nucleotide Polymorphisms in the Tumor NecrosisFactor-α Gene on Reproductive Performance and Immune Function inDairy Cattle. Journal of Reproduction and Development, 2014, Vol. 60, No 3

4Усенбеков Е.С. Генотипирование коров голштинской породы по локусу лактоферрина и изучение полиморфизма гена GDF-9 методом полимеразной цепной реакции. «Пути продления продуктивной жизни молочных коров на основе оптимизации разведения, технологий содержания и кормления животных», 28-29 мая 2015 г. ВИЖ, Дубровицы, 2015