

«Сейфуллин окулары – 18: « Жастар және ғылым – болашаққа көзқарас» халықаралық ғылыми -практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: « Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022.- Т.1, Ч.III. - Б.97-100

## **ГОЛШТЕИН ТҰҚЫМДАС СИЫРЛАРЫНДА ӨСІП ӨНУ ҚЫЗМЕТІМЕН БАЙЛАНЫСТЫ SNP ПОЛИМОРФИЗМДЕРДІ МОЛЕКУЛЯРЛЫҚ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ӘДІСТЕРМЕН ЗЕРТТЕУ**

*Ахметова М. С., 2 курс PhD докторанты  
Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы қаласы*

Ірі қара малдың репродуктивті қызметінің генетикалық негіздерін зерттеудің практикалық маңызы зор, оның ішінде экономикалық пайдалы белгілермен байланысты SNP полиморфизмдерінің зерттеу. Мәліметтерге сәйкес голштеин сиырларындағы сүт өнімділігінің үнемі артуы аясында репродуктивті функцияның төмендеуі байқалады, ғалымдар бұл төмендеуді генетикалық факторлармен байланыстырады. Сиырлардың өсіп өну қызметінің төмендеуі - бұл сүтті мал шаруашылығының маңызды мәселесі және қарқынды таңдалған және мамандандырылған ірі қара мал тұқымдарында кездесетін инбридингің салдары. Уақыт өте келе ұрғашы малдың репродуктивті функциясының үнемі төмендеуі қазіргі сүтті мал шаруашылығы саласындағы маңызды мәселе болып табылады. Бұл төмендеудің жартысы ғана сүт өндіруге іріктеудің жанама реакциясымен түсіндіріледі, бұл эмбрионалдық өлімге әкелетін генетикалық ақаулар сияқты басқа факторлардың болуын болжайды [1].

Жануарлардың репродуктивті белсенділігі - бұл бұқа және сиырлардың өнімділігі,, жануарлардың денсаулығы, табынды басқару, қоршаған орта, азықтану сияқты көптеген факторларға байланысты күрделі белгі. Демек, сиырлардың репродуктивті функциялары үшін тұқым қуалаушылық әдетте өте төмен (0,02-ден 0,04-ке дейін) және асыл тұқымды бұқаларда сәл жоғары (0,05-тен 0,22-ге дейін). Ғалымдар ірі қара малдағы сүт, ұрықтандырғыш, инфекцияларға төзімділік және т. б. сияқты экономикалық пайдалы белгілерге үміткер гендерін іздеу бойынша зерттеулер жүргізуде. Сонымен, зерттеу жұмысының авторлары ұрықтандырғыш және буаздық деңгейінің (РТА) ұрғашы малдың ұрпаққа берілу қабілетін болжау сияқты фенотиптік белгілерімен байланысқан сиырларда 68 SNP полиморфизмдерін анықтады. Сиырлардың репродуктивті функциясымен байланысты келесі - STAT5A, FGF 2, PGR, CAST, FSHR, IGF1, NLRP9 белгілі болды. Аталған гендер-кандидаттар төлдеу аралық кезеңнің ұзақтығымен, ұрықтандыру индексімен, егіздердің туылуымен, өлі туылулармен, түсіктер болуымен байланысты [2].

Қазіргі уақытта сиырлардың репродуктивті функциясымен байланысты SNP полиморфизмдерін келесі топтарына: коэнзим Q9 (COQ9), Kiss1, STAT5A гендерінің локустары жатады. Бұл ретте сиырлардың репродуктивтік функциясын бағалаудың өлшемдері мынадай параметрлер

болып табылады: ұрықтану деңгейі (service per conception, SPC), ашық күндер саны (number of open days), төлдеу арасындағы аралық ұзақтығы (calving interval), қайта ұрықтандыру коэффициенті (on-return rate; NRR), олар зерттелетін гендер аллельдерінің сиырлар мен құнажындардың репродуктивті функциясына ассоциативті әсерін дәл анықтауға мүмкіндік береді. Ғалымдар зерттеулерінде көбеюге әсер ететін кейбір мутациялар, мысалы, Q9 коэнзим геніндегі (COQ9) бір нуклеотидті полиморфизм аллелі (SNP) A (18:25527339) голштейн сүт сиырының толық геномын ассоциативті зерттеу барысында анықталды. STAT5 ақуызының белсенділігінің бұзылуы сары дене жетіспеушілігіне және бедеулікке әкеледі және жануарлар ұрықтанғыштының, эмбриондардың өмір сүруінің, сондай-ақ сүт өндірісі мен құрамының төмендеуімен байланысты болды [3]. Дамыған мемлекеттерде сүт бағытындағы ірі қара малының өнімділігін болжау және іріктеу мақсатында геномдық селекция технологиясы қолданылады. Сондықтан еліміздің сүт бағытындағы ірі шаруашылықтарда пайдалы экономикалық белгілерімен байланысты: сүттілік, сүт құрамы, ет өнімділігі, репродукция қызметі көрсеткіштерімен байланысты SNP полиморфизмдерді зерттеу теориялық және практикалық жағынан маңызды.

**Жұмыстың мақсаты** – Алматы облысы Талғар ауданы «Байсерке-Агро» ЖШС асыл тұқымды шаруашылығындағы сиырларды коэнзим Q9 (COQ9), STAT5A, Kiss1 ген локустары бойынша генотиптеу тәсілдерін оңтайластыру және ПТР-РФҰП талдау әдісіне арналған праймерлер тізбектерін дизайн жасау үшін Primer 3 компьютерлік бағдарламасын пайдаланудың тиімділігін анықтау. Жұмыстың міндеттері: Q9 (COQ9), STAT5A, Kiss1 гендері тізбектерін NCBI сайты арқылы тексеру, праймер дизайнын жасауға Primer 3 пайдалану артықшылықтарын анықтау.

**Зерттеу материалдары мен әдістері.** Зерттеу жұмыстары Қазақ Ұлттық Аграрлық зерттеу университеті «Қазақ - Жапон инновациялық орталығына» қарасты «Жасыл биотехнология және торшалық инженерия» зертханасында 2022 жылы жүргізілді. Алматы облысы Талғар ауданы ЖШС «Байсерке-АГРО» шаруашылығының 200 бас голштейн тұқымдас сиырларының құйрық тамырынан ДНҚ алу үшін антикоагулянт ретінде этилендиаминтетрацет қышқылы (ЭДТА) бар пробиркаға жиналған қан үлгілері қолданылды және пайдаланғанға дейін ол үлгілер  $-4^{\circ}\text{C}$  температурада қатырылып сақталады. Коэнзим Q9 (COQ9), STAT5A, Kiss1 гендерінің локусы бойынша ДНҚ үлгілерін генотиптеуге арналған праймерлердің дизайны келесі ретпен жүргізілді: NCBI сайтында аталған гендерді іздеу, SNP полиморфизм локализациясының орнын анықтау, Primer 3 бағдарламасын қолдана отырып праймерлердің дизайнын анықтау.

Полимераздық тізбек реакциясын жүргізу барысында ПТР хаттамасын қолдана отырып Q9 (COQ9), STAT5A, Kiss1 гендерін амплификацияладық: алғашқы денатурация сатысы  $95^{\circ}\text{C}$  температурада 5 минут ішінде, екінші сатысы, денатурация  $95^{\circ}\text{C}$ -та 30 секунд, сосын праймерлердің жабысуы (отжиг)  $54^{\circ}\text{C}$ -та 30 секунд ішінде (STAT5A үшін  $64^{\circ}\text{C}$ , Kiss1 үшін  $60^{\circ}\text{C}$ ), элонгация сатысы  $72^{\circ}\text{C}$ -та 30 секунд ішінде және аяқтаушы синтез  $72^{\circ}\text{C}$ -та

5 минутқа созылды. ПТР өнімдерін бөліп алғаннан кейін, біз фрагменттерді 4% агарозды геледегі электрофорез арқылы бромды этидий бояумен боялған және ультрақұлгін сәулемен қараумен талдадық.

Сиырлардың COQ9 гені локусы бойынша аллельдік типтерін анықтау үшін Forward 5'-AGTTTCTGTTTCAGTGCCCCG-3' және Reverse 5'-GCAGGTGTTCTGATGCCTACC-3' праймерлер қолданылды, алынған ПТР өнімінің ұзындығы 202 ж.н., гендік аллельдерді анықтау Sau3A1 рестриктазасымен кесу арқылы жүзеге асырылды. Sau3A1 рестриктазасының анықтау сайты GATC/CTAG, рестрикция жасауға оңтайлы инкубация температурасы 37°C, оған B буфері сәйкес келеді. STAT5A генінің аллельдік типтерін анықтау үшін Forward 5'-GAGAAGTTGGGAGATTATC-3' және Reverse 5'-CCGTGTGTCCTCATCACCTG-3' праймерлер қолданылды, алынған ПТР өнімінің ұзындығы 347 ж.н., гендік аллельдерді анықтау BstEII эндонуклеазасымен кесу арқылы жүзеге асырылды. BstEII рестриктазасының анықтау сайты G/GTNACC, мұндағы N - белгісіне A,G,C және T нуклеотиттеріне сәйкес келеді, инкубациялық температурасы 37°C, D буферін қолдану ұсынылған. Kiss1 генінің аллельдерін анықтау үшін Forward 5'-AACTATATGGCGCGAGGGC-3' және Reverse 5'-CCCAGACAACATACCTGTGG-3' праймерлер қолданылды, алынған ПТР өнімінің ұзындығы 334 ж.н., гендік аллельдерді анықтау SfoI рестриктазасымен кесу арқылы жүзеге асырылды. SfoI рестриктазасының анықтау сайты GGC/GCC, инкубациялық температурасы 37°C, NEBuffer 2 буферін қолдану ұсынылған. Генотиптеу жұмыстарын жүргізу қолданған ПТР арналған реакция қоспасының құрамы келесідей: көлемі 25 мкл, ПТР-ға арналған 10xПТР буфері -2,5 мкл, 0,2 мМ концентрациясы әр түрлі dNTP қоспасы - 4,0 мкл, тура және кері праймерлер, әрқайсысы 1,0 мкл, 25 мМ MgCl<sub>2</sub> – 1,5 мкл, Taq ДНҚ полимераза 0,2 мкл, концентрациясы 10 бірлік/мкл және ДНҚ үлгісі 3, 0 мкл, деонизирленген су көлемі 25,0 мкл жеткенше қосады.

Амплификация үрдісін нәтижелі жүргізу үшін ең алдымен бөліп алған ДНҚ сапасына, концентрациясы мен тазалығының деңгейін тексеру аса маңызды. Сонымен қатар ДНҚ үлгілерінде ингибиторларының болмауын қамтамасыз ету қажет. ПТР жүргізу кезінде реакцияға теріс әсер болдырмау мақсатында біз қан алу үшін құрамында ЭДТА бар вакуумдық түтікшелер қолдандық. Үлгілерден бөліп алынған ДНҚ сапасын микроспектрофотометрикалық талдау әдісімен (NanoDrop™ 2000) өлшедік, бір мезгілде ДНҚ тазалығын анықтау үшін осы A260/A280 екі толқында өлшенген, өлшем бірліктің қатынасын зерттедік.

**Зерттеу нәтижелері.** Зерттеу тобындағы 200 бас сиырлардың генотиптері Kiss1 ген локусы бойынша ПТР-РФҰП талдау әдісінің көмегімен анықталды. Эксперименттер барысында ПТР жүргізу шарттары анықталып, амплификация нәтижелі жүрді және ұзындығы 334 ж.н. тұратын өнім алынып, ол ген аллельдерін идентификация жасау үшін SfoI рестриктазасымен гидролиз жасалды. Арнайы әдебиетке көрсетілген ақпаратқа сәйкес, алынған өнім 334 ж.н., рестриктазамен кескеннен кейін CC генотипті жануарларда

292 ж.н., 42 ж.н. болып, ал гетерозиготалы сиырларда СТ генотипімен 334 ж.н., 292 ж.н., 42 ж.н. болып және гомозиготалы ТТ генотипті организмдерде 334 ж.н. фрагменттері пайда болуы керек еді. Бірақ, біздің эксперименттерде барлық 200 үлгісі аталған рестриктазамен кесілмеді, басқаша айтқанда зерттеу тобындағы голштейн тұқымдас сиырларында осы, Kiss1 генінің локусы бойынша генетикалық полиморфизм болмады. Алынған нәтижені, голштейн тұқымдас сиырларында осы ген локусы бойынша полиморфизм жоқ, ал Kiss1 гені локусы бойынша әдебиеттерде көрсетілген SNP полиморфизм тек Үнді мемлекетінің аборигендік тұқымдас сиырларында ғана бар екенін көрсетеді. Зерттеуге алынған ДНҚ үлгілері сонымен қатар Q9 (COQ9), STAT5A гендерінің локустары бойынша амплификация жасау шарттары оңтайландырылды. Сонымен, репродуктивтік қызмет параметрлері мен генотиптер арасындағы байланысты бағалау үшін біз қажетті ген фрагментін (COQ9 - гені), амплификация жасау сәттілігі ең алдымен, тура және кері праймерлердің тізбегін таңдаудың дұрыстығына байланысты. Сондықтан, праймерлер тізбегін дұрыс анықтау үшін NCBI сайтының (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ақпаратын пайдалану отырып Fasta форматындағы тиісті коэнзим генінің тізбектерін анықтап алдық. Сосын праймер тізбектерінің дизайнын жасау үшін онлайн форматта Primer3 бағдарламасын (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) пайдаландық. Осы әдісті қолданудың артықшылығы - праймерлер тізбегіндегі қателерді болдырмау, праймерлерді жабысу температурасын дәл анықтау, праймерлер тізбектеріндегі GC нуклеотидтерінің пайыздық үлесін анықтау практикалық тұрғыдан аса маңызды.

Сиырларда STAT5A гені локусы бойынша праймерлер тізбектерін Primer3 бағдарламасының көмегімен анықтадық: тура праймер 5'-AGAACCGGCAGCAGATCC-3', жабысу температурасы 59.41°C және кері праймер R 5'-GATGGGAGGAGGGTGTGAG-3', жабысу температурасы 58.78°C. Дайындалған праймерлердің артықшылықтары: тура праймер құрамында GC нуклеотидтерінің үлесі 61%, кері праймер тізбегінің құрамында осы көрсеткіш 63,0%, сонымен бірге тура және кері праймерлер оңтайлы C және G нуклеотидтерімен аяқталады. Зерттеу нәтижелері көрсеткеніндей, ДНҚ концентрациясының төменгі концентрациясы 0,7 ng/μl-ден 6,6 ng/μl-ге дейін аралығында, ортаңғы концентрациясы мөлшері 100,2 ng/μl-ден 199,4 ng/μl-ге дейін, ДНҚ үлгілеріндегі жоғарғы концентрациясы 47,33 ng/μl-ден 922,5 ng/μl-ге дейін жоғары болды.

**Қорытынды.** Голштейн тұқымдас сиырларды коэнзим Q9 (COQ9), STAT5A ген локустары бойынша генотиптеу шарттары оңтайландырылды, Kiss1 ген локусы бойынша 200 бас сиырларына генотиптеу жүргізіліп, осы зерттеу тобында аталған Kiss1 гені бойынша полиморфизмнің жоқ екені дәлелденді. Эксперименттер көрсеткеніндей, ген аллелдерін идентификация жасау үшін NCBI сайтының ақпаратын қолдану, ген тізбектерінің гомологиясын анықтау аса маңызды зерттеу сатысы болып табылады, тура және кері праймерлердің тізбегін жобалау үшін Primer 3 бағдарламасын пайдалану қарапайым және тиімді.

## *Әдебиет мизімі*

1Fritz S., Capitan A., Djari A., Rodriguez S.C., Barbat A., Baur A., Grohs C, Weiss B., Boussaha M., Esquerre D., Klopp CH., Rocha D., Boichard D (2013). Detection of Haplotypes Associated with Prenatal Death in Dairy Cattle and Identification of Deleterious Mutations in GART, SHBG and SLC37A2. PLOS One, 8: e65550.DOI: 10.1371/journal.pone.0065550

2M. Sofia Ortega, Anna C.Denicol, John B.Cole, Daniel J.Null, Jeremy F.Taylor, Robert D.Schnabel, Peter J.Hansen. Association of single nucleotide polymorphisms in candidate genes previously related to genetic variation in fertility with phenotypic measurements of reproductive function in Holstein cows. Journal of Dairy Science. Volume 100, Issue 5, May 2017, Pages 3725-3734

3Néstor Gerardo Michel-Regalado<sup>1</sup>, Miguel Anim Reprod. Effect of COQ9 and STAT5A polymorphisms on reproductive performance in a Holstein cow herd in Mexico. 2020;17(3):e20200039 | <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0039>