

«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.93-97

СИЫРЛАРЫНДАҒЫ ЖЕЛІНСАУҒА ТӨЗІМДІЛІКПЕН БАЙЛАНЫСТЫ SNP ПОЛИМОРФИЗМДЕРІ ЗЕРТТЕУ МЕН СҮТ ҚАРЫМДАҒЫ SCC САНЫН, АНТИБИОТИК ҚАЛДЫҚТАНЫН АНЫҚТАУДЫҢ МАҢЫЗЫ

*Муслимова Ж. У., 2 курс PhD докторанты
Қазақ Ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы қаласы,*

Ғалымдардың зерттеуі бойынша CXCR1 генінің локусы бойынша полиморфизмді ПТР-РФҰП талдау әдісінің көмегімен келесі SNP полиморфизмдері бойынша зерттелген: с.+291с>Т, с.+365Т>С, С.+816С>А, с.+819G>А, +1093С>Т, және +1373С>А, олардың төртеуі геннің ақпарат беру аймағында, ал екеуі CXCR1 генінің 3' фланкирлеу бөлігінде орналасқан. Зерттеуге 146 бас голштейн тұқымдас сиырдың биологиялық материалы алынған, клиникалық желінсаудың жиілігіне байланысты сиырлар екі топқа бөлінген. ПТР-РФҰП талдау нәтижелері бойынша гаплотиптердің алты комбинациясын құрайтын үш гаплотип (СССАТА, ТТАGСС, СТCGСС) анықталған. Ғалымдардың пікірінше, регрессиялық талдауы бойынша с. + 365Т> С генотипі мен сиырлардың клиникалық желінсауына төзімділігі арасында $P= 0,047$ дәлдікпен айтарлықтай байланыс бар екені көрсетілген [1].

Әдебиетте CATHL2 генінің аллельдері мен сүттегі соматикалық жасушалардың санымен ассоциативті байланысы анықталған және бұл өз кезегінде сиырлардағы субклиникалық желінсау ауруымен байланысты. Авторлар зерттеулерін голштейн тұқымдас сиырларында жүргізген және генотиптерді анықтау үшін ACRS және PCR-RFLP әдістері қолданылған. Жүргізілген эксперименттердің нәтижелері бойынша CATHL2 генінің локусындағы генетикалық нұсқалардың жиілігі, SNP 807G> А болды: GG - 0,636, GA - 0,323 және AA-0,041. CATHL2 генінің аллельдерінің сиыр сүтіндегі соматикалық жасушалардың санымен нақты байланысы анықталған, бұл сиырлардың желінсауға төзімділігінің маңызды көрсеткіші болып табылады. CATHL2 генінің аллельдерін анықтау үшін тура F -5'-GAGCTAGACCCTACACCCATT-3' және кері R-5'-AGGCTCACCCCATTTCTCCTTGAA -3' праймерлер таңдалып алынған, амплификат ұзындығы 253 ж.н., MseI эндонуклеазасымен кесу сайты T/ТАА [2].

Сүттегі соматикалық жасушалар саны (somatic cell counts, SCC) - бұл сүт құрамындағы жасушалар мен иммундық жасушалардың көрсеткіші. Сүт безінің ішінде эпителий жасушаларының жүйелі түрде жаңаруы жүреді, әдетте ескі жасушалар өліп, қабылданбайды. Сау сиырдың сүтінде әдетте аз мөлшерде соматикалық жасушалар болатыны белгілі. Бұл желіннің эпителий

жасушалары, лейкоциттер және эритроциттер. Физиологиялық норма бойынша сүттегі соматикалық жасушалардың саны 1 мл сүтте 100-ден 500 мыңға дейін болады. Желінсаудың субклиникалық формасы мен клиникалық желінсау формалары 1 мл сүтте соматикалық жасушалардың көбеюімен сипатталады, әдетте бұл көрсеткіш 500 мың немесе одан да көп [3].

Осылайша, сүттегі соматикалық жасушалардың саны көптеген факторларға байланысты: жануардың жасы, сиырдың физиологиялық жағдайы, лактация айлары, сүт безінің патологиясы. Сүттегі соматикалық жасушалар саны мен сиырлардың репродуктивті функциясы арасында тікелей байланыс бар, яғни сүттегі соматикалық жасушалар санының азаюы сиырлардың ұрықтану қабілетінің жоғарылауымен бірге жүреді. Сүттегі SCC анықтаудың әртүрлі әдістері бар, автоматтандырылған немесе арнайы құрылғылардың көмегімен сүт безінің әр түрлі бөліктеріндегі сүтті зерттейді, бұл балау қоюдың дәлірек әдісі немесе жеке сиырдың сүтіндегі жасушалардың санын анықтайды, кейде жалпы жиналған сүтті (бүкіл табын) зерттейді. Қазіргі уақытта әдебиеттерде 1 мл сүттегі соматикалық жасушалардың оңтайлы мөлшері туралы қарама-қарсы пікірлер бар. Шетелдік ғалымдардың пікірінше, құрама сүттегі 200 мың немесе одан аз жасушалардың құрамы фермадағы сиырлардың жақсы күйін көрсетеді, егер 1 мл сүттегі жасушалардың саны 500 мың немесе одан да көп болса, бұл субклиникалық маститі бар сиырлар санының көбеюін көрсетеді.

Қазіргі уақытта сүт фермаларында жануарларды азықтандыру мен ұстаудың қарқынды технологиясының нәтижесінде көбею мүшелері мен сүт бездерінің аурулары, сүт сиырларындағы тірек-қимыл жүйесінің патологиясы, ақсақтық байқалады. Ауру жануарларды емдеу хаттамасына әдетте микробқа қарсы препараттарды, соның ішінде антибиотиктерді қолдану кіреді, антибиотиктердің қалдық мөлшерін ағзадан шығару уақыты көбінесе микробқа қарсы препараттарды соңғы қабылдағаннан кейін 15-20 күнге жетеді. Ветеринарияда ірі қара малдағы ауруды тоқтату және тиімді емдеу үшін антибиотиктер көп қолданылады. Мал шаруашылығында антибиотиктердің жетпістен астам түрі қолданылатыны белгілі. Зерттеулер көрсеткендей, терапевтік препараттар мал өнімдерінде ұзақ уақыт тұра алады және өніммен бірге адам ағзасына енуі мүмкін. Сүт өнімдерінде негізінен антибиотиктердің қалдық мөлшері кездеседі, бұл сүттің биологиялық және технологиялық қасиеттерін төмендетеді. Негізінен ветеринария төрт негізгі антибиотиктердің қалдық құрамын бақылайды: левомецетин, стрептомицин, тетрациклин және пенициллин [3].

Ескеретін жағдай, сүттегі соматикалық жасушаларды (SCC) анықтаудың үлкен практикалық маңызы бар, сонымен қатар осы зерттеу сүттің технологиялық өңдеуге жарамдылығын анықтауға мүмкіндік береді, егер құрама сүттегі соматикалық жасушалардың саны рұқсат етілген нормадан асып кетсе, мұндай сүт технологиялық өңдеуге жатпайды. Лактация кезеңіне байланысты сүттегі соматикалық жасушалардың өзгеру динамикасын зерттеу, гендік аллельдердің соматикалық жасуша құрамына әсерін зерттеу теориялық маңызға ие.

Жұмыстың мақсаты - асыл тұқымды сүт шаруашылығында голштейн тұқымдас сиырларында MASP2, CATHL2 гендерінің локустары бойынша генотиптеу жүргізу және сиырлардың сүтінің құрамындағы SCC саны мен антибиотик қалдықтарын анықтау болып табылады.

Зерттеу материалдары мен әдістері. Генотиптеу жұмыстарын жүргізу үшін «Байсерке-Агро» сүт өндіретін шаруашылығындағы голштейн тұқымдас сиырларының қанынан бөлініп алынған 87 ДНҚ үлгілері қолданылды, ген аллелдерін анықтау ПТР-РФҰП талдау әдісінің көмегімен жүзеге асырылды. MASP2 генінің фрагментін амплификация жасау үшін тура F -5'-GTTTGTGGGAGGAATAGTGTC-3' және кері R -5'-AGTTAAGTAGTGGAGAGTGGC-3' праймерлері қолданылды. Аллельдерді анықтау жұмыстары FOK1 эндонуклеазасының көмегімен жүзеге асырылды, рестриктазаның тану сайты – GGATG(N)9, инкубация температурасы 37 °C – 2 сағат, 65°C – 20 мин. Жануарлардың генотипіне байланысты 305 ж.н. тұратын амплификатты FOK1 эндонуклеазасымен кесуден кейін келесі фрагменттер пайда болады: гомозиготалы TT: 305 ж.н., гетерозиготалы TC: - 305 ж.н., 230 ж.н., 143 ж.н., 74 ж.н. және гомозиготалы CC -230 ж.н., 143 ж.н., 74 ж.н.

ДНҚ үлгілерін CATHL2 генінің локусы бойынша генотиптеу келесі праймерлерді қолдану арқылы жүргізілді: тура F -5'-GAGCTAGACCCACCCATT-3' және кері -5'-AGGCTCACCCATTCTCCTTGAA-3', амплификат ұзындығы 253 ж.н. CATHL2 генінің аллелдерін анықтау үшін MseI рестриктазасы қолданылды, тану сайты: T/ТАА. Гомозиготалы жануарларда MseI эндонуклеазамен кескеннен кейін түзілетін фрагмент – 253 ж.н. (GG генотипі), гетерозиготалы (GA генотипі) жануарларда 253 ж.н., 233 ж.н., 20 ж.н. фрагменттер, гомозиготалы (AA генотипі) жануарларда 233 ж.н., 20 ж.н. фрагменттері пайда болады. Амплификация нәтижелері этидий бромидімен боялған 3% агарозды гельмен горизонталдық электрофорез көмегімен тексерілді. Сиырлардың сүтінің құрамында SCC санын анықтау FOSSOMATICTM FC қондырғысының көмегімен ҚазҰАЗУ Agro Hub сүт өнімдерінің референттік зертханасында жүргізілді, сиыр сүті үлгілеріндегі антибиотиктердің қалдығын анықтау үшін Garant 4 Ultra Milk жүйесі қолданылды. Келесі зерттеу жұмыстарының міндеттеріне сәйкес, сиырлардан сүт үлгілері таңертеңгі сауу кезінде залалсыздандырылған пробиркаларға алынды, ол үлгілер 2-3 сағат ішінде ҚазҰАЗУ сүт өнімдерінің референттік зертханасына жеткізілді және FOSSOMATICTM FC (Somatic cell counting for raw milk testing) қондырғысының көмегімен сүттегі соматикалық жасушаларды саны анықталды. Бұл құрылғы 1 мл сүттегі жасушалардың санын 10 миллион жасушаға дейін анықтауға мүмкіндік береді, FOSSOMATICTM FC құрылғысының жұмыс қағидасы өлшеу болып табылады, яғни соматикалық жасушаларды есептеу үшін ағынды цитометрия әдісі, ол қағида IDF және FDA/NCIMS талаптарына сәйкес келеді. Ағынды цитометрия әдісінің мәні-сүттегі бөлшектер мен жасушаларды санау және сипаттау үшін қолданылатын әдіс. SCC мөлшерін өлшеу 18 сүт үлгісінде, екі сиырдан 8

үлгі, 5 жеке сүт үлгісі, оның ішінде клиникалық желінсау түрімен ауыратын 1 үлгі және 5 жалпы құрама сүт үлгілері болды.

Зерттеу нәтижелері. Зерттеу жұмысында 87 бас голштейн тұқымдас сиырлардың генотиптерін CATHL2 генінің локусы бойынша анықталды, CATHL2 генінің фрагментін амплификациялау сәтті өтті, ПТР өнімі электрофорограммада айқын көрінеді, ұзындығы 253 ж.н. CATHL2 ген локусы бойынша алынған ПТР өнімі әдебиетке көрсетілген деректерге сәйкес MseI рестриктазасымен кесілу керек болған, бірақ біздің жұмыстарымызда амплификат кесілмеді, басқаша айтқанда голштейн тұқымдас зерттеу тобы популяциясында осы геннің полиморфизмі анықталмады. MASP2 генінің фрагментін амплификация жасау нәтижесінде ұзындығы 305 ж.н., амплификат алынды, ПТР өнімі FOK1 эндонуклеазасымен тек бір жағдайда кесіліп, гетерозиготалы генотипті көрсетті (305 ж.н., 230 ж.н., 143 ж.н., 74 ж.н.).

Тиісті сынамананы дайындағаннан кейін FOSSOMATICM FC қондырғысының көмегімен сүт үлгілеріндегі соматикалық жасушалардың саны анықталды. Дені сау сиырлардағы желіннің 4 бөлігіндегі сүтіндегі соматикалық жасушалардың саны 1 мл сүтте 15 мыңнан 60 мыңға дейін аралықта болды, жеке №9103 сиырда сол жақ алдыңғы бөлігінде жасушалар саны 207 мыңға жетті. Екінші дені сау сиырда жасушалар саны 9 мыңнан 24 мың аралығында болды. Жеке үлгілерден сүт құрамындағы SCC саны 1 мл-де 7 мыңнан 65 мыңға дейін болды, желінсаудың клиникалық формасы бар сиырда SCC соматикалық жасушалар саны 1 мл-де 21 350 мыңға дейін жетті. Жиналған сүттегі SCC соматикалық жасушалардың саны 1 мл сүтте 410 мыңнан 458 мыңға дейін көрсеткішті құрады.

Сонымен қатар сүт үлгілеріндегі антибиотиктің төрт тобының қалдық мөлшерінің құрамын талдау ANKAR 100 маркалы қондырғысының және β-лактама, тетрациклин топтарын, стрептомицин мен хлорамфениколды (левомоцитин) сүттегі антибиотиктерді бір мезгілде анықтауға арналған Garant 4 Ultra Milk жүйесінің экспресс-тест жиынтығын пайдалана отырып жүргізілді. Бұл жедел тесттің жұмыс принципі β-лактамармен, тетрациклиндермен, стрептомицинмен және хлорамфениколмен бәсекелесетін жоғары аффинді антиденелер мен ақуыздарды қолдануға негізделген, бұл сүтте ықтимал қауіпті заттардың болуын оңай анықтауға мүмкіндік береді. Бұл әдіс өте сезімтал және антибиотиктердің қалдық мөлшерін сапалы және сандық түрде анықтауға мүмкіндік береді. Антибиотиктердің қалдық мөлшерінің құрамын көзбен анықтауға болады, яғни, тест жолағында 4 жолақтың болуы сүт үлгілерінде антибиотиктердің қалдық мөлшерінің мөлшерін көрсетеді. Барлығы 11 сүт үлгілері тексерілді, оның ішінде 8 үлгі (жеке сүт) және 3 үлгі (жалпы сүттен алынған үлгілер).

Алынған нәтижелерді талдау көрсеткеніндей, антибиотиктің барлық төрт тобының мөлшері рұқсат етілген нормадан асып кеткенін көрсетті: № 9103, 18866 сиырларында, ал керісінше, №7559,7933,9093, 4160, 5193 сиырларында зерттеу нәтижелері теріс, яғни сынамаларда зтексерілген антибиотиктердің қалдық мөлшері асып кеткен жоқ. Құрама сүтте №2

сынамада барлық 4 антибиотик бар, қалған екі сынамада антибиотиктердің қалдық мөлшерінің құрамы ішінара анықталды. ANKAR 100 құрылғысымен антибиотиктердің қалдық мөлшерін анықтаудың артықшылығы - жылдамдық және әдіс зерттелетін заттардың құрамын сандық түрде анықтауға мүмкіндік береді, құрылғының сезімталдық диапазоны жоғары.

Қорытынды. Жұмыста MASP2 және CATHL2 гендерінің құрамындағы SNP полиморфизмдері зерттелді, бірақ генетикалық полиморфизм екі локустар бойынша да анықталмады. Бірінші жағдайда, MASP2 генінің локусы генетикалық полиморфизмнің өте төмен деңгейін көрсетті, ДНҚ-ның 87 үлгісі сыналып, тек бір жануарда ТС/СТ гетерозиготалы генотипі анықталды, екінші CATHL2 генінің локусы бойынша зерттелген популяцияда SNP полиморфизмнің жоқтығы дәлелденді. Зерттеу жүргізген «Байсерке-агро» ЖШС асыл тұқымды шаруашылығының сүт үлгілерінде 1 мл сүтте SCC саны 410 мыңнан 458 мың жасушаға дейінгі аралықта болды және рұқсат етілген норма деп санаймыз. Сүттегі антибиотиктердің қалдық мөлшерінің жоғарылауы сүттің биологиялық пайдалылығының төмендеуімен бірге жүреді, мұндай сүт өнімдерін қолдану адамдарда аллергиялық реакциялар тудырады, сүттің технологиялық қасиеттері төмендейді. Зерттелген сүт үлгілерінде антибиотиктердің барлық 4 тобы табылды, кейбір сиырларда сүтте барлық төрт антибиотиктің қалдықтары бар: хлорамфеникол, стрептомицин, тетрациклин тобы, β-лактам антибиотиктер тобы. Мал шаруашылығы мен ветеринарияда антибиотиктерді бақылаусыз немесе дұрыс қолданбау антибиотиктердің қалдық мөлшерінің жоғарылауы, алынатын өнім сапасының төмендеуі сияқты жағымсыз салдарға әкелетінін атап өткен жөн. ANKAR 100 қондырғысының көмегімен сүттегі антибиотиктердің қалдық мөлшерінің құрамын анықтау және Garant 4 ULTRA MILK жүйесінің экспресс-тесті ветеринариядағы зерттеудің ақпараттық, жылдам және қолжетімді әдісі болып табылады.

Әдебиет тізімі

1 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. *Genetics and Molecular Research* 15 (2): gmr.15027247 Published April 27, 2016

2 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. *Russian Journal of Genetics*, 2020, Vol. 56, No. 3, pp. 383–386.

3 Mohammed Naif Alhussien and Ajay Kumar Dang. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916. Available at www.veterinaryworld.org/Vol.11/May-2018/1.pdf