

Бұл тақырып аясында жаңа заманауи зерттеу әдістері атап өтсек.

1. ПТР әдістері

2. ИФТ әдісі

3. Биохимиялық талдау әдісі

4. Нақты уақыттағы ПТР

5. Қызмет көрсету бойынша

-УДЗ арқылы буаздықты анықтау

-күйіттеуші малдарды дайындау әдістері

-Аталық малдарды пішу

-Қолдан ұрықтандыру

-Жыныстық циклдарды синхрондау

-Электрэкулятормен аталық малдандардан шәует алу, сапасына спермаанализатор арқылы баға беру

-Қолдан ұрықтандырушы техниктерді дайындау

Біздің кафедрадағы жұмыс атқарып жүрген шаруашылықтар:

-«Байсерке-Агро» ЖШС, «Амиран-Аро» ЖШС, Ахай, Азхамет, Қорлан, Қара доңғал ШҚ

Ірі қараның малының BLAD және CVM аутосомалдық аурулары және оларды балау әдістері

BLAD – организмнің инфекциялық агенттерге иммунды жауабын бұзуға әкелетін аутосомалды рецессивті ауру. Гомозиготалы тасымалдаушы жануарларда мутацияның клиникалық белгілері әр-түрлі, алайда респираторлық және асқазан-ішек жолдарының қызметі бұзылады. Гетерезиготалы тасымалдаушылар жағдайында, (CD18^{TL/BL}) генотипінде мутантты аллель бар жануар организмді, вирустық және бактериалдық инфекцияларға қарсы тұра алмайды, жануарлардың иммунитеті төмендейді, осыған орай әрі қарай дамуы бұзылып, өнімділігі төмендейді. Гомозиготалы дені сау жануарларда (CD18^{TL/TL}) фенотиптік ауытқулар болмайды. Генотипі CD18^{BL/BL} жануарлар постнатальды дамуының алғашқы айларында өледі [19,20].

BLAD – ауруы ең алғаш 1983 жылы «гианулоцитарлық синдром» деген атаумен сипатталып жазылған және бұл аурудың адамдардағы LAD ауруына сәйкес екендігі дәлелденді. Бірқатар елдерде, жоғарыда аталған BLAD синдромы бар (лейкоциттердің адгезивті қабылетінің бұзылуы) бұқаларды өндірістен алып тастау үшін арнайы селекциялық бағдарламалар құрастырылды. Бұл ауру интергин генінің мутацияға ұшырауынан жасушалық иммунитеттің тежелуінен туындайды. Рецессивті аллель бойынша гомозиготалы жануарлардың бактериялық және вирустық инфекцияларға төзімділігі төмендеп, өсуі бәсеңдейді. Бұзаулар 3-7 айлық кезінде жиі ішек және өкпе инфекциясы нәтижесінде өледі [21].

Мутация лейкоциттердің көптеген дефектілеріне әкеледі. Патогендер енген аймаққа лейкоциттердің миграциясы тежелуінен бұл жасушалар инфекцияны жоюға қатыспайды, нәтижесінде жан-уарлар инфекцияға төзімсіз болады. CD18 геніндегі мутация нейтрофильдердің қызметін бұзады, олардың капиллярлар эпителийінен және субэпителиальды мембранадан өту қабылеті жоғалады. Сары-су ақзаттарында өзгерістер туындайды (гипоальбуминамия и гипер-глобулинонемия) және жіті нейтрофилия байқалады. Ауру жануар-лардың қаны лейкоцитарлық құрамы бойынша лейкозға ұқсас болады [22].

Ірі қараның 383 AG, и 775 СТ аймақтарында CD18 генінің кодтаушы бөлігінде екі нүктелік мутация анықталған. Екінші мутация байқалмайды, ал бірінші мутация осы аутосомалды рецессивті аурудың себебі болып табылады [23,24].

BLAD мутациясын ПТР әдісімен балау үшін мынандай прай-мерлер пайдаланылады:
 тура F 5'-AGGCAGTTGCGTTCAATGTGA-3' және кері R 5'-
 CCGACTCGGTGATGCCATTGA-3' [25].

Normal AGGCAGTTGCGTTCAATGTGACSTTCCGGAGGGCCAAGGGCTACCCCA
 TCGACSTGTAACCTGATGGACSTCTCCTACTCCATGGTGGATGACSTCGTCA
 Mutant AGGCAGTTGCGTTCAATGTGACSTTCCGGAGGGCCAAGGGCTACCCCA
 TCGGCSTGTAACCTGATGGACSTCTCCTACTCCATGGTGGATGACSTCGTCA

24 сурет. CD 18 генінің қалыпты және мутантты аллелдер тізбегі, нүктелік мутация 383 (A → G) аймағында орналасқан.

Полимераздық тізбек реакция жүргізу шарттары: бірінші саты ДНҚ-ны 95°C температурада – 5 минут денатурациялау, екінші са-ты - 95°C – 45 секунд, праймерлердің жабысуы (отжиг) -62°C -45 секунд, элонгация 72°C температурада 45 секунд. Аяқтаушы синтез 72°C – 5 минутқа созылады. Реакциялық қоспаның мөлшері 50 мкл, құрамында: ПТР-ға арналған 5 мкл 10 X ПТР буфері, 1,5 мМ MgCl₂, 2,5 мкл 25 мкМ тура және кері праймерлер, әр dNTP 5 мкл 0,2 мМ концентрациясы, белсенділігі 5u/μl болатын 0,5 мкл Taq Polymerase ферменті, 5 мкл ДНҚ және 26,5 мкл дистилденген су.

Жұмысқа қажетті концентрацияда праймерлер даярлау. ПТР-ға қажетті праймерлерді Американың Applied Biosystems компаниясы синтездеп, лиофильденген түрде 80 pmol мөлшерде ұсынылады. 80 pmol мөлшерде синтезделген праймерлер бар Эппендорф пробиркасына 800 мкл TE буфер қосады, праймерлер еруі үшін бір-неше секунд шайқайды. Содан кейін, мөлшері 50 мкл аликвоталар даярлайды, олардың біреуін TE буфермен төрт еселейді (яғни, 50 мкл –ге 150 мкл TE буферін қосады). Праймерлердің жұмысқа қа-жетті концентрациясы 25 мкМ. Концентрациясы 100 мкМ прай-мерлердің аликвотасы 20°C температурада сақтау қажет. Жұмысқа қажетті концентрациядағы праймерлерді 4°C температурада бір ай сақтауға болады [26].

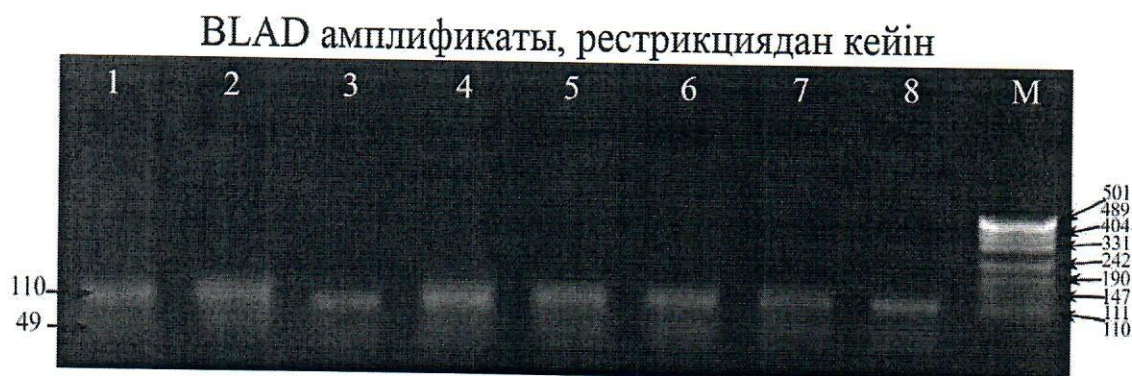


Сурет 25. Әр түрлі концентрациядағы MgCl₂ -нің CD 18 генінің амплификация нәтижесіне беретін әсері, амплификаттың ұзындығы 159 ж.н.

Амплификацияға қажетті dNTP қоспасын даярлау. А, G, C және T дезоксирибонуклеозидүшфосфаты 100 мМ ерітінді күйінде 1,0 мл мөлшерде Thermo Scientific компаниясынан алынды. Алдымен бар-лық төрт dNTP қосу керек, әр праймердің концентрациясы 25 мМ болады. Содан кейін, dNTP-ның 25 мМ аликвотын даярлап, оларды мұздатылған күйінде сақтау керек. ДНҚ-ның қажетті фрагментін амплификациялау үшін, Германияда жасалынған Эппендорф ам-плификаторы пайдаланылды [27].

Амплификация нәтижесін электрофорез арқылы бромды эти-диймен боялған 4% агарозада тексереді. Көлемі 159 ж.н. болатын фрагменттерді анықтау, амплификацияның сәтті жүргенін көр-сетеді. Амплификатты рестрикциялау TaqI көмегімен 65°C температурада 1,5 сағат жүргізіледі. Рестрикция өнімін электрофорезге мынандай режимде жүргізеді: кернеуі 180 В, тоқтың күші 150 мА, қуаты 50 Вт және ұзақтығы 45-60 минут. Рестриктаза TaqI рес-трикция сайты TCGA, фрагменттің ұзындығы 49, 110 және 159 ж.н. норма: 49 + 110, гетерозигота: 49+110+159 ж.н. [28].

Электрофореграммада көрсетілгендей (25 сурет), 7-ұяшық ДНҚ маркер, 6-ұяшық концентрациясы 1,0 мМ MgCl₂, 5-ұяшық кон-центрациясы 1,5 мМ MgCl₂, 4-ұяшық концентрациясы 2,5 мМ MgCl₂, 3-ұяшық 4,0 мМ MgCl₂, 2-ұяшық 5,0 мМ MgCl₂, 1-және ұя-шық 10xПЦР буфер ретінде аммоний сульфатының буфері қол-данылды.



Сурет 26. CD 18 генінің ампликатының рестрикциядан кейінгі электрофореграммасы, фрагменттердің ұзындықтары 49 ж.н. және 110 ж.н.

Концентрациясы 1,5 мМ MgCl₂ реакциялық қоспасында ам-плификация сәтті жүрді және праймерлердің жабысуы (отжиг) ке-зінде 62°C температура қолайлы болды. Амплификация нәтижесі мен рестрикция өнімін визуальдау гель құжаттаушы жүйемен іске асырылды. Дені сау жануарларда Taq I рестриктазасының рес-трикция сайты пайда болады және ампликат рестрикциядан ке-йін 110 ж.н. және 49 ж.н. көлемді фрагменттерге бөлінеді (26 сурет).

Ампликат өнімін рестрикциялау рестрикция хаттамасына сәйкес жүргізіледі, 5-кестеде көрсетілгендей 65 °C температурада 2 сағат жүргізілді. Амплификация ұзақтығы 35-40 циклдан тұрды, амплификация аяқталғаннан соң 3% агарозды гель даярлайды. Ага-розды гелдің әрбір ұяшығына 7 мкл ампликаттан құйып, бірін-ші ұяшыққа ДНҚ маркері ретінде MspI рестриктазасымен рестрик-цияланған pUC19DNA пайдаланылады.

27 суретте М - ДНҚ маркері, 2, 4, 6 ұяшықтар ұзындығы 159 ж.н. ампликат. 5 ұяшық 5 – гомозиготалы сау жануарлар және 1, 3 ұяшықтар гетерезиготалы тасымалдаушылар.



Сурет 27. Гетерезиготалы тасымалдаушы аталық бұқалардың CD 18 генінің рестрикция өнімінің фрагменті мен амплификатының электрофореграммасы

Генотиптеу нәтижесі бойынша гетерезиготалы BLAD мутациясын тасымалдаушы герфорд тұқымдас Winston аталық бұқасы екені анықталды. Гетерезиготалы жануарлар рестрикциясынан кейін 49 ж.н., 110 ж.н. және 159 ж.н. фрагменттері болады [27].

6-Кестеде көрсетілгендей, әрбір жұп праймерге біздер экспериментті жолмен полимераздық тізбек реакциясының, денатурация температурасын, праймерлердің жабысу температурасын және элонгация ретінің, циклдар санының қолайлы жағдайын анықтадық.

Кесте 6. BLAD, CVM, BC және DUMPS мутацияларын анықтау үшін жүргізілген амплификация шарттары

ПТР жүргізу шарттары	BLAD	CVM	BC	DUMPS
I саты алғашқы денатурация 1 цикл	95 ⁰ C – 5 мин	94 ⁰ C – 5 мин	95 ⁰ C – 5 мин	95 ⁰ C – 5 мин
II саты : денатурация праймерлердің жабысуы элонгация циклдің саны	95 ⁰ C – 45 с 62 ⁰ C – 45 с 72 ⁰ C – 45 с 35	94 ⁰ C – 30 с 62 ⁰ C – 30 с 72 ⁰ C – 30 с с 35	95 ⁰ C – 45 с с 58 ⁰ C – 45 с с 72 ⁰ C – 45 с с 35	95 ⁰ C 45 с 60 ⁰ C 45 с 72 ⁰ C 45 с 35
III саты: аяқтаушы синтез 1 цикл	72 ⁰ C 5 мин	72 ⁰ C 5 мин	72 ⁰ C 5 мин	72 ⁰ C 5 м
магний хлоридінің концентрациясы	1,5 мМ	1,5 мМ	1,5 мМ	1,5 мМ

Амплификация нәтижесіне реакциялық қоспадағы магний хлоридінің концентрациясы едәуір әсер ететіні белгілі, біздің зерттеулерімізде магний хлоридінің оңтайлы концентрациясы 1,5 и 2,0 мМ болды.

7 Кесте. BLAD ауруын балау үшін ПТР реакция қоспасының құрамы.

Компоненттер	Мөлшері, мкл
10x Taq Buffer KCL	5,0
dNTP қоспасы (25 mM)	4,0
Праймер 1 (10 pM)	1,25
Праймер 2 (10 pM)	1,25
Taq DNA Polymerase (recombinant) 5U/ μ l	0,4
25 mM MgCl ₂	3,0
Деионизирленген су	30,0
ДНҚ матрица	5,0
Минералды май	1-2 тамшы
Жалпы көлемі	50,0

Асыл тұқымды жануарлардың мутациясын нүктелік детекциялау амплификация өнімін РФҰП талдауы негізінде жүргізіледі. Бір жағдайда нүктелік детекция кезінде белгілі бір нуклеазаның рестрикция сайты жоғалады, басқа жағдайда керісінше, рес-триктазаға қажетті рестриктаза сайты пайда болады.

Молекулярлық-генетикалық диагностиканың келесі сатысы ам-плификатты рестрикциялау болып табылады. ДНҚ-ны рес-трикциялау (кесу) рестриктаза көмегімен іске асырылады, рес-триктаза бактериалды эндонуклеаза тобына жатады.

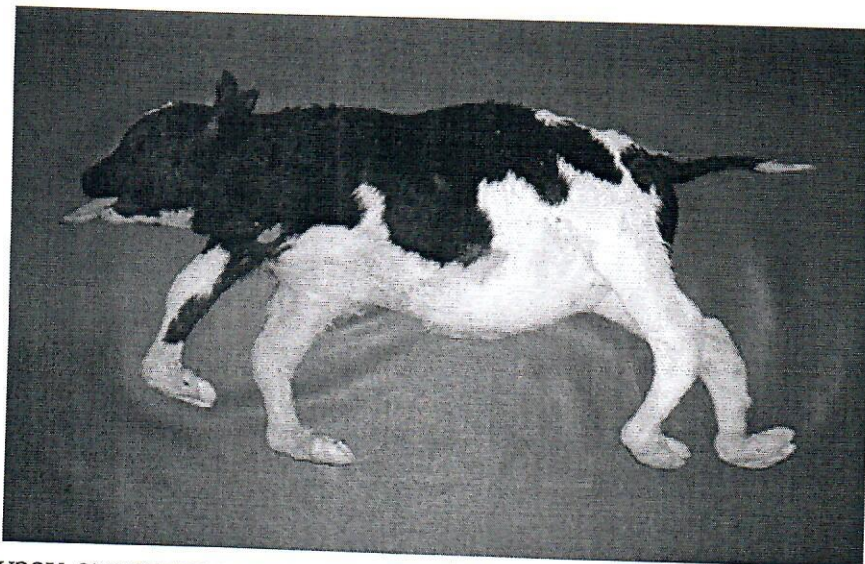
8 Кесте. ПТР өнімінің (BLAD) TaqI рестриктазамен рестрикциялау хаттамасы.

Реагент	Мөлшері, мкл
Деиондалған су	18,0
10x буфер	2,0
Рестриктаза TaqI 10 U/ μ l	2,0
Амплификат	10,0
вортексте ресуспензиялау	
термостатта +65 °C температурада 2 сағат инкубациялау.	

Ірі қара малында омыртқасының кешенді ақауын, CVM, (complex vertebral malformation) алғаш рет 2001 жылы зерттеуші Ager-holm J.S. леталды аутосомалды рецессивті тұқым қуалаушы ауру ретінде сипаттап жазды [29].

CVM (Complex Vertebral Malformation) омыртқа жотасының дамуының бұзылуы, ірі қараларда леталды рецессивті мутация бо-лып табылады, ол бұзаулардың өлі туылуымен, буаз сиырлардың іш тастауымен, төлдің мойын және көкірек омыртқаларының қысқа болуымен сипатталады (сурет 28).

Тұқым қуалаушы CVM ауруында 559 позициядағы SLC35A3 генінің G/T мутациясы зерттелді. UDP N acetylglucosamine trans-porter синтезін кодтаушы SLC35A3 гені 3 хромосомада орналасқан, геннің ұзындығы 58582 ж.н. бұл мутация нәтижесінде 180 позициядағы пептид құрамындағы аминқышқылдар валин мен фенил-аланинмен алмастырылған. Осы зерттеулер негізінде Жапон зерт-теушілері ірі қара малында CVM мутациясын анықтау үшін прай-мерлер жасап шығарған [29, 30].



Сурет 28. Бұзау омыртқасының кешенді ақауының фенотипті көрінісі (CVM)

Ғылымда бүгінгі күні асыл тұқымды жануарлардың мута-циясын нүктелі детекциялау әдістері қолданыста пайдаға асып ке-леді. Қытай зерттеушілері SLC35A3 генінің мутациясын балау үшін, *RsaI* эндонуклеазаға рестрикция сайты жасау арқылы CRS-PCR (created restriction site) әдісін құрастырды.

Normal GTGGCCSTCAGATTCTCAAGAGCTTAATTCTAAGGAACTTTCAGCTGG
 CTCACAATTTGTAGGTCTCATGGCAGTTCTCACAGCATGTTTTCCAGTGGC
 Mutant GTGGCCSTCAGATTCTCAAGAGCTTAATTCTAAGGAACTTTCAGCTGG
 CTCACAATTTGTAGGTCTCATGGCATTCTCACAGCATGTTTTCCAGTGGC

Сурет 29. SLC35A3 генінің қалыпты және мутантты аллелдер тізбегі, нүктелік мутация 559 (G → T) позицияда орналасқан.

Зерттеушілер SLC35A3 генінің қажетті фрагментін ампли-фикациялау үшін келесі жұп праймерлерін қолданды: тура 5'-GCTCTCCTCTGTAATCCCCA-3' және кері 5'-CCACTGGAAAACTAGCTGTGAGTA-3', праймер құрамына *RsaI* рестриктазаға қажетті рестриктаза сайты бар [31].

Жапон зерттеушілері CVM тасымалдаушы жануарларды анықтау үшін PCR-PIRA әдісін қолданды, осы әдіске сәйкес нүктелік мутацияны анықтау үшін праймерлер құрамындағы екі нуклеотидті ауыстырған, нәтижесінде *PstI* және *EcoT22* эндонуклеазалары үшін рестрикция сайты пайда болды. Әдетте, (AS-PCR) аллел-спецификалық полимераздық тізбек реакцияны қолдану арнайы типті Taq Polymerase ферментін қолдануды және амплификацияға қолайлы жағдайды әрі қарай зерттеу күн сайын таңдауды қажет етеді. Зерттеушілердің деректері бойынша PCR-PIRA қолдану аз уақыт ішінде жануарларда CVM мутациясының барын анықтау үшін генотиптеу жүргізуге мүмкіндік береді [32].

Америкалық зерттеушілер SLC35A3 генінің 559 пози-циясындағы G/T мутациясын зерттеді, осы зерттеулер негізінде Жа-пон ғалымдары ірі қара малында CVM мутациясын анықтау үшін праймерлер құрастырды. РФҰП әдісі ПТР өнімдерін талдау үшін қолданылады.

Кесте 9. Ірі қараның BLAD, CVM, DUMPS және Citrullinemia генетикалық кемтарлықтары кезіндегі амплификаттар мен рестрикция өнімдерінің негізгі сипаттамасы.

Генетикалық кемтарлық және рестриктазаның атауы	ПТР өнімінің ұзындығы ж.н.	Генотипті жануарлар		
		Қалыпты, ж.н.	Гетерозиготалы тасымалдаушылар, ж.н.	Гомозиготалы тасымалдаушылар, ж.н.
VLAD (Tag I)	159	49,110	49,110, 159	159
CVM (Pst I)	287	29,258	29,258,287	287
Арнайы G праймері бар CVM аллель	287	287	287	амплификация жүрмеді
Арнайы T праймері бар CVM аллель	287	амплификация жүрмеді	287	287
DUMPS (Ava I) Schwenger B.	108	19,36,53	19,36,53, 89	19,89
DUMPS (Ava I) Usen	241	87, 154	87,154,241	241
Citrullinemia (BC) (Ava II) Grupe S.	198	97, 101	97, 101,198	198
Citrullinemia (BC) (Ava II) Usen	151	59,92	59,92,151	151

G-ді (жабайы типті аллелдер) T (CVM аллель) ауыстырылған мына праймерлерді қолданған кезде PstI рестриктазаға қажетті сайт жоғалады: F 5' - CAC AAT TTG TAG GTC TCA CTG CA -3', R 5' -CGA TGA AAA AGG AAC CAA AAG GG -3'. Ал, F 5' -CAC AAT TTG TAG GTC TCA ATG CA -3', , R 5' - CGA TGA AAA AGG AAC CAA AAG GG -3', праймерлерін қолданған кезде мутантты аллельді анықтайтын EcoT22 рестрикция сайты пайда болады.

Сондай-ақ біздер CVM мутациясын тасымалдаушы жан-уарларды анықтау үшін: CVM – G, F 5'- CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAG- 3' және CVM – T, F 5'- CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAT- 3' и R 5'- CGATGAAAAGGAACCAAAAGGG - 3' аллель арнайы прай-мерлерді қолдандық.

30-суретте көрсетілгендей, M-ДНҚ маркер, 1,2,3,4,5,6,7 ұяшық-тар - G праймері бар ДНҚ сынамасы, 8 ұяшық T праймермен түзіл-ген ПТР өнімі. Бұл электрофореграмма, №8 сынама G праймермен амплификация жүрмей, T праймермен жүргені, бұл жануардың гетерозиготалы тасымалдаушы екенін көрсетеді.

Аллель арнайы праймермен ПТР қою, әдістемелік жағынан қиын үрдіс болып табылады, себебі бір уақытта екі жұп прай-мермен ПТР қоюға тура келеді. ПТР жалпы мөлшері 50 мкл реак-циялық қоспамен жүргіздік, оның құрамында 1,2 ӘБ. Тақ поли-мераза ферменті, 0,25 mM –дан әр dNTP, 67 mM Трис HCl pH 8,6, 1,5 mM MgCl₂, 16,6 mM NH₄OH, 0,5 мкм әр праймерден және 100-150 нг ДНҚ.



Сурет 30. SLC35A генин G (табиғи тип) және T (мутантты тип) аллель арнайы праймерлерімен амплификациялау

Бүгінгі күні генетика ғылымы саласында ірі-қараның генети-калық кемтарлықтарының молекулярлық-генетикалық негіздері жақсы зерттелінген, осы зерттеулер негізінде тұқым қуалаушы ау-руларды балау әдістері өндіріске ұсынылған.

Кесте 10. Ірі қараның генетикалық кемтарлықтары және олардың сипаттамасы

Негізгі параметрлері	Генетикалық кемтарлықтың атауы			
	BLAD	CVM	DUMPS	DUMPS
Геннің атауы	CD 18	SLC35A3	UMP	ASS
Геннің орналасуы	Хромосома 1	Хромосома 3	Хромосома 1 (q3136)	Хромосома 11
Геннің ұзындығы	37 901 ж.н.	58582 ж.н.	65 062 ж.н.	67 600 ж.н.
Нуклеотидті алмастыру табиғи тип/мутация	383 A→G позицияда	559 G→T позицияда	кодон 405 экзон 5 C→T	кодон 86 экзон 5 C→T
Рестриктазаның атауы мен рестрикция сайты	Taq I – (T/CGA)	Pst I – (CTGCA/G)	Ava I – (C/YCGRG)	Ava II (GG/WCC)

Біз зерттеген локус бойынша, геннің орналасқан жері, сәйкес пептидті синтездеуді кодтау, гендердің параметрлері, нүктелік мутация қайда және қай позицияда болғаны т.б. жағдайлар белгілі болды [33].

DUMPS мутацияларын ПТР әдісімен балау

DUMPS (Deficiency of uridine monophosphate synthase) кемтарлығы сиырларда буаздықтың бастапқы айларында имплантация кезінде эмбрионалдық өлімдікпен сипатталады. Сүт қоректілерде, соңғы сатыларында торшаларда пиримидиндік нуклеотидтер син-тезделуі үшін оротаттың уридин монофосфат синтезатазасына (UMP) конверсиясы қажет, аталған биохимиялық үрдіс UMP син-тетеза ферментінің қатысуымен жүреді. UMP синтезата ферменті ДНҚ және РНҚ құрамына кіретін пиримидиндік нуклеотидтердің синтезделуіне қажет.

Гомозиготалы рецессивті сиырларда имплантация кезіндегі эм-бриондарының өсуі мен дамуы ұрықтандырудан кейін шамамен 40 күн өткеннен кейін эмбрионалдық өліммен аяқталатыны ғылымда белгілі [37].

UMPS генінің орналасуы I (q3136) хромосомада, ұзындығы 65 062 ж.н. болады, аутосомалы рецессивті ауру UMP генінің 5-экзон 405 кадон (C →T) нуклеотидінің ауысуы нәтижесінде туын-дайды. Дені сау жануарларда ПТР өнімі құрамында Ava I рестрик-тазасы үшін сайт рестрикциясы бар (CYCGRG), ондағы Y – T не-месе C, ал R- A немесе G нуклеотидтері, сондықтан амплификат үш фрагменттерге кесіледі, ал гетерозиготалы жануарларда төрт фрагменттерге кесіледі, ал гомозиготалы ауру жануарларда екі фрагменттерге кесіледі, себебі Ava I рестриктазасының сайт рес-трикция болмайды. [24].

DUMPS генетикалық кемтарлығын ПТР әдісімен балау үшін келесі екі жұп праймерлер тізбектері қолданылады:

F 5'- GCAAATGGCTGAAGAACATTCTG-3' және

R 5'-GCTTCTAACTGAACTCCTGGAGT-3'. (Schwenger B. 1994),

F 5'-TGAGTTCAATGTGACATGAGAAAAT -3' и

R 5'-ATTACCAATCAATAGGCTTACCTCC-3' (Усенбеков Е.С. 2014).

Normal CTGTTGATTACATTCCATTCAGGTGCAAATGGCTGAAGAACATTCTGAA

TTTGTGATTGGTTTTATTTCTGGCTCCCGAGTAAGCATGAAACCAGAATTTCTT

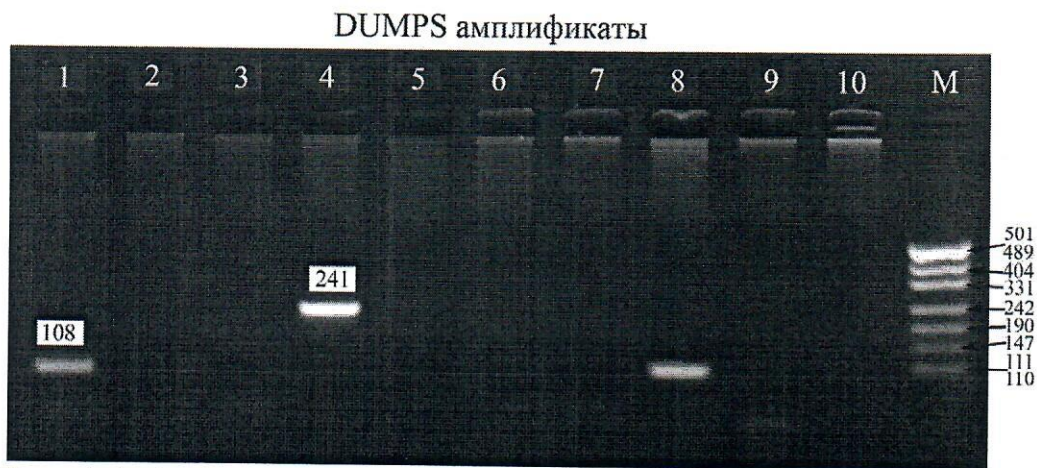
Mutant CTGTTGATTACATTCCATTCAGGTGCAAATGGCTGAAGAACATTCTGAA

TTTGTGATTGGTTTTATTTCTGGCTCCTGAGTAAGCATGAAACCAGAATTTCTT

Сурет 34.UMP генінің қалыпты және мутантты аллелдерінің ген ішінде орналасуы
405 кодон 5 экзон (C →T)

ПТР-РФҰП талдауында нүктелік мутацияны балаудағы бір мәселе - амплификация өнімі мен рестрикция өнімінің нәтижесі элек-трофорезде нашар болып көрінуі. Осылайша, кескеннен кейін фрагменттің ұзындығының айырмашылығы аз, яғни, 10-15 жұп нуклеотид, ал электрофорграммаларда фрагменттер өте нашар көрі-неді.

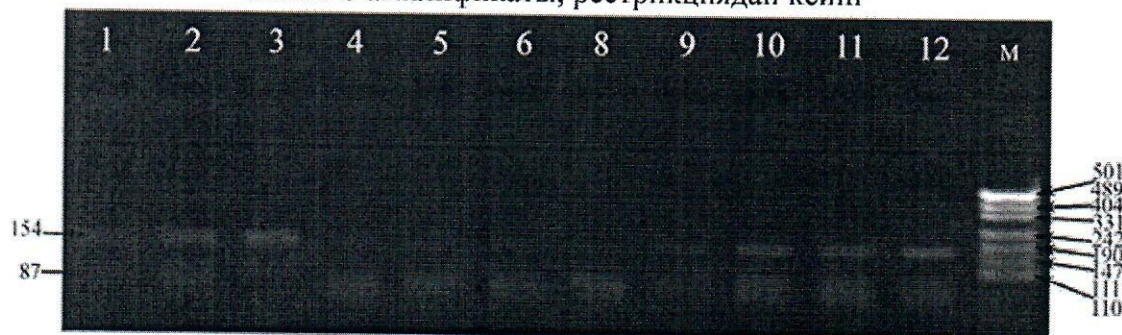
Сондықтан UMP генінде мутацияны анықтау үшін прай-мерлерді жобалау кезінде біз ДНҚ молекулаларының жақсы көрінуі үшін амплификат ұзындығын, рестрикция өнімін ескердік. Осы-лайша В. Schwenger праймерлерін (1994) пайдалана отырып біз ұзындығы 108 жұп нуклеотид амплификат алдық, дені сау жануар-ларда өнімін кескеннен амплификат ұзындығы үш 19 ж.н., 36 ж.н., 53 ж.н. және гетерозиготалы жануарларда төрт фрагменттер: ұзын-дығы 19 ж.н., 36 ж.н., 53 ж.н. және 89 ж.н. фрагмент тізбегін береді. 19 ж.н., 36 ж.н. және 53 ж.н. ДНҚ фрагменттері электрофорез ке-зінде нашар көрінеді, сондықтан біз ұзындығы 241 ж.н. тұратын UMP генінің қажетті фрагментін синтездеуге мүмкіндік беретін праймерлерді жасадық. UMP генінің қажетті бөлігінің оң-тайландырылған амплификация нәтижесі электрофорграммада көр-сетілген (сурет 35) және амплификация №1.4 және 8 үлгілерінде жақсы жүргені байқалды.



Сурет 35. UMP генінің ПТР өнімі Schwenger В. (108 ж.н.) ұсынған праймерлермен және Усенбеков Е.С. праймерлерімен (241 ж.н.)

Schwenger В. праймерлерінің 1 және 8 үлгілер және №4 үлгідегі ҚазҰАУ ұсынған праймер. Праймерлердің оңтайлы жабысу тем-пературасы $+60^{\circ}\text{C}$ болды. UMP генінің локусы бойынша жан-уарларды генотиптеу үшін біз *Ava* I рестриктазасымен амплификатты рестрикцияға қойдық, дені сау гомозиготалы жан-уарларда 87 ж.н. және 154 ж.н. екі фрагмент ұзындығын алдық. Жұ-мыс кезінде және В. Schwenger (1994) амплификацияланған фраг-менттің ұзындығы 108 ж.н., *Ava* I рестриктазасын кескеннен кейін, сау гомозиготалы жануарларда ұзындығы 19 ж.н., 36 ж.н., 53 ж.н. тізбегі пайда болды. Біздің праймерді қолданғанда, амплификат ұзындығы 241 ж.н., ал кескеннен кейін екі тізбек 87 ж.н. және 154 ж.н. фрагменттерін аламыз (36-сурет) [38,26].

DUMPS амплификаты, рестрикциядан кейін



Сурет 36. UMP генінің амплификатын *Ava* I рестриктазасымен кескеннен кейінгі фрагменттер

Біз жануарларды DUMPS генетикалық кемтарлығы үшін прай-мерлер тізбектерін келесі ретпен дайындадық: алдымен, UMP генінің бүкіл тізбегі NCBI дерекқорынан анықталды, содан кейін Schwenger В. (1994) көрсетілген праймерлер тізбектерін пайдалана отырып, UMP генінің нүктелік мутациясының орналасуын анық-тадық, UMP генінің ДНҚ-сі тура праймердің орналасу ретімен толығымен сәйкес келеді, ал кері праймердің орналасу реті 3' аяғы-нан санағандағы бесінші нуклеотид UMP геніне сәйкес келмейді (автордың праймерінде нуклеотид С көрсетілген, ал нақты нук-леотид G), сондықтан, Schwenger праймерін қолданғанда, *Ava* I рес-триктаза фрагменті үшін қосымша рестрикция сайты бар, ал біз әзірлеген праймерді пайдалану кезінде бұл рестрикция сайты (*Ava* I) жоқ, рестрикциядан кейін амплификат өнімі тек екі фрагментке кесіледі, 87 ж.н. және 154 ж.н. (36-сурет). Амплификат өнімін 4% агарозада тексеріледі және *Ava* I рестриктазасымен амплификат өнімнің рестрикциясын $+ 37^{\circ}\text{C}$ -та 3 сағатқа термостатқа қоя-

мыз. Амплификаттың рестрикциясынан кейін DUMPS мута-циясының тасымалдаушыларын анықтау үшін агарозды элек-трофорезді қайтадан жүргізеді. Рестрикциядан кейін дені сау жан-уарларда ұзындығы 87 ж.н., 154 ж.н. тұратын фрагменттері анық-талып, ал гетерозитолалы тасымалдаушыларда 241 ж.н., 154 ж.н., 87 ж.н. және гомозиготалы тасымалдаушылардағы 241 ж.н. фраг-менттері пайда болады.



[Handwritten signature]
[Handwritten signature]