




МРНТИ 68.41.05, 34.25.01, 68.41.41, 68.41.53 doi: 10.58318/2957-5702-2022-12-24-35

## ПОДБОР СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР ПРИ ЛЕЙКОЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

У.Ж. Кужебаева \*, И.С. Бейшова , В.А. Ульянов ,  
 Т.В. Ульянова , А.М. Ковальчук , Н.С. Гинятов , А.Ж. Сидарова 

НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана»,  
 Казахстан, Уральск  
 usya\_999@mail.ru

**Аннотация:** метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) широко применяется для решения различных задач. ПЦР широко применяется для детекции патогенов бактериальной и вирусной природы. Праймеры являются очень важным компонентом ПЦР, поскольку специфичность амплификации зависит в первую очередь от них. Они необходимы для работы фермента и являются специфичными к фрагменту интереса. По итогам отбора нуклеотидных последовательностей генома или отдельных фрагментов РНК вируса из международной базы данных на сайте NCBI, было выявлено большое количество последовательностей для вируса лейкоза крупного рогатого скота, которые хранятся в банках генов и ежедневно пополняющихся новыми данными. Конструирование праймеров с соблюдением необходимых параметров проводится с помощью различных компьютерных программ, основными из которых являются MUSCLE, UGENE V.36.0, Primer-BLAST, Oligo Analyzer и другие. Сконструированные праймеры затем синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов Expedite 8909, согласно инструкции прилагаемой к прибору. В результате проведенных опытов нами были подобраны и синтезированы специфические синтетические олигонуклеотиды *env (g51) \_1* и *env (g51) \_2*, для постановки ПЦР при лейкозе крупного рогатого скота.

**Ключевые слова:** вирус лейкоза крупного рогатого скота, праймер, ген, нуклеотиды, полимеразная цепная реакция

### Введение

Вирус лейкоза крупного рогатого скота – РНК содержащий онкогенный вирус, вызывающий злокачественное лимфопролиферативное заболевание животных. В соответствии с классификацией Международного Комитета Таксономии Вирусов (ICTV), относится к семейству *Retroviridae* (2 подсемейства, 7 родов), подсемейству *Orthoretrovirinae*, роду *Deltaretrovirus*, к которому также относятся и Т-лимфотропные вирусы приматов (PTLV) – человека и обезьян (HTLV и STLV) [1]. Стоит отметить, что за последнее время увеличилось количество исследований, о возможности рассмотрения данного заболевания как зоонозной инфекции, так существуют сведения о способности вируса BLV инициировать рак груди и легких, а также дополнительных типов рака человека [2-4]. Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что инфицированный вирусом лейкоза скот, может представлять вероятный риск для здоровья человека.

По данным эпизоотологических исследований в настоящее время лейкоз крупного рогатого скота регистрируется в Северной и Южной Америке, некоторых странах Азии и Ближнего Востока, а также в Восточной и Центральной Европе [5], в Казахстане за 2015-2019 гг. уровень инфицированности лейкозом составил 5,7% [6].

Стоит отметить, что лейкоз ликвидирован более чем в 20 странах, где применялись традиционные методы тестирования на наличие антител, при выявление инфицированных животных забивали. На сегодня во многих странах, где уровень инфицированности приближается к 50% традиционные методы экономически нецелесообразны [7].

Высокая заболеваемость крупного рогатого скота лейкозом связана с тем, что недостаточно полно проводится работа по ликвидации и оздоровлению хозяйств по этому заболеванию, положительно реагирующие животные остаются в стадах, что приводит к перезаражению остального поголовья [8].

Известно, что почти у 70% инфицированных животных заболевание протекает бессимптомно, алейкемическая стадия. Однако уже через несколько лет бессимптомного периода у 25-30% животных инфицированных вирусом лейкоза прогрессирует стойкий лимфоцитоз, характеризующийся поликлональной экспрессией неопластической популяции лимфоцитов CD5+ В-лимфоцитов, а у 1-5% развивается В-клеточная лимфома [9]. Все же до сих пор неизвестен механизм, способный обеспечить защиту от энзоотического лейкоза для инфицированных вирусом коров.

До настоящего времени основными и единственными методами борьбы с BLV является выбраковка больных и изоляция инфицированных коров. Поэтому первостепенное значение имеет своевременная и точная диагностика инфекции, вызванной BLV. Диагностические исследования на лейкоз проводят в основном серологическими (РИД, ИФА) молекулярно-биологическим (ПЦР) и гематологическим методами. Достоинством молекулярно-биологического метода (ПЦР) является, что в результате определен вирусоспецифический фрагмент выделенной нуклеиновой кислоты амплифицируется до количества достаточного для его визуального определения. С помощью ПЦР удастся обнаруживать даже деградированную нуклеиновую кислоту, присутствующую в следовых количествах. ПЦР как метод диагностики лейкоза крупного рогатого скота возможно применять уже с 15-дневного возраста [10].

Возбудитель заболевания РНК содержащий вирус лейкоза крупного рогатого скота, который относится к семейству *Retroviridae*. Строение, молекулярный состав и геном возбудителя достаточно подробно изучены авторами [11]. Липопротеиновая наружная оболочка вириона покрыта гликопротеидными пепломерами, которая скрывает экосаэдрический нуклеокапсид. Нуклеокапсид включает в себе две идентичные молекулы вирусной РНК, представленные ферментом ревертазой и фрагментами клеточной РНК [12].

Длина полной последовательности вируса лейкоза крупного рогатого скота 8714 п.н. [13]. Следует отметить, что концы интегрированного провируса лейкоза крупного рогатого скота, также как у многих ретровирусов, представляют собой последовательности, называемые длинными концевыми повторами (LTR long terminal repeat). На сегодняшний день идентифицированы 7 альтернативно сплайсированных РНК, а также 8 открытых рамок считывания, такие как gag, prt, pol, env, tax, rex, RIII, GIV [14].

Основным признаком семейства *Retroviridae* является то, что геном вируса может существовать в двух формах, таких как геномной одноцепочечной РНК или в виде провирусной ДНК, синтезированной на геномной РНК как на матрице [15]. Полноразмерная молекула РНК транскрибируется из интегрированного провируса, и выполняет две главные функции, такие как формирование вирионной РНК и мРНК для синтеза продуктов генов gag, pol, env [16].

Для постановки ПЦР важное значение имеет удачный выбор праймера, который может привести к появлению неспецифического продукта амплификации из-за образования «праймерного димера». Праймерный димер представляет собой побочный продукт амплификации в виде двунитевого фрагмента, возникающего за счет отжига праймеров с их последующей достройкой [17, 18]. Специфичность праймера крайне важна. В том случае,

если их специфичность недостаточна, то вероятней всего в пробирке с реакционной смесью будут происходить нежелательные процессы, такие как синтез неспецифической ДНК. При проведении электрофореза неспецифическая ДНК выявляется в виде тяжелых или легких дополнительных полос, иногда шмеров, в виде сплошных мазков в агарозном геле. Также часть праймеров и дНТФ может расходоваться на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности [19].

В целях подбора специфических праймеров особое значение имеет выбранный ген. Ген *env*, кодирующий оболочку BLV, транскрибируется как 5,1 кДа мРНК, с последующей трансляцией белка-предшественника  $pr72^{env}$  [20-22], белки которого транспортируются в комплексе Гольджи, где расщепляется на два гликолизированных белка оболочки: трансмембранный *gp30* и внеклеточный *gp51*.

Трансмембранный *gp30*, является слабоимунногенным, а внеклеточный *gp51* вызывает высокую экспрессию специфических антител у инфицированных животных. Моноклональные антитела к *gp51*, взаимодействуют с эпитопами (F, G и H) на молекуле белка, определяющими инфекционность вируса. Данный факт позволяет предположить, что в отсутствии эпитопов F, G и H, происходит потеря инфекционности.

По данным авторов, при анализе ДНК, экстрагированной из клеток моноцитов крови животных, ПЦР-методом с использованием праймеров для *env* гена удастся выявить больше положительных случаев, чем при использовании праймера для других генов [23]. Вместе с тем в других исследованиях указывается, что праймеры к *env* гену обеспечивают большую специфичность анализа, чем на другие гены [24].

Целью данной статьи является подбор праймеров и синтезирование специфических олигонуклеотидов для отработки условий постановки ОТ-ПЦР, используемые для диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

## Материалы и методы

Для подбора и синтеза праймеров нами был выбран ген *env*. Ген *env* имеет длину 1545 п.н. (4821 п.н. – 6368 п.н.), кодирует зрелый поверхностный гликопротеид *gp51* и прикрепленный к нему дисульфидной связью трансмембранный белок *gp30*. Отличие антигенообразования на белок *env gp51* состоит в том, что антитела против *gp51* постоянно обнаруживаются в сыворотке у инфицированных животных с низкой провирусной нагрузкой в лейкемической и алейкемической стадии лейкозного процесса. При подборе праймеров для ПЦР нами был выбран короткий отрезок гена вблизи его 5'-конца с оптимальной длиной около 20 нуклеотидов. Нами были подобраны последовательности нуклеотидов, которые соответствуют предъявляемым требованиям к праймерам.

В международной базе данных на сайте NCBI нами был проведен анализ последовательностей генома вируса лейкоза крупного рогатого скота. Для подбора специфических праймеров был выбран ген *env*, кодирующий гликопротеид оболочки вируса. Следует отметить, что ген *env* содержит конформационные и линейные эпитопы. У вирусов изолированных в разных географических регионах структура и состав этих эпитопов различен. Поиск нуклеотидных последовательностей сегментов лейкоза крупного рогатого скота проведен в международной базе данных GenBank. Выравнивание проводили с использованием программы MUSCLE, входящей в пакет программ UGENE v.36.0. Специфические олигонуклеотидные праймеры, используемые для обнаружения ВЛКРС с помощью ОТ-ПЦР, подбирали с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Проверку проводили с использованием программы OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). При выборе синтетических олигонуклеотидов придерживались следующих требований: длина праймеров 16-25 нуклеотидов; содержание GC-пар – 50-60%; разница в температуре отжига обоих праймеров – не более 6°C; праймеры

не должны быть само- и взаимно-комплементарными; нуклеотиды 3'-конца праймера должны быть строго комплементарны матрице. Компьютерно-моделированные последовательности праймеров в дальнейшем синтезировали на синтезаторе олигонуклеотидов Expedite 8909, Applied Biosystems. Синтез ДНК проводили согласно протоколам, прилагаемым к прибору. Полученные олигонуклеотиды элюировали с колонок концентрированным раствором аммиака и выпаривали в вакуумном испарителе CentriVar Concentrator, LABCONCO. Преципитат праймеров растворяли в ТЕ буфере и переосаждали этанолом. Полученные таким образом синтезированные праймеры использовали для отработки постановки ОТ-ПЦР.

Для проверки синтезированных праймеров нами было выделено РНК, с использованием набора QIAamp® Viral RNA Mini Kit в соответствии с наставлением по применению данного набора. ОТ-ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 25 мкл. Реакционная смесь состояла из Enzyme Mix – 0,5 мкл (10 пМ); 5хПЦР-буфер – 5 мкл; специфические праймеры (10 пМ) по 0,5 мкл; смесь dNTP (10 пМ) – 0,5 мкл; РНК – 3 мкл; деонизированная вода – 15 мкл. Для электрофореза использовали 2% раствор агарозы в ТАЕ-буфере. Документирование полученных результатов проводили при помощи гелем документальной системы MiniBIS Pro 16mm GELQUANT (DNR Bio Imaging Systems).

### Результаты

В результате поиска нуклеотидных последовательностей ВЛКРС было получено 119 полных последовательностей генома для разных штаммов.

Следующим этапом проводили выравнивание полученных последовательностей с целью определения консервативных участков, подходящих для подбора праймеров. Выравнивание показало, что сходство между полными геномами вируса лейкоза крупного рогатого скота составляет от 86 до 99%. Результаты выравнивания представлены на рисунке 1.



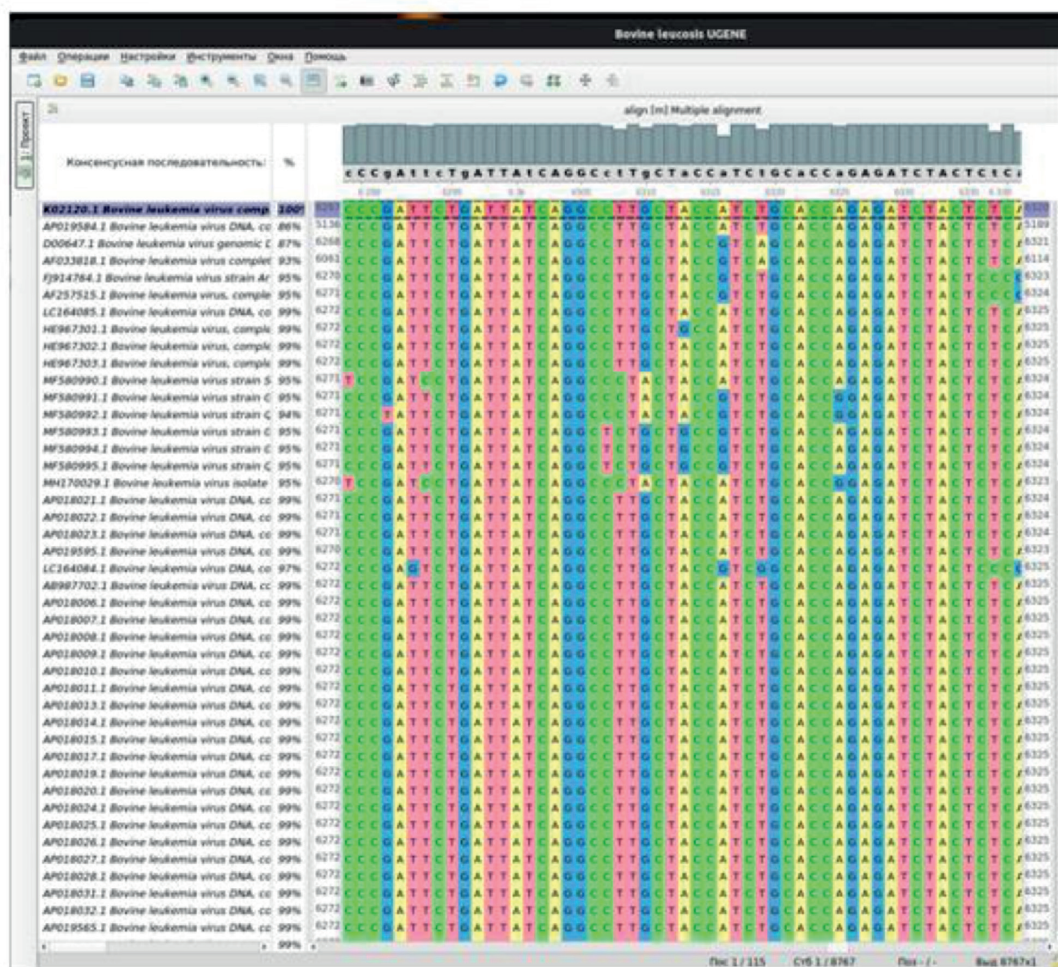


Рисунок 1 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей полных геномов вируса лейкоза крупного рогатого скота с помощью программы UGENE 36.0

Для подбора праймеров были выбраны области, кодирующие ген *env*. В качестве референтной последовательности был использован геном с GenBank ID: K02120. В результате были подобраны 10 пар праймеров на ген *env* (таблица 1, рисунок 2).

Таблица 1 – Комбинации различных пар праймеров на геном вируса лейкоза крупного рогатого скота

№ п/п	Прямой праймер	Обратный праймер
1	ACTCTAACCTGGGAGATATGGG	GACGAGTTGACCCAGAAGATTT
2	CCTTCCCAGACTGTGCTATATG	GAGGAAGCCGTAGAGAGATTAAC
3	AACCCGACTTTCCCCAGTTG	GACCCAGAAGATTTGGGCGT
4	CAACCCGACTTTCCCCAGTT	CGGAGGAAGCCGTAGAGAGA
5	CATATGATTGCGAGCCCCGA	AACTGGGGAAAGTCGGGTTG
6	CCCTCTGTCAGATCATGGGC	TGACCCAGAAGATTTGGGCG
7	TATGATTGCGAGCCCCGATG	GGCCCATGATCTGACAGAGG
8	AGTGACTGGGTTCCTCTGT	GCCATCCTTGGGTGGTGTTA
9	CCTTATGTGGGGGCAGATCG	GCCCATGATCTGACAGAGGG
10	CCCGACTTTCCCCAGTTGAA	ACCCAGAAGATTTGGGCGTC

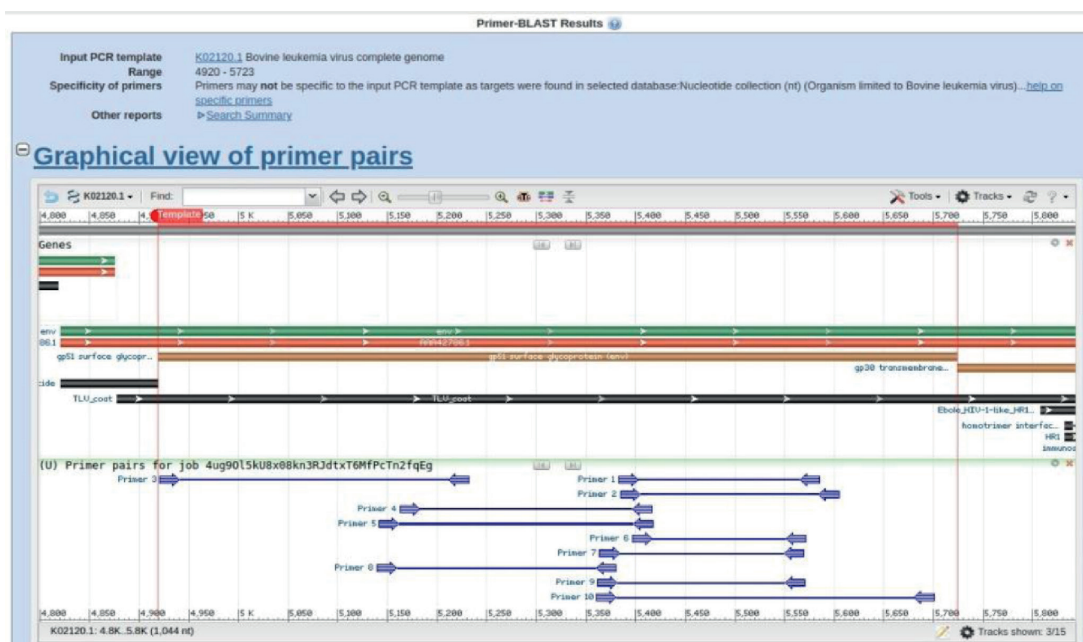


Рисунок 2 – Графическое представление подобранных пар праймеров к гену *env* на геноме

В данном случае также проводили предварительный отбор пула праймеров по основным критериям, предъявляемым для ПЦР. В первую очередь длина олигонуклеотида не должна была превышать 22 нуклеотида, имела допустимое процентное соотношение GC – оснований – 40-70%, температуру плавления и прогнозируемый размер ПЦР продукта, находящийся в пределах 150-400 п.н. Из пула конструированных праймеров на первом этапе для дальнейших исследований отобраны пять пар праймеров для разработки ПЦР.

В дальнейшей работе, проверяли термодинамические и структурные характеристики подобранных олигонуклеотидов. Праймеры не должны образовывать тугоплавких шпилек, гомо- и гетеродимеры. Праймеры не должны иметь  $\Delta G$  меньше -6 kcal/mole. Проверку проводили с использованием программы OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analizer>). Праймеры не должны иметь  $\Delta G$  меньше -6 kcal/mole. На рисунке 3 приведен пример праймера, исключенного из дальнейшего анализа.

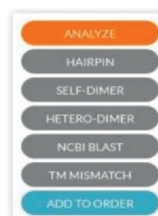
### Homo-Dimer Analysis

The delta G is calculated by taking into account the longest stretch of complementary bases. These pairs of complementary bases are represented by a solid line. Dotted lines represent additional complementary bases for that dimer structure, but their presence does not impact calculated delta G values. Actual delta G values may vary based on presence of additional complementary bases. The Maximum Delta G value refers to the free energy of the oligo sequence binding to its perfect complement.

**Dimer Sequence:**  
5'- AGGGCCATCATCCAGCTTTC -3'  
**Maximum Delta G:** -40.77 kcal/mole

**Delta G:** -9.28 kcal/mole **Base Pairs:** 4  
5' AGGGCCATCATCCAGCTTTC  
: |||| :  
3' CTTTCGACCTACTACCGGGA

**Delta G:** -6.34 kcal/mole **Base Pairs:** 4  
5' AGGGCCATCATCCAGCTTTC  
: |||| :  
3' CTTTCGACCTACTACCGGGA



№12  
2022

Рисунок 3 – Проверка праймеров на образование димеров

Как видно из приведенных на рисунке 3 данных, в ходе проверки подобранных нами праймеров были обнаружены праймеры с показателями само-димеров  $\Delta G$  которых составляет -9.28 и -6.34, такие димеры могут затруднить проведение реакции ОТ-ПЦР, соответственно их мы исключали.

Следующим этапом проверяли специфичность подобранных праймеров с использованием программы BLAST, праймеры должны быть 100% специфичны с геномом ВЛКРС. Пример такого анализа представлен на рисунке 4.

Description	Max Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Bovine leukemia virus BLV_B1.3.1 proviral DNA, complete genome	40.1	100%	0.54	100.00%	g11806500253HLC436098.1
Bovine leukemia virus BLV_B1.2M3 proviral DNA, complete genome	40.1	100%	0.54	100.00%	g11806500237HLC433846.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3034	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016931AP019598.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3032	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016731AP019596.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3031	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016651AP019595.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3030	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016551AP019594.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3028	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016351AP019592.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3027	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101016251AP019591.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3018	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101015371AP019582.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3015	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101015071AP019579.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3014	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014971AP019578.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3011	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014671AP019575.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3010	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014571AP019574.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3009	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014471AP019573.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3008	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014371AP019572.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3007	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101014271AP019571.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvA3004	40.1	100%	0.54	100.00%	g116101013971AP019568.1
Bovine leukemia virus isolate 56F15, complete genome	40.1	100%	0.54	100.00%	g114461096951MH170028.1
Bovine leukemia virus strain QH2, complete genome	40.1	100%	0.54	100.00%	g113364730781MF580995.1
Bovine leukemia virus strain GS3, complete genome	40.1	100%	0.54	100.00%	g113364730771MF580994.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvAN015	40.1	100%	0.54	100.00%	g11714445061AP018032.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvAN014	40.1	100%	0.54	100.00%	g11714444941AP018031.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvAN013	40.1	100%	0.54	100.00%	g11714444801AP018030.1
Bovine leukemia virus DNA, complete sequence, strain: cvAN011	40.1	100%	0.54	100.00%	g11714444631AP018029.1

Рисунок 4 – Проверка специфичности праймеров с помощью программы BLAST

Проведенные эксперименты по выбору пары праймеров показали, что оптимальными оказались праймеры *env(g51)\_1F* и *env(g51)\_1R*, *env(g51)\_2F* и *env(g51)\_2R*, позволяющие набирать ПЦР продукт соответственно размерами 206 п.н. и 340 п.н.

Автоматический синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью специальных приборов – ДНК-синтезаторов. Синтез праймера проводили поэтапным достраиванием нуклеотида, согласно его нуклеотидной последовательности.

По результатам проведенного нами работы были подобраны следующие пары праймеров: *env(gp51)\_1F* и *env(gp51)\_1R*, *env(gp51)\_2F* и *env(gp51)\_2R*. В таблице 2 приведена характеристика специфических синтетических олигонуклеотидов для идентификации гена вируса лейкоза крупного рогатого скота.

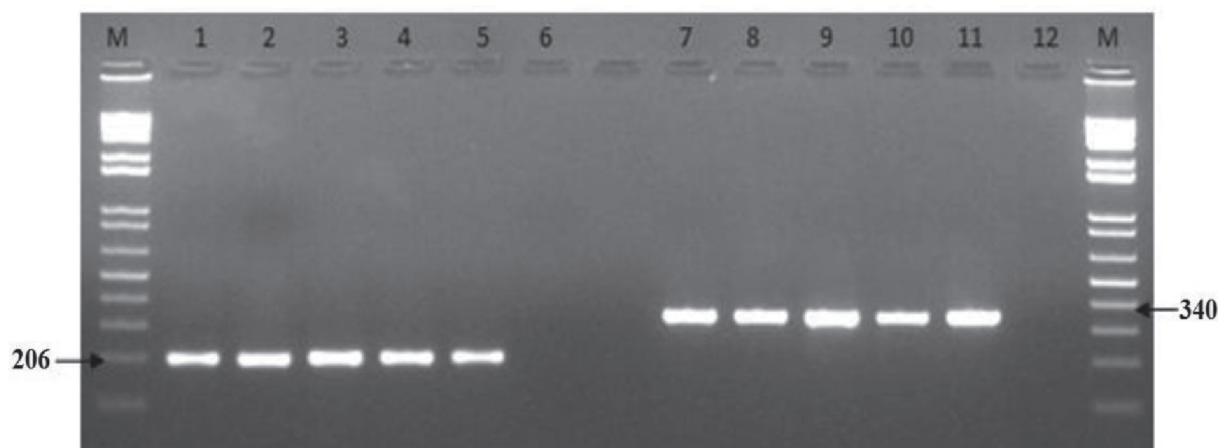
Таблица 2 – Характеристика специфических олигонуклеотидов для постановки ОТ-ПЦР на ген *env(gp51)* вируса лейкоза крупного рогатого скота

Ген	Последовательность (5'→3')	Длина	Tm, °C	GC%	Размер продукта, п.н.
<i>env(g51)_1F</i>	CCCGACTTTCCCGAGTTGAA	20	59.89	55	206
<i>env(g51)_1R</i>	ACCCAGAAGATTTGGGCGTC	20	60.32	55	
<i>env(gp51)_2F</i>	CAACCCGACTTTCCCGAGTT	20	60.18	55	340
<i>env(gp51)_2R</i>	CGGAGGAAGCCGTAGAGAGA	20	60.46	60	



Следующим этапом было проведение проверки работы праймеров. Нарработку ПЦР продуктов проводили в амплификаторе Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Германия) согласно режиму амплификации, подобранным нами в результате ряда экспериментов: 50°C – 30 мин, 95°C – 10 мин, 35 циклов, 94°C – 20 сек, 58°C – 20 сек, 72°C – 40 сек и 72°C – 7 мин, 4°C – хранение.

На рисунке 5 представлен электрофореграмма ПЦР, согласно которой размеры полученных ПЦР-продуктов соответствуют своим, выше указанным теоретическим размерам.



М – ДНК маркеры молекулярных весов;  
1,7 – кДНК вируса концентрация праймера в РС 0,5 мкл;  
2,8 – кДНК вируса концентрация праймера в РС 1,0 мкл;  
3,9 – кДНК вируса концентрация праймера в РС 1,5 мкл;  
4,10 – кДНК вируса концентрация праймера в РС 2,0 мкл;  
5,11 – кДНК вируса концентрация праймера в РС 2,5 мкл;  
6,12 – Отрицательный контроль

Рисунок 5 – Электрофореграмма продуктов амплификации ОТ-ПЦР с праймерами участка *env (g51)\_1* и *env (g51)\_2* кДНК лейкоза крупного рогатого скота

Таким образом, синтезированные нами праймеры отвечают всем общепринятым рекомендациям, которые используются при конструировании праймеров.

### Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований проведен поиск полных нуклеотидных последовательностей гена *env*. Проведен сравнительный анализ и множественное выравнивание полных нуклеотидных последовательностей гена. И на основе анализа последовательностей гена вируса лейкоза крупного рогатого скота, с использованием программы «OligoAnalyzer», подобраны праймеры для специфического выявления вируса. Так же произведен синтез специфических праймеров в необходимом количестве на синтезаторе олигонуклеотидов, согласно протоколам производителя. В результате проведенной апробации подобранных праймеров, судя по качеству получившихся продуктов ПЦР, оба праймера рабочие.



## Литература

- 1 ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Available online at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>
- 2 Buehring G.C., DeLaney A., Shen H. et. al. Bovine leukemia virus discovered in human blood // BMC Infect Dis. – 2019. – Vol. 19, Issue 1. – P. 297-1-297-10. doi: 10.1186/s12879-019-3891-9.
- 3 Khatami A., Pormohammad A., Farzi R. et. al. Bovine Leukemia virus (BLV) and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis of case-control studies // Infect Agent Cancer. – 2020. – Vol.15. – P. 48-1-48-8. doi: 10.1186/s13027-020-00314-7.
- 4 Gillet M., Florins A., Boxus M. et. al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human // Retrovirology. – 2007. – Vol. 4. – P. 18-1-18-32. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>
- 5 Polat M., Takeshima S.N., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus // Virol J. – 2017. - Vol.14, Issue 1. – P. 209-1-209-16. doi: 10.1186/s12985-017-0876-4.
- 6 Sultanov A., Rola-Łuszczak M., Mamanova S. et al. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan / Pathogens. – 2022. – Vol. 11, Issue 2. – P. 180-1-180-21. doi:10.3390/pathogens11020180
- 7 Bartlett P.C., Ruggiero VJ, Hutchinson H.C. et.al. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus // Pathogens. – 2020. – Vol. 9, Issue 12. – P. 1058-1-1058-13. doi: 10.3390/pathogens9121058.
- 8 Petropavlovsky M.V. Immuno-biological evaluation of individual genetic variants of bovine leukemia virus in the conditions of the Ural region / Collection: Digital agriculture - development strategy Proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019). Ser. «Advances in Intelligent Systems Research». – 2019. – P. 372-377.
- 9 Hamada R., Metwally S., Polat M. et. al. Detection and Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus in Egyptian Dairy Cattle // Front Vet Sci. – 2020. – Vol. 7. – P. 608-1-608-13. doi: 10.3389/fvets.2020.00608
- 10 Петропавловский М.В., Безбородова Н.А., Романова А.С. и др. Опыт применения полимеразной цепной реакции при диагностике вируса лейкоза крупного рогатого скота и ее эффективность на разных этапах проведения оздоровительных мероприятий / Аграрный вестник Урала. – 2019. – №12(191). – С. 52-59.
- 11 Вангели С.В. Сравнительная ультраструктурная характеристика культур клеток, хронически инфицированных вирусом лейкоза крупного рогатого скота: дис... канд.вет.наук: 06.02.02 / Вангели Сергей Валерьевич. – Москва, 2015. – 114 с.
- 12 Kerkhofs P., Gatot S., Knapen K. Longterm protection against bovine leukaemia virus replication in cattle and sheep / J. Gen.Virol. – 2000. – Vol. 81. – P. 957-963.
- 13 Rossler H., Burkhardt H., Rosental S. Influence of different culture conditions on BLV expression in permanently infected PLK cell lines / Folia biol. (CSSR). – 1985. – Vol.31, Issue 4. – P. 273-283.
- 14 Schwartz I., Bensaid A., Polack B. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle / J. Virol. – 1994. – Vol. 68, Issue 7. – P.4589-4596.
- 15 Bruck C., Rensonnet N., Portetelle D. et.al. Biologically active epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51: their dependence on protein glycosylation and genetic variability // Virology. – 1984. – Vol. 136, Issue 1. – P. 20-31. doi: 10.1016/0042-6822(84)90244-7.
- 16 Sagata N., Yasunaga T., Tsuzuku-Kawamura J. et. al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1985. – Vol. 82, Issue 3. – P. 677-681. doi: 10.1073/pnas.82.3.677.
- 17 Dieffenbach C., Dveksler G. PCR Primer: A Laboratory Manual / Cold Spring Harbor Laboratory Pr., – P. 2003-520.
- 18 Barlett J., Stirling D. PCR Protocols // Methods in molecular biology. – 2003. – Vol.226. – 556 p.
- 19 Охупкина С.С., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х. Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) и ее применение / Библиотека научных трудов СибЭнзим. – 2014. <http://sciencerrussian.sibenzyme.com/papers/popularabout/using-pcr>
- 20 Derse D., Diniak A.J., Casey J.W. et.al. Nucleotide sequence and structure of integrated bovine leukemia virus long terminal repeats / Virology. – 1985. – Vol. 141. – P. 162-166.

- 21 Derse D., Casey J.W. Two elements in the bovine leukemia virus long terminal repeat that regulate gene expression / *Science*. – 1986. – Vol. 231. – P. 1437-1440.
- 22 Гильманов Х.Х. Генотипирование крупного рогатого скота по генам, определяющим устойчивость к лейкозу, и геноидентификация его этиологического агента: дис... канд.биол.наук. / Гильманов Хамид Халимович. – Казань, 2019. – 163 с.
- 23 Martin D., Arjona A., Soto I. et.al. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus / *Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Publ. Health*. – 2001. – Vol. 48. – P. 97-106.
- 24 Облап Р.В., Глазко В.И., Созинов А.А. Вирус бычьего лейкоза и диагностика инфицированных животных / *Цитология и генетика*. – 1997. – №31. – С. 41-43.

## References

- 1 ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Available online at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>
- 2 Buehring G.C., DeLaney A., Shen H. et. al. Bovine leukemia virus discovered in human blood // *BMC Infect Dis*. – 2019. – Vol. 19, Issue 1. – P. 297-1-297-10. doi: 10.1186/s12879-019-3891-9.
- 3 Khatami A., Pormohammad A., Farzi R. et. al. Bovine Leukemia virus (BLV) and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis of case-control studies // *Infect Agent Cancer*. – 2020. – Vol.15. – P. 48-1-48-8. doi: 10.1186/s13027-020-00314-7.
- 4 Gillet M., Florins A., Boxus M. et. al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human // *Retrovirology*. – 2007. – Vol. 4. – P. 18-1-18-32. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>
- 5 Polat M., Takeshima S.N., Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus // *Virology*. – 2017. – Vol.14, Issue 1. – P. 209-1-209-16. doi: 10.1186/s12985-017-0876-4.
- 6 Sultanov A., Rola-Luszczak M., Mamanova S. et al. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan / *Pathogens*. – 2022. – Vol. 11, Issue 2. – P. 180-1-180-21. doi:10.3390/pathogens11020180
- 7 Bartlett P.C., Ruggiero VJ, Hutchinson H.C. et.al. Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9, Issue 12. – P. 1058-1-1058-13. doi: 10.3390/pathogens9121058.
- 8 Petropavlovsky M.V. Immuno-biological evaluation of individual genetic variants of bovine leukemia virus in the conditions of the Ural region / *Collection: Digital agriculture - development strategy Proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019). Ser. «Advances in Intelligent Systems Research»*. – 2019. – P. 372-377.
- 9 Hamada R., Metwally S., Polat M. et. al. Detection and Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus in Egyptian Dairy Cattle // *Front Vet Sci*. – 2020. – Vol. 7. – P. 608-1-608-13. doi: 10.3389/fvets.2020.00608
- 10 Petropavlovskij M.V., Bezborodova N.A., Romanova A.S. i dr. Opyt primeneniya polimeraznoj cepnoj reakcii pri diagnostike virusa lejkoza krupnogo rogatogo skota i ee effektivnost' na raznyh etapah provedeniya ozdorovitel'nyh meropriyatij / *Agrarnyj vestnik Urala*. – 2019. – №12(191). – S. 52-59.
- 11 Vangeli S.V. Sravnitel'naya ul'trastrukturnaya harakteristika kul'tur kletok, hronicheski inficirovannyh virusom lejkoza krupnogo rogatogo skota: dis... kand.vet.nauk: 06.02.02 / Vangeli Sergej Valer'evich. – Moskva, 2015. – 114 s.
- 12 Kerkhofs P., Gatot S., Knapen K. Longterm protection against bovine leukaemia virus replication in cattle and sheep / *J. Gen.Virol*. – 2000. – Vol. 81. – P. 957-963.
- 13 Rossler H., Burkhardt H., Rosental S. Influence of different culture conditions on BLV expression in permanently infected PLK cell lines / *Folia biol. (CSSR)*. – 1985. – Vol.31, Issue 4. – P. 273-283.
- 14 Schwartz I., Bensaid A., Polack B. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle / *J. Virol*. – 1994. – Vol. 68, Issue 7. – P.4589-4596.
- 15 Bruck C., Rensonnet N., Portetelle D. et.al. Biologically active epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51: their dependence on protein glycosylation and genetic variability // *Virology*. – 1984. – Vol. 136, Issue 1. – P. 20-31. doi: 10.1016/0042-6822(84)90244-7.

- 16 Sagata N., Yasunaga T., Tsuzuku-Kawamura J. et. al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1985. – Vol. 82, Issue 3. – P. 677-681. doi: 10.1073/pnas.82.3.677.
- 17 Dieffenbach C., Dveksler G. PCR Primer: A Laboratory Manual / Cold Spring Harbor Laboratory Pr., – P. 2003-520.
- 18 Barlett J., Stirling D. PCR Protocols // Methods in molecular biology. – 2003. – Vol.226. – 556 p.
- 19 Ohapkina S.S., Akishev A.G., Degtyarev S.H. Polimerazno-cepная reakciya (PCR) i ee primeneniye / Biblioteka nauchnykh trudov SibEnzim. – 2014. <http://sciencerrussian.sibenzyme.com/papers/popularabout/using-pcr>
- 20 Derse D., Diniak A.J., Casey J.W. et.al. Nucleotide sequence and structure of integrated bovine leukemia virus long terminal repeats / Virology. – 1985. –Vol. 141. – P. 162-166.
- 21 Derse D., Casey J.W. Two elements in the bovine leukemia virus long terminal repeat that regulate gene expression / Science. – 1986. –Vol. 231. – P. 1437-1440.
- 22 Gil'manov H.H. Genotipirovaniye krupnogo rogatogo skota po genam, opredelyayushchim ustojchivost' k lejkozu, i genoidentifikaciya ego etiologicheskogo agenta: dis... kand.biol.nauk. / Gil'manov Hamid Halimovich. – Kazan', 2019. – 163 s.
- 23 Martin D., Arjona A., Soto I. et.al. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus / Vet. Med . B. Infect. Dis. Vet. Publ Health. – 2001. – Vol. 48. – P. 97-106.
- 24 Oblap P.V., Glazko V.I., Sozinov A.A. Virus bych'ego lejkoza i diagnostika inficirovannykh zhivotnykh / Citologiya i genetika. – 1997. – №31. – S. 41-43.

## ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ ЛЕЙКОЗЫ КЕЗІНДЕ ПТР ЖҮРГІЗУГЕ АРНАЛҒАН СПЕЦИФИКАЛЫҚ ПРАЙМЕРЛЕРДІ ТАҢДАУ

У.Ж. Кужебаева \*, И.С. Бейшова , В.А. Ульянов ,  
Т.В. Ульянова , А.М. Ковальчук , Н.С. Гинятов , А.Ж. Сидарова 

«Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті» КеАҚ-ң,  
Қазақстан, Орал  
[usya\\_999@mail.ru](mailto:usya_999@mail.ru)

**Аннотация:** полимеразды тізбекті реакция (ПТР) әдісі әртүрлі мәселелерді шешу үшін кеңінен қолданылады. ПТР бактериялық және вирустық сипаттағы патогендерді анықтау үшін кеңінен қолданылады. Праймерлер ПТР-дің өте маңызды құрамдас бөлігі болып табылады, өйткені күшейту ерекшелігі бірінші кезекте оларға байланысты. Олар ферменттің жұмыс істеуі үшін қажет және спецификалық фрагментіне тән. NCBI веб-сайтындағы халықаралық дерекқордан геномның нуклеотидтік тізбегін немесе вирустың жеке РНҚ фрагменттерін іріктеу нәтижелері бойынша ген банктерінде сақталатын және күн сайын жаңа деректермен толықтырылатын ірі қара малдың лейкоз вирусына арналған көптеген тізбектер анықталды. Қажетті параметрлерді сақтай отырып, праймерлерді жобалау әртүрлі компьютерлік бағдарламалардың көмегімен жүзеге асырылады, олардың негізгілері MUSCLE, UGENE V. 36.0, Primer-BLAST, Oligo Analyzer және басқалары. Содан кейін құрастырылған праймерлер құралмен бірге берілген нұсқауларға сәйкес Expedite 8909 олигонуклеотид синтезаторында синтезделді. Жүргізілген тәжірибелер нәтижесінде біз ірі қара малдың лейкозына ПТР қою үшін *env (g51)\_1* және *env (g51)\_2* арнайы синтетикалық олигонуклеотидтерін таңдап, синтездедік.

**Түйін сөздер:** ірі қара малдың лейкозы; праймер; ген; нуклеотидтер; полимеразды тізбекті реакция

## SELECTION OF SPECIFIC PRIMERS FOR PCR IN BOVINE LEUKEMIA VIRUS

U.Zh. Kuzhebayeva \*, I.S. Beishova , V.A. Ulyanov ,  
T.V. Ulyanova , A.M. Kovalchuk , N.S. Ginayatov , A.Zh. Sidarova 

NCJSC «Zhangir Khan Agrarian Technical University», Kazakhstan, Ural  
usya\_999@mail.ru

**Abstract:** the polymerase chain reaction (PCR) method is widely used to solve various problems. PCR is widely used for the detection of bacterial and viral pathogens. Primers are a very important component of PCR, since the specificity of amplification depends primarily on them. They are necessary for the enzyme to work and are specific to the fragment of interest. Based on the results of the selection of nucleotide sequences of the genome or individual fragments of the virus RNA from the international database on the NCBI website, a large number of sequences for the bovine leukemia virus were identified, which are stored in gene banks and updated daily with new data. The construction of primers in compliance with the necessary parameters is carried out using various computer programs, the main of which are MUSCLE, UGENE V.36.0, Primer-BLAST, Oligo Analyzer and others. The designed primers were then synthesized on the Expedite 8909 oligonucleotide synthesizer, according to the instructions attached to the device. As a result of our experiments, we selected and synthesized specific synthetic oligonucleotides *env (g51)\_1* and *env (g51)\_2*, for setting up PCR for bovine leukemia.

**Keywords:** bovine leukemia virus: primer; gene; nucleotides; polymerase chain reaction