

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПОСТАНОВКИ ПЦР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К МАСТИТУ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

И. С. БЕЙШОВА, А. М. КОВАЛЬЧУК, У. Ж. КУЖЕБАЕВА, Т. В. УЛЬЯНОВА,
В. А. УЛЬЯНОВ, Н. С. ГИНАЯТОВ, Л. Ж. ДУШАЕВА, Э. Р. АГИШЕВА

НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана»,
г. Уральск, Казахстан, e-mail: indira_bei@mail.ru

(Поступила в редакцию 20.01.2023)

Одними из самых распространенных и наносящих значительный урон скотоводческой отрасли, проявляющийся в ветеринарных расходах на лечение, недополучение молока и преждевременной выбраковки высокопродуктивных коров, не только в Казахстане, но и во всем мире являются заболевания молочной железы - мастит. Многолетние исследования этиологии мастита, механизмов их передачи и лечения установили, что данное заболевание молочной железы коров обусловлено многими внешними и генетическими факторами. Использование полного потенциала иммунитета сельскохозяйственных животных может внести решающий вклад в состояние здоровья и благополучие животных. В данной статье рассмотрена оптимизация методики постановки ПЦР для определения резистентности к маститу крупного рогатого скота. Были взяты полиморфные локусы генов *TLR4-BstU1*, *TLR6-Tag1*, *TLR9-BfaI*. Была проведена работа по идентификации участка, содержащий мутацию и сайт рестрикции, подбору состава реакционной смеси и времени проведения реакции. В результате были получен чистый ПЦР-продукт с достаточной концентрацией ДНК.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, мастит, голштинская порода, полиморфизм, ген, устойчивость

One of the most common disease, causing significant damage to the livestock industry, manifested in veterinary treatment costs, lack of milk and premature culling of highly productive cows, not only in Kazakhstan, but throughout the world, is udder disease – mastitis. Long-term studies of the etiology of mastitis, the mechanisms of its transmission and treatment have established that this disease of the mammary gland of cows is due to many external and genetic factors. Harnessing the full potential of farm animal immunity can make a decisive contribution to animal health and welfare. This article discusses the optimization of the PCR method for determining resistance to mastitis in cattle. Polymorphic loci of the *TLR4-BstU1*, *TLR6-Tag1*, *TLR9-BfaI* genes were taken. Work was carried out to identify the site containing the mutation and the restriction site, the selection of the composition of the reaction mixture and the time of the reaction. As a result, a pure PCR product with sufficient DNA concentration was obtained.

Key words: cattle, mastitis, Holstein breed, polymorphism, gene, resistance.

Введение

Животноводство Казахстана занимает около 43 % от всей валовой продукции сельского хозяйства, является основным источником занятости, питания и доходов сельского населения и его развитие является одной из основных стратегических экономических задач республики [1]. Ведущей отраслью агропромышленного комплекса республики, на долю которой приходится около 20 % объема производимых в Казахстане продуктов питания всегда была и остается молочная отрасль.

Большую роль в наращивании производительности молочной отрасли играют не только современные технологии разведения и селекции крупного рогатого скота, но и применение современных методов борьбы с инфекционными заболеваниями. Стоит отметить, что борьба с болезнями сельскохозяйственных животных представляет собой постоянные экономические потери, складывающиеся из ветеринарного обслуживания хозяйств. Во всем мире обеспечение безопасного содержания животных и увеличение их устойчивости к болезням – предмет масштабных исследовательских программ, которые реализуются под эгидой международных организаций таких как GREP, FAO.

Одним из широко распространенных заболеваний среди коров является мастит. Мастит относится к категории сложных и убыточных заболеваний, особенно его скрытая форма. Причины возникновения мастита крупного рогатого скота в настоящее время до конца не изучены. Особое этиологическое значение придают стафилококкам, стрептококкам, кишечной палочке [2]. Ряд ученых признают, что основной причиной мастита является инфекционное начало [3], также существуют исследования, говорящие, что в этиологии болезни главную роль играет нарушение ветеринарно-зоотехнических правил кормления, содержания и доения коров, травмы и послеродовые осложнения [4]. Учитывая высокий экономический ущерб при мастите, изыскание различных мер профилактики данного заболевания является актуальным.

Несмотря на общую эффективность борьбы с маститом посредством вакцинации и антибиотиков, появление лекарственно-устойчивых патогенов привело к тому, что ряд классов антибиотиков, доступных для терапии и профилактики, становится ограниченным [5]. Следовательно, использование полного потенциала иммунитета сельскохозяйственных животных может внести решающий вклад в состояние здоровья и благополучие животных.

Изучение, выявление и привлечение в селекционные программы по повышению молочной продуктивности генетических маркеров устойчивости к маститу крупного рогатого скота способствует внесению значительного вклада в развитие отечественной селекции и ветеринарии.

Поиск генетических маркеров устойчивости к инфекциям в первую очередь сосредоточен на генах, кодирующих основные компоненты врожденного иммунитета, особенно семейства рецепторов распознавания видов инфекций, к которым среди прочих относятся так называемые Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors) [6].

Семейство *TLR* у крупного рогатого скота включает *TLR* *s* 1–10, которые участвуют в распознавании патоген-ассоциированных молекулярных паттернов вирусных, бактериальных и грибковых патогенов и взаимно дополняют друг друга. Исходя из их специфичности, Toll-подобные рецепторы в основном локализуются либо в плазмалемме (антибактериальные виды), либо в эндоплазматической сети (антивирусные виды) [7]. Гены *TLR* млекопитающих кодируют трансмембранные белки типа I, содержащие крупный внеклеточный домен. Внешняя (обычно внеклеточная) N-концевая область состоит из приблизительно 20 лейцин-богатых повторов.

Фенотипический эффект полиморфных вариантов генов *TLR* был подтвержден во многих исследованиях для крупного рогатого скота. Благоприятный эффект изменения одной аминокислоты в *TLR4* на устойчивость к болезням вымени и устойчивость к лактации был продемонстрирован в канадской популяции голштинского крупного рогатого скота [8]. Роль полиморфизма *TLR4* в резистентности к маститу дополнительно подтверждается связью обнаруженного *AluI* полиморфизма у крупного рогатого скота *TLR4* с частотой возникновения мастита у крупного рогатого скота [9]. Эффект полиморфизма *TLR4* был обнаружен при инфекционном кератоконъюнктивите крупного рогатого скота у породы американский ангус [10]. Также показано влияние полиморфных вариантов генов *TLR* на развитие бруцеллеза [11].

Для определения полиморфизма гена *TLR* важным является оптимизация параметром постановки молекулярно-биологических методов исследования. В данной статье представлена оптимизация методики ПЦР-ПДРФ для исследуемых полиморфных локусов генов *TLR*.

Основная часть

Диагностика больных животных и молекулярно-генетические исследования, а также обработка полученных результатов проводились на базе лаборатории биотехнологии и диагностики инфекционных болезней ИЦ ЗКАТУ им. Жангир хана совместно с соисполнителем проекта из Беларуси – Е. В. Белой.

Объектом исследования являлся крупный рогатый скот голштинской породы. Материалом для исследования являлись волосяные луковицы, кровь, молоко. Серологические, бактериологические исследования сыворотки крови, молока крупного рогатого скота проводились согласно общепринятым методикам. ДНК выделяли при помощи коммерческого набора «ДНК-Экстрэн-2» согласно инструкции производителя. Для определения концентрации и качества полученной ДНК в растворе использовали спектрофотометрический метод.

Праймеры для проведения ПЦР были синтезированы компанией «Синтол». Состав реакционной смеси для исследуемых полиморфных локусов генов *TLR* отражен в табл. 1.

Таблица 1. Состав реакционной смеси для исследуемых полиморфных локусов генов *TLR*

Компоненты	Объем, мкл
10x Taq Buffer KCL	2,0
Смесь dNTP (25 mM)	2,0
Праймер 1 (10 pM)	2,0
Праймер 2 (10 pM)	2,0
Taq DNA Polymerase 5U/μl	2,0
25 mM MgCl ₂	2,0
Деионизированная вода	10,0
ДНК матрица	2,0
Общий объем	24,0

Последовательности праймеров и условия ПЦР для анализа каждого полиморфизма приведены в таблице 2. Полимеразную цепную реакцию генов проводили в амплификаторе ProFlex PCR System, «Applied Biosystems».

Таблица 2. Индивидуальные характеристики условий ПЦР для исследуемых полиморфных локусов генов *TLR*

Полиморфизм	Температура отжига праймеров	Последовательности праймеров	Ссылки
<i>TLR4</i> -BstU1	59°C	F: 5'-CGTAACCCAGCACTGCTTTG-3'	[12]
		R: 5'-GCCTGTTAATGCCCTGTAACC-3'	
<i>TLR6</i> -Tag1	63°C	F: 5'-AAAGAATCTCCCATCAGAAGCT-3'	[13,14]
		R: 5'-GAAGGATACAACCTTAGGTGCAA -3'	
<i>TLR9</i> -Bfal	63°C	F: 5'-ATCTTCAACGACCTGACCCA-3'	[15]
		R: 5'-AATCGCCAGACTTCCACCCT-3'	

Детекцию ПЦР-продуктов проводили в 2%-ом агарозном геле в течении 1 часа и 3%-ом агарозном геле в течении 2 часов при 110V. Результат анализа детектировали при помощи геле-документирующей системы.

Полиморфизма гена *bTLR4*, представляет собой С/Т трансверсию в положении +10 гена *bTLR4* и приводит к замене аргинина на цистеин в экзоне 1 [12].

По данным международной базы GenBank была извлечена последовательность гена. С помощью программы BLAST идентифицирован участок, содержащий мутацию и сайт рестрикции:

CGTAACCCAGCACTGCTTTGaataggggcagtgccctggggcaccsaagccggggagagac-gaacactacagtcctcggaggctgcctggccggcacaga-cagagggtcatgcttcacagagccactctgtgtcacagaaaatgccag-gatgatggCG/CGtgcccgcctggctgcggctctgatcccagccacggccatcctctcctgcctgagaaccgagagtgggacccttgcgtacaggtacgtggcttcctgagcttggccttgcctctcgtgaaaaactgctctctgctcag-tttcctgtgctgggcccctggttaggttcatttgcaaacagatcaaattactttaagtaa-gaaaccgaggaatcaaatgattcat**GGTTACAGGGCATTAACAGGC**

Таким образом, последовательности праймеров для амплификации необходимого фрагмента следующие:

bTLR4-BstU1F: 5'-CGTAACCCAGCACTGCTTTG-3'

bTLR4-BstU1R: 5'-GCCTGTTAATGCCCTGTAACC-3'

Температура отжига, рассчитанная программой Oligoanalyzer 59,2°C.

Для подбора оптимальных условий амплификации, позволяющих получить чистый ПЦР-продукт и с достаточной концентрацией ДНК, ставится ПЦР с градиентом температур отжига. В нашем случае, с учетом длины, состава праймеров градиент температур находился в интервале 57–66 °С. И включал температуры 57, 59, 61, 63, 65 и 67°C. Режим амплификации стандартный с удлинённой фазой отжига до 60 сек: 95°C - 10 мин (94°C - 30 сек, 57-67°C - 60 сек, 72°C - 30 сек) x 30 циклов.

Протокол ПЦР: 10x Taq Buffer KCL – 2,0 мкл; смесь dNTP (25 mM) – 2,0 мкл; праймер F (10 pM) – 2,0 мкл; праймер R (10 pM) – 2,0 мкл; Taq DNA Polymerase 5U/μl – 2,0 мкл; 25 mM MgCl₂ – 2,0 мкл; деионизированная вода – 6,0 мкл; ДНК матрица – 2,0 мкл; общий объем – 20,0 мкл.

Результаты градиентной ПЦР приведены на рисунке. Амплифицируется фрагмент 405 п.н. (рис.1).

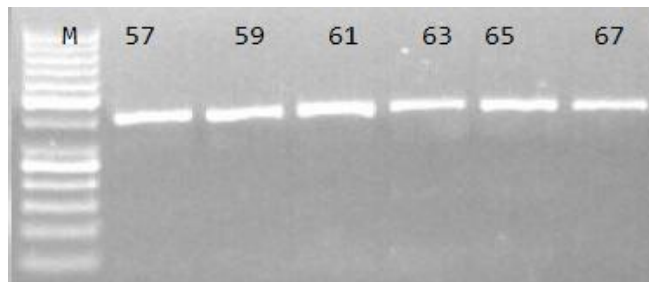


Рис. 1. Градиентная ПЦР для подбора оптимальной температуры отжига праймеров по полиморфному участку *bTLR4*-BstU1. Объем нанесения амплификата 5 мкл. Амплифицируется фрагмент 405 п.н.

Как видно на рис. 1, оптимальной является температура 61 °С. На дорожке, соответствующей этой температуре самый яркий и чистый амплификат. За счет высокой концентрации амплифицируемого фрагмента количество циклов было уменьшено до 25. В дальнейшем это позволило сократить время амплификации (рис. 2).

После рестрикции *BstU1* и разгонки идентифицируются генотипы: ТТ (405 п.н.), СТ (405, 246 и 159 п.н.) и СС (246 и 159 п.н.).

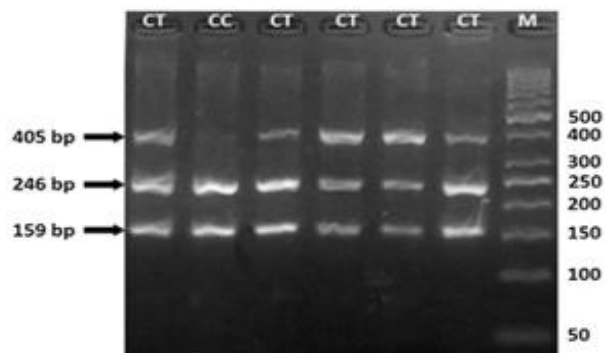


Рис. 2. Визуализация полиморфизма длин рестриционных фрагментов *BstU1* – полиморфного участка гена *bTLR4* в 2% агарозном геле

Как видно на рис. 2 на дорожках визуализируются фрагменты рестрикции амплификата, взятого в объеме 5 мкл на 1 образец. В частности, буквами СТ обозначены дорожки, на которых видны полосы 405, 246 и 159 п.н., соответствующие генотипу *bTLR4*-BstU1^{CT}. На дорожках СС наблюдаются полосы длиной 246 и 159 п.н., соответствующий генотипу *bTLR4*-BstU1^{CC}. Животных с генотипом *TLR4*-BstU1^{TT} выявлено не было.

Полиморфизм *bTLR6*-Tag1 представляет собой Т/С трансверсию в положении +979 гена *bTLR6*, сопровождающейся заменой аминокислоты цистеин на валин в положении белка 174 (Gen Bank KY 626166) [13,14].

По данным международной базы GenBank была извлечена последовательность гена. С помощью программы BLAST идентифицирован участок, содержащий мутацию и сайт рестрикции:

AAAGAATCTCCCATCAGAAGCTgtcattttgttacattgtggccttagtatttggaaacca-taatccagttctctgatgaaagtgaatttggtagacatgtcaaaaacaagccttattcatgttcccaaacctgccaccaaaaaccaaaagtcttagactt-gtctcaaaaacaacatatctgagcttcacctgtctgatatcagctttctctcagggtgagag-ttctgagactttccataatagaatccagggccttgatattagattttcaagttcaac-catgatttggaaatatttggatttctcataatcagttgcagaaga-tatcctgccatccaatcaccacgactctcaagcatttagac-ctctcattcaatgact**TC/GA**tgccttgcctcatctgtaaggaatttggcaacttgaccaactgaatttcttaggattaagtgtacaaaagttacaacaattagattactaccattgctcac**TTGCACCTAAGTTGTATCCTTC**

Таким образом, последовательности праймеров для амплификации необходимого фрагмента следующие:

bTLR6-Tag1F: 5'-AAAGAATCTCCCATCAGAAGCT-3'

bTLR6-Tag1R: 5'-GAAGGATACAACCTTAGGTGCAA -3'

Температура отжига, рассчитанная программой Oligoanalyzer 59°C. Длина фрагмента 515 п.н.

Для подбора оптимальных условий амплификации, позволяющих получить чистый ПЦР-продукт с достаточной концентрацией ДНК, ставится ПЦР с градиентом температур отжига. В нашем случае, с учетом длины, состава праймеров градиент температур находился в интервале 57-66°C и включал температуры 57, 59, 61, 63, 65 и 67°C. Режим амплификации стандартный с удлиненной фазой отжига до 60 сек: 95 – 10 мин, (94°C -30 сек, 57-67°C - 60 сек, 72°C - 30 сек) x 30 циклов (рис. 3).

Протокол ПЦР: 10x Taq Buffer KCL - 2,0 мкл; Смесь dNTP (25 mM) – 2,0 мкл; праймер F (10 pM) – 2,0 мкл; праймер R (10 pM) – 2,0 мкл; Taq DNA Polymerase 5U/μl – 2,0 мкл; 25 mM MgCl₂ – 2,0 мкл; деионизированная вода – 6,0 мкл; ДНК матрица – 2,0 мкл; общий объем – 20,0 мкл.

Результат градиентной ПЦР приведены на рис. 3. Амплифицируется фрагмент 405 п.н.

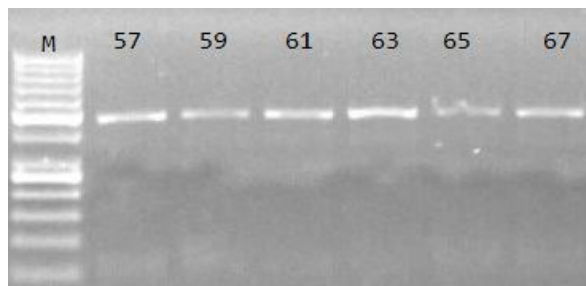


Рис. 3. Градиентная ПЦР для подбора оптимальной температуры отжига праймеров по полиморфному участку *bTLR6*-Tag1. Объем нанесения амплификата 5 мкл. Амплифицируется фрагмент 515 п.н.

Как видно на рис. 3, оптимальной является температура 63°C. На дорожке, соответствующей этой температуре самый яркий и чистый амплификат. Для увеличения выхода амплифицируемого фрагмента количество циклов было увеличено до 35. В дальнейшем это позволило брать по 5 мкл амплификата для постановки рестрикции в объеме 10 мкл реакционной смеси (рис. 4).

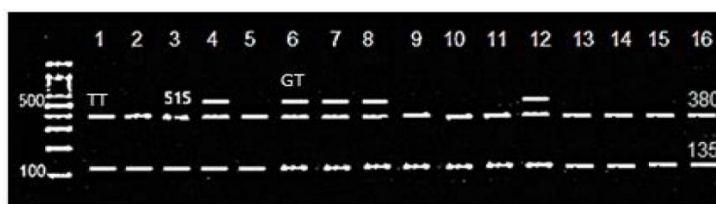


Рис. 4. Визуализация полиморфизма длин рестриционных фрагментов *TaqI* – полиморфного участка гена *bTLR6* в 2% агарозном геле

Как видно из рис. 4 после рестрикции *TagI* и разгонки идентифицируются генотипы: генотипы *bTLR6*-Taq1^{GT} 515, 380, 135 п.н., *bTLR6*-Taq1^{TT} 380, 135 п.н., *bTLR6*-Taq1^{GG} 515 п.н.

Полиморфизм *bTLR9*-*BfaI* представляет собой Т/С трансверсию в положении +979 гена *bTLR6*, сопровождающейся заменой аминокислоты цистеин на валин в положении белка 174 (Gen Bank KY 626166, TLR9-A2700G exon2 (2617–2978) [15]).

По данным международной базы GenBank была извлечена последовательность гена. С помощью программы BLAST идентифицирован участок, содержащий мутацию и сайт рестрикции:

АТСТТСААСГАССТГАСССАgctgctgagactcaacctgctctcaattaccasa-
gaaggtgctcttcgccacctg-
cac**CT/GG**ctctctcttgggagtctggtgctccctggagaagctggacatgcacggcatcttctccgctccctaccaacatcacgctccagccgctgac
ccggctgcccgaagctccagagtctgctgctgagctgaactcatcaaccagcccagctcag-
catcttggggcctcccagcctgctctctgctgctggacaaccgcatcagcg-
gagccgcgacgcccagcggccgacctgggggaggtggacagc**AGGGTGGAAAGTCTGGCGATT**

Таким образом, последовательности праймеров для амплификации необходимого фрагмента следующие:

TLR9-*BfaI*F: 5'-АТСТТСААСГАССТГАСССА-3'

TLR9-*BfaI*R: 5'-ААТССГССАГАСТТССАСССТ-3'

Температура отжига, рассчитанная программой Oligoanalyzer 60°C. Длина фрагмента 362 п.н.

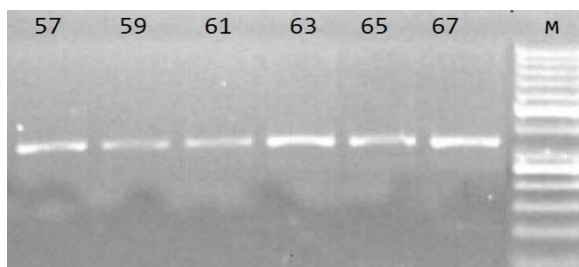


Рис. 5. Градиентная ПЦР для подбора оптимальной температуры отжига праймеров по полиморфному участку *bTLR9* - *BfaI*. Объем нанесения амплификата 5 мкл. Амплифицируется фрагмент 362 п.н.

Для подбора оптимальных условий амплификации, позволяющих получить чистый ПЦР-продукт с достаточной концентрацией ДНК, ставился ПЦР с градиентом температур отжига. В нашем случае, с учетом длины, состава праймеров градиент температур находился в интервале 57–66°C и включал температуры 57, 59, 61, 63, 65 и 67 °C. Режим амплификации стандартный с удлиненной фазой отжига до 60 сек: 95 °C – 10 мин (94 °C – 30 сек, 57–67 °C – 60 сек, 72 °C – 30 сек) x 30 циклов (рис. 5).

Протокол ПЦР: 10x Taq Buffer KCL – 2,0 мкл; Смесь dNTP (25 mM) – 2,0 мкл; праймер F (10 pM) – 2,0 мкл; праймер R (10 pM) – 2,0 мкл; Taq DNA Polymerase 5U/μl – 2,0 мкл; 25 mM MgCl₂ – 2,0 мкл; деионизированная вода – 6,0 мкл; ДНК матрица – 2,0 мкл; общий объем – 20,0 мкл. Результаты градиентной ПЦР приведены на рис. 5. Амплифицируется фрагмент 362 п.н.

Как видно на рис. 5, оптимальной является температура 63 °C. На дорожке, соответствующей этой температуре самый яркий и чистый амплификат. Для увеличения выхода амплифицируемого фрагмента количество циклов было увеличено до 40. В дальнейшем это позволило брать по 5 мкл амплификата для постановки рестрикции в объеме 10 мкл реакционной смеси.

При замене G → A возникает сайт реестр для *BfaI* (режет С-TAG). Таким образом режется редкий мутантный аллель на 2 фрагмента 82 и 280 п.н. (рис. 6).

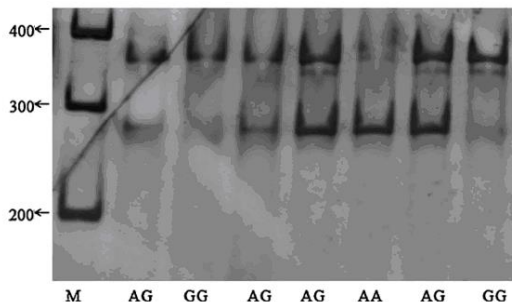


Рис. 6. Визуализация полиморфизма длин рестриционных фрагментов *BfaI* – полиморфного участка гена *bTLR9* в 2 % агарозном геле

Как видно из рис. 6, после рестрикции BfaI идентифицируются генотипы: *bTLR9*-BfaI^{AA} 280 и 82 п.н., *bTLR9*-BfaI^{AG} 362, 280 и 82 п.н. и *bTLR9*-BfaI^{GG} 362 п.н.

Заключение

Таким образом, нами в результате были оптимизированы параметры постановки ПЦР по полиморфизмам гена *bTLR4*, *bTLR6*, *bTLR9*. Была проведена работа по идентификации участка, содержащий мутацию и сайт рестрикции, подбору состава реакционной смеси и времени проведения реакции. В результате были получен чистый ПЦР-продукт с достаточной концентрацией ДНК.

Финансирование. Работа выполнялась в рамках проектов грантового финансирования Министерства образования и науки Республики Казахстан:

1. AP13268821 «Генетические механизмы резистентности к маститу по генам PRL и BLG у крупного рогатого скота голштинской породы» на 2022-2024 гг. по проекту «Жас ғалым».

2. AP08052983 «Разработка системы оценки резистентности/восприимчивости к бактериальным инфекциям по полиморфизмам генов врожденного иммунитета у крупного рогатого скота голштинской породы» на 2020–2022 гг. по грантовому финансированию для молодых ученых.

ЛИТЕРАТУРА

1. Назарбаев, Н. А. Послание Президента Республики Казахстан – Лидера нации Нурсултана Назарбаева народу Казахстана «Стратегия «Казахстан-2050» - новый политический курс состоявшегося государства» / Н. А. Назарбаев // Казахстанская правда. – 2012. – С. 2–10.

2. Shathele M. S. Weather effect on bacterial mastitis in dairy cows // International Journal of Dairy Science. – 2009. – №2.

3. Mahantesh M. Kurjogi, Basappa B. Kaliwal Epidemiology of Bovine Mastitis in Cows of Dharward District // International Scholarly Research Notices. 2014.

4. Frey Y., Rodriguez J. P., Thomann A. et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk // Journal of dairy science. – 2013. – V.96(4). P.2247–2257.

5. Phillips I., Casewell M., Cox T. et al. Antibiotic use in animals. J. Antimicrob. Chemother. 2004. 53: 885.

6. Franzenburg S., Fraune S., Kunzel S. et al. MyD88-deficient Hydra reveal an ancient function of TRL signaling in sensing bacterial colonizers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012.109:19374-19379.

7. Kaisho T., Akira S. Toll-like receptor function and signaling // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2006. – V. 117(5). – P. 979–987.

8. Sharma B. S., Leyva I., Schenkel F., Karrow N. A. Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls // Journal of Dairy Science. – 2006. – V. 89(9). – P. 3626–3635.

9. Wakchaure R. S., Gupta I. D., Verma A. et.al. Association of genetic variants of partial exon 3 region of TLR4 gene with mastitis in Sahiwal cattle // Indian Journal of Animal Research. – 2012. – V.46. – P. 208–209.

10. Kataria R. S., Tait R. G., Jr, Kumar D. Association of toll-like receptor four single nucleotide polymorphisms with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in cattle // Immunogenetics. – 2011. – V.63 (2). – P. 115–119.

11. Prakash O., Kumar A., Sonwane A. et al. Polymorphism of cytokine and innate immunity genes associated with bovine brucellosis in cattle // Molecular Biology Reports. – 2014. – V.41. –P. 2815–2825.

12. Prakash O., Kumar A., Sonwane A. et al. Polymorphism of cytokine and innate immunity genes associated with bovine brucellosis in cattle // Molecular Biology Reports. – 2014. – V.41. – P. 2815–2825.

13. Elmaghray M. M., Nahas A. F., Fathala M. M. et al. Association of toll-like receptors 2 and 6 polymorphism with clinical mastitis and production traits in Holstein cattle // Iranian Journal of Veterinary Research. – 2018. – V. 19(3). – P. 202–207.

14. Mariotti M., Williams J.L., Dunner S. et al. Polymorphisms within the toll-like receptor (TLR)-2, -4 and -6 genes in cattle // Diversity. – 2009. –V.1. –P. 7–18.

15. Sun L., Song Y., Riaz H. et al. Polymorphisms in toll-like receptor 1 and 9 genes and their association with tuberculosis susceptibility in Chinese Holstein cattle // Vet Immunol Immunopathol. – 2012. – №147 (3–4). – P. 195–201.