

НАПРАВЛЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАЗРАБОТОК ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ЯИЧНОЙ ПТИЦЫ

Романов М.Н.,^{1,2} Кочиш И.И.,¹ Шарафетдинов Г.Р.,¹
Мясникова О.В.,¹ Никонов И.Н.,¹
Селина М.В.,¹ Сурай П.Ф.^{1,3,4,5}

¹ ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия;

² Университет Кента, Кентербери, Великобритания;

³ Университет Святого Иштвана, Гёдёллё, Венгрия;

⁴ Тракийский Университет, Стара Загора, Болгария;

⁵ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: m.romanov@kent.ac.uk

Аннотация

Реализация генетического потенциала кур-несушек позволяет достигать максимально возможный выход яичной продукции на фоне применения эффективных композиций кормов и различных кормовых добавок. Внедрение молекулярно-генетических технологий для анализа микробиоты кишечника и экспрессии ключевых генов продуктивности и резистентности является важным инструментом в исследовании механизмов воздействия кормовых препаратов на макроорганизм птицы. В рамках проекта по разработке современных биотехнологий для оценки экспрессии генов нами осуществлен эксперимент по изучению человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b на экспрессию генов продуктивности и иммунитета у кур-несушек. Показаны положительное влияние препарата на иммунную систему птиц и эффективность молекулярно-генетических технологий для оценки экспрессии ключевых генов и использования изучаемых добавок в кормлении яичной птицы.

Ключевые слова: молекулярно-генетические технологии, экспрессия генов, RT-PCR, кишечник, куры-несушки, интерферон, иммунитет

Введение

В условиях современного промышленного животноводства и птицеводства ключевое внимание уделяется такому направлению, как обеспечение высокого уровня реализации генетического потенциала продуктивности [3,8,22]. Решению этой задачи не в последнюю очередь призваны содействовать технологии кормления животных и птицы на основе разработки эффективных композиций кормов и применения различных кормовых добавок (пребиотиков, пробиотиков, фитобиотиков и т. д.) [2, 4, 23–25]. Важным аспектом при этом является выяснение механизмов влияния кормовых препаратов на функциональное состояние микробиоты в содержимом кишечника различных видов животных и птицы [4, 23, 24].

Микробиота кишечника рассматривается как первичное звено в физиологических, биохимических и иммунных процессах макроорганизма, представляющих собой основу для поддержания устойчивой жизнеспособности и повышения резистентности и продуктивности животных [1,5,17–19,26–28,30–33]. Еще одним важным направлением исследований в этой области является оценка экспрессии генов, связанных с продуктивностью и устойчивостью животных к заболеваниям и неблагоприятным факторам, включая стрессы [20]. Накопленные данные по генетике и геномике сельскохозяйственной птицы реализуются и применяются на практике как в биологии, так и в птицеводческой науке [15,21,29]. Комплексная разработка молекулярно-генетических технологий для анализа состава микробиоты и экспрессии ключевых генов продуктивности и устойчивости [23] находится в числе актуальных проблем и современных трендов генетики и биотехнологии, в том числе в свете задач по развитию передовых отечественных технологий.

В связи с этим на базе ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина осуществляется крупный научно-исследовательский проект по разработке современных биотех-

нологий для оценки экспрессии генов в связи с продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям в птицеводстве [3,14,16]. Его целью является освоение и применение молекулярно-генетических технологий для анализа экспрессии генов, играющих ключевую роль в обеспечении продуктивности и устойчивости к заболеваниям у кур, а также для оценки микрофлоры кишечника и кормов, воздействия кормовых добавок [14–16].

В ходе проведенных научных исследований в рамках этого проекта проанализирована экспрессия совокупности генов, участвующих в формировании признаков продуктивности и резистентности у промышленных кур-несушек [24]; тестированы кормовые добавки, влияющие на экспрессию целевых генов у несушек в условиях вивария и промышленного опыта [2,4]; изучено влияние кормовых добавок на общее состояние и микробиоту кишечника у кур яичных пород [24]; моделированы зависимости продуктивности и экспрессии связанных с ней генов птицы от типа и состава кормовой добавки [10–12,25]; разработаны методические и практические рекомендации по применению молекулярно-генетических методов и использованию кормовых добавок, прошедших испытания в промышленных условиях на высокопродуктивных промышленных курах-несушках [6–9,13]; проведены NGS-анализы (высокопроизводительное секвенирование) содержимого микробиоты кишечника кур [24].

В настоящей работе проводили исследование действия человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b (IFN α -2b) на экспрессию генов продуктивности и иммунитета у кур-несушек. С этой целью осуществлены подбор генов и оценка экспрессии генов в динамике при введении препарата интерферон альфа-2b курам-несушкам родительского стада в возрасте 20 недель.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в Международной лаборатории молекулярной генетики и геномики птицы, созданной в ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина. Для исследований были получены образцы тканей матки и слепых отростков от здоровой птицы. Анализ экспрессии генов кур проводили через

30 суток после начала интратрахеального введения препарата. Использовался метод ПЦР в реальном времени (RT-PCR).

Для опыта были подобраны куры-несушки одного возраста при идентичных условиях клеточного содержания в виварии МВА имени К. И. Скрябина и одинаковом уровне продуктивности. В контроле и опыте куры получали стандартный рацион, соответствующий по питательности принятым нормативам. В опытной группе проводилось разовое введение препарата в дозировке 1 млн ед. в соответствии с рекомендациями производителя.

Ежесуточно учитывали: общее количество снесенных яиц и процент яиц с дефектами скорлупы (насечка, бой). Статистическая обработка данных журналов была проведена с помощью программного обеспечения Microsoft Office.

Тотальную РНК из образцов выделяли вручную при помощи набора RNeasy Midi Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Контроль качества суммарной РНК выполняли на флуориметре Qubit 3.0 с применением набора Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Синтез кДНК на матрице суммарной РНК (реакцию обратной транскрипции) проводили при помощи набора iScript RT Supermix (BioRad, США) на термостате ГНОМ.

Реакцию амплификации с праймерами генов интереса осуществляли при помощи набора Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Реакцию проводили в стандартных 96-луночных оптических плашках Corning Axygen® PCR-96-LP-FLT-C на амплификаторе Light Cycler® 96 System (Roche, Швейцария).

Температурный профиль реакции амплификации представлен в табл. 1.

Таблица 1

Температурный профиль реакции амплификации

Шаг	Температура, °С	Время, сек	Количество циклов
«Горячий» старт	95	600	1
Денатурация	95	15	40
Отжиг праймеров	см. табл. 2	30	
Элонгация	72	30	
Завершение синтеза	72	600	1

Характеристика генов и нуклеотидные последовательности праймеров представлены в табл. 2.

Таблица 2

Характеристика генов
и нуклеотидные последовательности праймеров

Ген	Действие	Праймеры	Температура отжига праймеров, °С
<i>TBP</i>	ТАТА-связывающий белок (референсный ген, или ген «домашнего хозяйства»)	F: AGCTCTGGGATAGTGCCACA G R:ATAATAACAGCAGCAAAAC GCTTG	56
<i>IL8</i>	Интерлейкин-8; белок класса цитокинов и мар-	F: GGAAGAGAGGTGTGCTTGGA R: TAACATGAGGCACCGATGTG	60

Ген	Действие	Праймеры	Температура отжига праймеров, °С
	кер хронических и острых воспалений, является важным фактором воспалительных и иммунных реакций		
<i>AvB D9</i> (<i>Gal-9</i>)	β-дефензин-9 (галинацин-9); катионный пептид иммунной системы, который участвует в антимикробной защите организма, подавлении болевой и воспалительной реакций	F: GGAAGAGAGGTGTGCTTGG R: TAACATGAGGCACCGATGTG	60

В дополнение к этим генам оценивали экспрессию гена *IFIT5*, который контролирует синтез интерферон-индуцированного протеина, участвующего во врожденном иммунном ответе.

Результаты исследований и обсуждение

В результате проведенных исследований получены показатели экспрессии генов интереса, представленные в табл. 3.

Таблица 3

Оценка экспрессии генов в контрольных и опытных группах кур

Экспрессия гена <i>IFIT5</i>					
Группы	<i>TBP</i>	<i>IFIT5</i>	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
Контрольная	23,83±0.5	22,54±0.5	-1,29	0	1
Опытная	24,43±0.5	22,82±0.5	-1.6	-0.33	1.26
Экспрессия гена <i>IL8</i>					
Группы	<i>TBP</i>	<i>IL8</i>	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
Контрольная	23,9±0.5	28,64±0.5	4,74	0	1
Опытная	24,53±0.5	28,64±0.5	4,11	-0,63	1,55
Экспрессия гена <i>AvBD9</i>					
Группы	<i>TBP</i>	<i>AvBD9</i>	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
Контрольная	23,71±0.5	37,19±0.5	13,49	0	1
Опытная	24,43±0.5	33,96±0.5	9,53	-3,96	15,51

Во всех трех экспериментах наблюдалась достоверное различие по экспрессии генов интереса между опытом и контролем (при $p < 0,05$). В частности, экспрессия гена *IFIT5* увеличилась в 1,26 раза, гена *IL8* – в 1,55 раза и гена *AvBD9* – в 15,51 раза по сравнению с опытной группой (табл. 3).

Кроме того, было отмечено, что возрастные изменения не оказали существенного влияния на экспрессию изучаемых генов.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что препарат Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный достоверно влияет на уровень экспрессии генов продуктивности и резистентности, что свидетельствует о его положительном влиянии на иммунную систему птиц. В целом данные эксперименты демонстрируют эффективность молекулярно-генетических технологий для анализа экс-

прессии генов, имеющих ключевое значение в обеспечении продуктивности и иммунитета у кур-несушек, а также для оценки эффективного использования тех или иных кормовых добавок в кормлении промышленной птицы.

Исследования проведены при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.W03.31.0013 от 20 февраля 2017 г.).

Список литературы

1. Кочиш И.И., Романов М.Н. и др. Определение микробиоценозов кишечника кур яичных кроссов. Мировые и российские тренды развития птицеводства: реалии и вызовы будущего, 2018, с. 240–243.

2. Кочиш И.И., Романов М.Н. и др. Пути повышения продуктивных показателей кур (на примере использования кормовой добавки на основе шунгита). Современные тенденции сельскохозяйственного производства в мировой экономике, 2020, с. 37–44.

3. Кочиш И.И., Романов М.Н. и др. Современные биотехнологии для оценки экспрессии генов кур в связи с продуктивностью и устойчивостью к заболеваниям. Современные проблемы ветеринарии, зоотехнии и биотехнологии, 2020, с. 102–106.

4. Кочиш И.И., Романов М.Н. и др. Влияние пребиотика Ветелакт на микробиоту кишечника кур родительского стада. Проб. вет. са-нит. гиг. экол., 2021, № 2 (38), с. 152–156.

5. Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А., Никонов И.Н., Кочиш И.И., Романов М.Н. и др. Определение микробиоценозов кишечника кур породы «Хайсекс» методом T-RFLP в онтогенезе. Acta Naturae, 2017, 9 (Спец-вып. № 1): 33.

6. Методические рекомендации по внедрению разработанной системы профилактики бактерий-патогенов путем коррекции рационов питания у кур несушек и применения антимикробных добавок / Кочиш И.И., Смоленский В.И., Лаптев Г.Ю., Романов М.Н. и др., МВА им. К. И. Скрябина, 2018.

7. Методические рекомендации по использованию современных био-технологий для оценки экспрессии генов, связанных с продуктивностью и устойчивостью птицы к неблагоприятным факторам / Кочиш И.И., Романов М.Н. и др., МВА им. К. И. Скрябина, 2019.

8. Методические рекомендации по применению основ технологии кормления яичных кур, обеспечивающей высокий процент реали-

зации их генетического потенциала продуктивности / Кочиш И.И., Сурай П.Ф., Романов М.Н. и др., МВА им. К. И. Скрябина, 2019.

9. Методические рекомендации по использованию кормовой добавки, прошедшей испытания в промышленных условиях на высокопродуктивных промышленных курах-несушках / Кочиш И.И., Ыылдырым Е.А., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А., Тюрина Д.Г., Дубровин А.В., Филиппова В.А., Новикова Н.И., Тарлавин Н.В., Романов М.Н., МВА им. К. И. Скрябина, 2020.

10. Нарушин В.Г., Селина М.В., Романов М.Н. Анализ сопряженных изменений экспрессии генов и биохимических показателей крови в эксперименте на курах-несушках. Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных, 2019, с. 67–82.

11. Нарушин В.Г., Романов М.Н., Лаптев Г.Ю., Ыылдырым Е.А., Ильина Л.А., Филиппова В.А., Кочиш И.И. и др. Математическая оценка влияния инфекционного заражения и кормовой добавки на показатели яйценоскости у кур-несушек. Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных, 2020, с. 115–124.

12. Нарушин В.Г., Селина М.В., Романов М.Н. Разработка неразрушающих технологий и математических методов для оценки качества яиц. Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных, 2020, с. 151–164.

13. Практические рекомендации по применению кормовых добавок для улучшения продуктивности и стрессоустойчивости яичной птицы / Кочиш И.И., Романов М.Н. и др., МВА им. К. И. Скрябина, 2019.

14. Романов М.Н., Лаптев Г.Ю., Филиппова В.А., Ыылдырым Е.А., Ильина Л.А., Кочиш И.И. и др. Разработка современных биотехнологий для оценки экспрессии генов в связи с устойчивостью к болезням и продуктивностью у домашней птицы. Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных, 2019, с. 11–41.

15. Романов М.Н., Лаптев Г.Ю., Ыылдырым Е.А., Ильина Л.А., Филиппова В.А., Кочиш И.И. и др. Современные молекулярно-генетические и геномные технологии в области изучения биологии птиц. 1. Прикладные исследования. Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных, 2020, с. 13–33.

16. Романов М.Н., Кочиш И.И. и др. Исследования международной лаборатории молекулярной генетики и геномики птицы ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина. Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения, 2021, с. 179–180.

17. Сурай П.Ф., Фисинин В.И., Грозина А.А., Кочиш И.И., Никонов И.Н., Романов М.Н. От регуляции витагенов к оптимизации микробиоты: новые подходы к поддержанию здоровья кишечника птиц. Мировые и российские тренды развития птицеводства: реалии и вызовы будущего, 2018, с. 55–66.

18. Сурай П.Ф., Кочиш И.И., Фисинин В.И., Никонов И.Н., Романов М.Н. Пути поддержания оптимального редокс-баланса в кишечнике птиц: проблемы и решения. Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных, 2019, с. 42–58.

19. Сурай П.Ф., Кочиш И.И., Фисинин В.И., Никонов И.Н., Романов М.Н. Полифенольные соединения в кормлении птицы: микробиота, редокс-баланс и витагены в кишечнике. Молекулярно-генетические технологии для анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных, 2020, с. 100–114.

20. Barkova O.Y., Laptev G.Y., Kochish I.I., Romanov M.N. et al. Overview of genes associated with egg productivity and resistance of domestic hen. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, 2017, 8: 638–644.

21. Dodgson J.B., Romanov M.N. Use of chicken models for the analysis of human disease. *Curr Protoc Hum Genet*, 2004, 40: 15.5.1–15.5.11.

22. Gadyuchko O.T., Sakhatsky N.I., Tereshchenko A.V. et al. [Genetic potential of breeds and populations of geese in Ukraine]. *Ptakhivnistvo*, 2003, 53: 54–62.

23. Laptev G.Yu., Filippova V.A., Kochish I.I., Yildirim E.A., Ilina L.A., Dubrovin A.V., Brazhnik E.A., Novikova N.I., Novikova O.B., Dmitrieva M.E., Smolensky V.I., Surai P.F., Griffin D.K., Romanov M.N. Examination of the expression of immunity genes and bacterial profiles in the caecum of growing chickens infected with *Salmonella* Enteritidis and fed a phytobiotic. *Animals*, 2019, 9: 615.

24. Laptev G.Yu., Yildirim E.A., Ilina L.A., Filippova V.A., Kochish I.I., Gorfunkel E.P., Dubrovin A.V., Brazhnik E.A., Narushin V.G., Novikova N.I., Dunyashov T.P., Smolensky V.I., Surai P.F., Griffin D.K., Romanov M.N. Effects of essential oils-based supplement and *Salmonella* infection on gene expression, blood parameters, cecal microbiome and egg production in laying hens. *Animals*, 2021, 11: 360.

25. Narushin V.G., Laptev G.Yu., Yildirim E.A., Ilina L.A., Filippova V.A., Kochish I.I., Gorfunkel E.P., Dubrovin A.V., Novikova N.I., Dnyashev T.P., Smolensky V.I., Surai P.F., Bondarenko Yu.V., Griffin D.K., Romanov M.N. Modelling effects of phytobiotic administration on coherent responses to Salmonella infection in laying hens. *Ital J Anim Sci*, 2020, 19: 282–287.
26. Nikonov I.N., Il'ina L.A., Kochish I.I., Romanov M.N. et al. Changing the intestinal microbiota of chickens in ontogenesis. *Ukr J Ecol*, 2017, 7: 492–499.
27. Nikonov I.N., Kochish I.I. Ilyina L.A., Romanov M.N. et al. Microbiota in the intestines of cross chick Lohmann Brown in ontogeny. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, 2017, 8: 645–654.
28. Nikonov I., Romanov M.N., Kochish I.I. et al. Determination of microbiocoenoses in the intestine of the Hisex Brown hens in ontogenesis. *Worlds Poult Sci J*, 2018, Suppl.: 337.
29. Romanov M.N. Genetics of broodiness in poultry – a review. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2001, 14: 1647–1654.
30. Romanov M.N., Griffin D.K., Panin A.N., Kochish I.I., et al. Comparison of gut microbiota in hens of the crosses Hisex Brown and Lohmann Brown. *Insights Nutr Metab*, 2017, 1 (3): 30.
31. Romanov M.N., Laptev G.Yu., Nikonov I.N., Ilyina L.A., Novikova N.I., Barkova O.Yu., Griffin D.K., Kochish I.I., et al. Determination of microbiocoenosis in the intestine of the Hisex Brown hens in ontogenesis using T-RFLP method. *Insights Nutr Metab*, 2017, 1 (3): 39.
32. Surai P.F., Kochish I.I., Griffin D.K., Nikonov I.N., Romanov M.N. Microbiome and antioxidant system of the gut in chicken: Food for thoughts. *Insights Nutr Metab*, 2017, 1 (3): 34.
33. Surai P.F., Kochish I.I., Romanov M.N. et al. Nutritional modulation of the antioxidant capacities in poultry: the case of vitamin E. *Poult Sci*, 2019, 98: 4030–4041.

Towards advanced biotechnological developments to realize the genetic potential of egg-type poultry

Romanov M.N.,^{1,2} Kochish I.I.,¹ Sharafetdinov G.R.,¹ Myasnikova O.V.,¹ Nikonov I.N.,¹ Selina M.V.,¹ Surai P.F.^{1,4,5,6}

¹K. I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia;
²University of Kent, Canterbury, UK;
³Szent Istvan University, Gödöllo, Hungary;

⁴Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria;
⁵St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine,
St. Petersburg, Russia

Abstract

Realization of the genetic potential of laying hens makes it feasible to achieve the maximum possible yield of egg products against, while using effective feed compositions and various feed additives. Implementation of molecular genetic technologies for the analysis of intestinal microbiota and the expression of key genes for productivity and resistance is an important tool in studying mechanisms of the effects of feed preparations on microorganism of birds. Within the framework of the project for the development of modern biotechnologies to assess gene expression, we carried out an experiment to assess influence of human recombinant interferon alpha-2b on the expression of genes for productivity and immunity in laying hens. A positive effect of the additive on the immune system of birds and the effectiveness of molecular genetic technologies for assessing the expression of key genes and the use of the studied additives in feeding of egg-type poultry have been shown.

Key words: molecular genetic technologies, gene expression, RT-PCR, intestines, laying hens, interferon, immunity