

## АМИНОКИСЛОТНЫЙ ПРОФИЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ НОРОК ПРИ ПОЛИМОРФИЗМЕ ГЕНА MLPH

А. А. Глазев, С. Д. Клиса, О. А. Епишко, Е. С. Чебуранова

УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»  
г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230023,  
г. Гродно, ул. Ожешко, 22; e-mail: mail@grsu.by)

**Ключевые слова:** полиморфизм гена, норки, окраска меха, плазма крови, свободные аминокислоты, диагностика.

**Аннотация.** В данной работе исследовали аминокислотный профиль плазмы крови норок при полиморфизме гена, детерминирующего образование меланофилина (MLPH). ДНК-диагностику полиморфизма гена MLPH проводили методом ПЦР-анализа с использованием специальных праймеров. Скрининг аминокислотного профиля плазмы крови норок проводили методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с детектированием по флуоресценции. Установлено, что полиморфизм гена MLPH у исследуемых групп норок ассоциирован с маркерными изменениями в аминокислотном профиле их плазмы крови, обусловленными полом и генотипом животного и характеризующимися у самок норки с генотипом AA пониженным содержанием аргинина, лейцина и фосфоэтанолamina, а у самцов норки с аналогичным генотипом – высоким уровнем аспарагиновой кислоты и аспарагина, а также низкой концентрацией глицина, таурина и  $\beta$ -аланина ( $P < 0,05$ ) по сравнению с их содержанием в плазме крови животных соответствующего пола с генотипами GG и GA.

## AMINO ACID PROFILE OF BLOOD PLASMA OF MINKS WITH MLPH GENE POLYMORPHISM

A. A. Glazev, S. D. Klisa, O. A. Epishko, E. S. Cheburanova

EI «Yanka Kupala State University of Grodno»  
Grodno, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 230023, Grodno,  
22 Ozheshko st.; e-mail: mail@grsu.by)

**Key words:** gene polymorphism, minks, fur coloration, blood plasma, free amino acids, diagnostics

**Summary.** In this work was investigated an amino acid profile of blood plasma of minks under polymorphism of the gene determining melanophilin formation (MLPH). DNA-diagnostics of MLPH gene polymorphism was performed by PCR-analysis using special primers. Amino acid profile of blood plasma of minks was screened by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection. The polymorphism of the MLPH gene in the studied groups of minks was found to be associated with marker changes in the amino acid profile of their blood plasma, determined by sex and genotype of the animal and characterized by: in female mink with AA-genotype – reduced quantitative content of arginine, leucine and

*phosphoethanolamine, and in male mink with a similar genotype – a high level of aspartic acid and asparagine, as well as a low concentration of glycine, taurine and  $\beta$ -alanine ( $P < 0,05$ ) compared with their content in blood plasma of animals with GG- and GA-genotype.*

*(Поступила в редакцию 01.06.2023 г.)*

**Введение.** Основные хозяйственно ценные (селекционные) признаки пушных зверей (в частности, норок) – это тип волосяного покрова, густота и окраска их меха, причем последний признак является результатом высокой генетической изменчивости данной группы животных, которая в условиях их domestikации привела к возникновению множественного аллелизма генов, детерминирующих окраску меха норок [1].

Вместе с тем интенсификация разведения данного вида пушных зверей без должного (на начальном этапе) молекулярно-генетического скрининга привела к накоплению и проявлению различных мутаций, обуславливающих широкие вариации окраски их меха и соответствующее снижение товарных качеств конечного продукта (шкурки норки), реализуемого на рынке.

Одновременно, некоторые мутации генов, отвечающие за формирование окраски меха норок, оказывают плейотропный эффект, приводящий к изменению ряда физиологических процессов, например, снижению устойчивости животных к некоторым заболеваниям и их плодовитости [2], изменению ряда биохимических показателей [3] и морфофункциональных особенностей клеток [4] у мутантных форм норок.

В связи с этим возникает необходимость более детального исследования биологических эффектов полиморфизма ряда генов, детерминирующих окраску волосяного покрова норок.

**Цель работы** – исследовать изменения в аминокислотном профиле плазмы крови норок при полиморфизме гена, детерминирующего образование меланофилина (MLPH).

**Материал и методика исследований.** В качестве объекта исследований использовали плазму крови самцов и самок норки, разводимой в зверохозяйстве в д. Стриевка (Гродненский район).

Геномную ДНК для генетического анализа выделяли из ткани животных перхлоратным методом.

Реакционная смесь для проведения полимеразной реакции по гену MLPH, детерминирующего образование меланофилина, готовилась в объеме 25 мкл и включала следующие компоненты: 1х Taq-буфер – 1,6 мкл; MgCl<sub>2</sub> (25 мМ) – 0,5 мкл; смесь dNTP (25 мМ) – 2 мкл; праймеры – 0,5 мкл; Taq-полимераза – 0,5 мкл; ДНК (100-200 нг/мкл) – 0,5 мкл; вода (дистиллированная) – 18,9 мкл.

Для проведения амплификации фрагмента гена MLPН использовали следующие праймеры:

– MLPН. Exon1 fw: 5'-TGTTCAAAAAGCTCTAAAAGCCTCC-3'  
rev: 5'-GGTATTATAGAGGGGCACAGCTTGCA-3';

– MLPН. Exon2 fw: 5'-TTAGAAAAGCATTACACCCAGGTCC-3'  
rev: 5'-GCATTGATGCTTCCTGCTGTCTG-3'.

Полимеразная цепная реакция была проведена на амплификаторе C100 Touch Thermal Cycler.

Режим амплификации состоял из следующих этапов: «горячий старт» – 5 мин при температуре 94 °С; 35 циклов: денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг – 30 с при температуре 54 °С, синтез – 30 с при 72 °С; до-стройка – 5 мин при температуре 72 °С.

Концентрацию и специфичность амплификатов оценивали электрофоретическим методом в 3 % агарозном геле при напряжении 90 В в течение 90 мин. Длина амплифицированного фрагмента ДНК составляла 500 и 300 п. н.

Количественный анализ свободных аминокислот и их метаболитов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии их ортофталевых и флуоренилметилхлороформатных производных в безбелковых хлорнокислых экстрактах биологических образцов на аналитической колонке, заполненной обращенно-фазовым сорбентом Zorbax Eclipse XDB-C8, в режиме градиентного элюирования подвижной фазой на основе 0,1 М натрий-ацетатного буфера и органического модификатора ацетонитрила в объемной доле – 70 %, при скорости потока элюента – 0,2 мл/мин, температуре анализа 38 °С и детектирования по флуоресценции – 231/445 нм по методу внутреннего стандарта, в качестве которого использовали δ-аминовалериановую кислоту [5].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Изучение генетической структуры популяции норок (n = 96), разводимых в зверохозяйстве в д. Стриевка Гродненского района, выявило наличие мутантного аллеля (А) гена MLPН, частота встречаемости которого в исследуемой популяции животных составила 10,9 %, частота встречаемости генотипов АА составила 6,25 %.

Основные показатели эндогенного профиля свободных аминокислот и их метаболитов в плазме крови у обследованных групп самцов и самок норок при полиморфизме гена MLPН представлены в таблицах 1-2.

Таблица 1 – Концентрация свободных аминокислот и их метаболитов в плазме крови самок норки при полиморфизме гена MLPH

Аминокислоты и их метаболиты	Молярная концентрация, 10 <sup>-6</sup> моль/дм <sup>3</sup>		
	Генотип GG (здоровые особи)	Генотип GA (скрытые носители мутации)	Генотип AA (мутация гена MLPH)
CA	0,35 ± 0,19	0,25 ± 0,24	0,23 ± 0,12
Asp	11,51 ± 4,66	18,16 ± 1,91*	6,81 ± 2,67 <sup>Δ</sup>
Glu	161,56 ± 72,21	432,29 ± 153,99*	141,86 ± 36,43 <sup>Δ</sup>
Asn	15,38 ± 5,61	25,11 ± 4,37*	21,32 ± 10,08
Ser	197,79 ± 53,50	210,41 ± 17,10	179,61 ± 54,75
Gln	155,08 ± 84,48	42,27 ± 4,08*	151,88 ± 47,25 <sup>Δ</sup>
His	42,06 ± 18,56	34,68 ± 4,43	28,37 ± 6,62
Gly	385,09 ± 82,62	390,50 ± 62,60	321,34 ± 125,52
MHis3	9,67 ± 4,25	7,84 ± 2,54	2,09 ± 2,80* <sup>Δ</sup>
PEA	7,99 ± 3,59	7,46 ± 0,95	2,97 ± 4,70* <sup>Δ</sup>
Thr	177,40 ± 78,37	118,56 ± 16,81	148,88 ± 85,62
Ctr	9,33 ± 2,82	8,53 ± 1,49	10,03 ± 2,09
Arg	113,66 ± 34,01	114,49 ± 7,16	66,47 ± 4,45* <sup>Δ</sup>
bAla	7,67 ± 3,36	7,81 ± 1,10	4,86 ± 1,32 <sup>Δ</sup>
Ala	328,02 ± 139,90	331,18 ± 42,68	289,04 ± 127,02
Tau	268,83 ± 85,25	363,45 ± 77,48*	198,00 ± 95,48 <sup>Δ</sup>
bABA	12,86 ± 6,39	14,68 ± 3,14	6,83 ± 4,25 <sup>Δ</sup>
GABA	1,52 ± 0,84	1,23 ± 0,49	1,11 ± 0,24
Tyr	37,09 ± 10,47	39,77 ± 4,05	31,65 ± 3,92 <sup>Δ</sup>
aABA	15,42 ± 5,10	16,72 ± 3,02	14,45 ± 1,74
EA	22,37 ± 7,59	31,45 ± 5,44*	18,00 ± 9,15 <sup>Δ</sup>
Val	222,77 ± 183,24	260,21 ± 134,56	185,26 ± 169,17
Met	15,88 ± 4,26	14,40 ± 4,09	14,59 ± 2,09
Trp	56,61 ± 15,10	70,19 ± 9,51*	65,99 ± 4,56
Ile	74,81 ± 36,32	75,40 ± 10,49	66,54 ± 47,12
Phe	57,64 ± 13,50	57,00 ± 6,59	53,07 ± 6,59
Leu	121,48 ± 72,69	147,00 ± 30,00	38,07 ± 16,02* <sup>Δ</sup>
HPro	76,33 ± 72,04	47,73 ± 4,15	38,39 ± 20,47
Orn	20,74 ± 10,17	29,75 ± 4,69*	13,18 ± 5,08 <sup>Δ</sup>
Lys	44,99 ± 37,87	35,94 ± 6,42	21,18 ± 5,14 <sup>Δ</sup>
Pro	169,46 ± 51,66	156,98 ± 89,32	90,04 ± 64,88*

Примечание

1 \* – достоверно различаются значения по сравнению с соответствующей группой животных с генотипом GG ( $P < 0,05$ );

2 <sup>Δ</sup> – достоверно различаются значения по сравнению с соответствующей группой животных с генотипом GA ( $P < 0,05$ )

Таблица 2 – Концентрация свободных аминокислот и их метаболитов в плазме крови самцов норки при полиморфизме гена MLPH

Аминокислоты и их метаболиты	Молярная концентрация, 10 <sup>-6</sup> моль/дм <sup>3</sup>		
	Генотип GG (здоровые особи)	Генотип GA (скрытые носители мутации)	Генотип AA (мутация гена MLPH)
CA	0,65 ± 0,39	0,39 ± 0,29	0,93 ± 0,18
Asp	11,54 ± 3,70	11,36 ± 1,03	24,81 ± 3,84* <sup>Δ</sup>
Glu	166,49 ± 49,53	179,74 ± 63,86	206,62 ± 36,01
Asn	15,04 ± 6,17	15,88 ± 2,80	28,78 ± 2,96* <sup>Δ</sup>
Ser	223,63 ± 49,53	269,86 ± 30,78	205,54 ± 47,17
Gln	76,14 ± 45,63	36,49 ± 38,12	105,52 ± 16,36 <sup>Δ</sup>
His	11,53 ± 13,33	6,90 ± 7,08	19,88 ± 4,05 <sup>Δ</sup>
Gly	446,36 ± 98,67	509,10 ± 129,37	327,56 ± 46,34* <sup>Δ</sup>
MHis3	6,24 ± 5,58	5,91 ± 1,31	2,66 ± 0,69 <sup>Δ</sup>
PEA	7,71 ± 2,32	9,85 ± 1,74	4,65 ± 0,57* <sup>Δ</sup>
Thr	200,80 ± 52,12	272,46 ± 106,52*	150,31 ± 27,73
Ctr	3,57 ± 3,53	2,56 ± 1,99	3,28 ± 0,82
Arg	61,15 ± 56,43	52,03 ± 55,16	94,83 ± 12,09
bAla	8,81 ± 2,84	10,63 ± 3,59	4,97 ± 0,94* <sup>Δ</sup>
Ala	319,21 ± 77,47	374,98 ± 74,24	251,98 ± 40,98 <sup>Δ</sup>
Tau	365,53 ± 99,56	451,87 ± 165,35	235,26 ± 28,36* <sup>Δ</sup>
bABA	4,71 ± 2,02	2,83 ± 1,83	1,76 ± 0,29*
GABA	2,72 ± 1,40	2,50 ± 0,30	1,85 ± 0,84
Tyr	9,37 ± 13,74	8,41 ± 5,97	21,35 ± 1,74 <sup>Δ</sup>
aABA	6,74 ± 4,03	3,88 ± 3,88	24,54 ± 6,06* <sup>Δ</sup>
EA	28,11 ± 7,33	30,45 ± 9,76	23,44 ± 2,43
Val	209,50 ± 92,31	345,69 ± 143,05*	174,37 ± 55,52
Met	10,11 ± 8,91	5,25 ± 5,29	5,42 ± 2,67
Trp	47,49 ± 25,59	82,95 ± 24,10*	62,06 ± 9,00
Ile	62,49 ± 20,41	63,44 ± 16,05	75,39 ± 14,28
Phe	23,27 ± 22,17	13,15 ± 12,79	34,65 ± 2,96 <sup>Δ</sup>
Leu	67,75 ± 49,69	63,26 ± 2,14	85,48 ± 15,04 <sup>Δ</sup>
HPro	102,72 ± 51,29	165,01 ± 70,85*	68,53 ± 20,23 <sup>Δ</sup>
Orn	21,35 ± 7,22	33,16 ± 15,18*	22,17 ± 8,50
Lys	24,36 ± 9,89	22,30 ± 4,75	24,69 ± 6,03
Pro	175,20 ± 59,96	198,51 ± 34,78	238,71 ± 32,34*

Примечание

1 \* – достоверно различаются значения по сравнению с соответствующей группой животных с генотипом GG ( $P < 0,05$ );

2 <sup>Δ</sup> – достоверно различаются значения по сравнению с соответствующей группой животных с генотипом GA ( $P < 0,05$ ).

Сравнительный анализ аминокислотного профиля плазмы крови самок норки показал, что мутация в гене MLPH (генотип AA) сопровождается статистически значимыми ( $P < 0,05$ ) изменениями в содержании

аргинина (Arg), лейцина (Leu) и пролина (Pro), концентрация которых существенно снижается (более чем в 1,7 раза) по сравнению с их уровнями у животных с генотипом GG, а изменения в аминокислотном профиле плазмы крови самок норок, являющихся гетерозиготными носителями мутации в гене MLPN (генотип GA), имеют разнонаправленный характер и характеризуются значительным (более чем на 30 %) увеличением в крови уровней аспарагиновой (Asp) и глутаминовой кислот (Glu), аспарагина (Asn), орнитина (Orn), основного метаболита серосодержащих аминокислот – таурина (Tau), ароматической аминокислоты – триптофана (Trp), а также значительным снижением (более чем в 3 раза) содержания основного метаболита глутаминовой кислоты – глутамина (Gln) по сравнению с их уровнями в плазме крови животных с генотипом GG (таблица 1).

Одновременно, в сравнении с гетерозиготными животными (с генотипом GA) аминокислотный профиль плазмы крови самок норок с генотипом AA характеризуется значительными отличиями по более широкому спектру исследуемых соединений, в частности, установлено достоверное ( $P < 0,05$ ) снижение концентраций глутаминовой кислоты, аргинина, таурина, тирозина (Tyr), лейцина, орнитина и лизина (Lys), а также повышение (более чем в 3,2 раза) концентрации глутамина (таблица 1).

В плазме крови самцов норок с генотипом AA имеет место статистически значимое ( $P < 0,05$ ) увеличение (на 40 %) количественного содержания гетероциклической аминокислоты – пролина, аспарагиновой кислоты и ее основного метаболита – аспарагина (более чем на 80 %), а также снижение уровней таурина и глицина (Gly) (более чем на 50 %) по сравнению с их содержанием в крови животных с генотипом GG, а в сравнении с гетерозиготами (генотип GA) аминокислотный профиль плазмы крови самцов норки (дополнительно к ранее установленным изменениям) характеризуется увеличением концентрации аминокислот глутамина, гистидина (His), тирозина, фенилаланина (Phe) и лейцина, а также значительным снижением (более чем на 45 %) уровней аланина (Ala) и гидроксипролина (HPro) (таблица 2).

Вместе с тем носительство мутации в гене MLPN (генотип GA) сопровождается выраженными изменениями в аминокислотном профиле плазмы крови самцов норки, которые характеризуются статистически значимыми ( $P < 0,05$ ) различиями в содержании валина (Val), гидроксикаминокислоты – треонина (Thr), ароматической аминокислоты – триптофана и метаболитов – гидроксипролина и орнитина, концентрация которых в крови исследуемой группы норок увеличивалась более чем на 42 % по сравнению с генетически здоровыми животными (таблица 2).

В целом, половые различия у исследуемых животных оказывают существенное влияние на характер изменений в аминокислотном спектре их плазмы крови при полиморфизме гена MLPH. В частности, установлено, что изменения в аминокислотном профиле плазмы крови самцов норки с генотипом AA в сравнении с аминокислотным профилем плазмы крови самок норки характеризуются общей тенденцией снижения уровней цитруллина (Citr), тирозина, метионина (Met) и фенилаланина (таблицы 1-2) вне зависимости от генотипа исследуемых животных.

Однако половые различия норок обуславливают и специфические изменения в содержании исследуемого класса соединений в зависимости от генотипа животных. Так, у самцов норки с генотипом GA наблюдается увеличение (более чем в 3 раза) концентрации аспарагиновой кислоты в плазме крови по сравнению с ее уровнем в плазме крови у самок, а у самцов норки с генотипом GA уровень данной аминокислоты уже снижается (в 1,6 раза) по сравнению с ее содержанием в крови у норок противоположного пола. Аналогичная картина изменений наблюдается и при сравнительном анализе уровней лейцина в плазме крови исследуемых животных.

Сравнительный анализ содержания свободных аминокислот и их метаболитов в плазме крови норок с генотипом GG показал разнонаправленный характер изменений в их аминокислотном спектре в зависимости от пола животного, для которого присуща общая тенденция снижения в плазме крови самцов концентраций большинства достоверно изменяющихся аминокислот, за исключением уровней аминокислот с короткой углеродной цепью – серина (Ser), глицина, а также одного из продуктов метаболизма серосодержащих аминокислот – таурина, концентрации которых незначительно выше (более чем на 14 %) чем их уровни в крови генетически здоровых самок (таблицы 1-2).

**Заключение.** Таким образом, полиморфизм гена MLPH у исследуемых норок ассоциирован с маркерными изменениями в аминокислотном профиле их плазмы крови, обусловленными полом и генотипом животного и характеризующимися у самок норки с генотипом AA пониженным содержанием аргинина, лейцина и фосфоэтаноламина, а у самцов норки с аналогичным генотипом – высоким уровнем аспарагиновой кислоты и аспарагина, а также низкой концентрацией глицина, таурина и  $\beta$ -аланина ( $P < 0,05$ ) в плазме крови по сравнению с их содержанием у животных соответствующего пола с генотипами GG и GA.

Установленные изменения вероятно обусловлены метаболическим дисбалансом, развивающимся в организме исследуемых сельскохозяйственных животных на фоне наличия (носительства) мутации в гене

MLPH, который затрагивает процессы промежуточного обмена свободных аминокислот и их метаболитов в их клетках.

Выявленные метаболические особенности у исследованных групп норок являются основой для дальнейшего изучения влияния различных генетических аномалий на обменные процессы ключевых низкомолекулярных эндогенных соединений в животной клетке.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Колдаева, Е. М. Научные аспекты совершенствования хозяйственно полезных признаков пушных зверей: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.02.03 / Е. М. Колдаева. – Родники, 2005. – 48 с.
2. Алферова, О. О. Плодовитость норок разных генотипов по окрасу: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.02.01 / О. О. Алферова. – Санкт-Петербург, 2004. – 28 с.
3. Берестов, В. А. Ферменты крови пушных зверей / В. А. Берестов, Л. К. Кожевникова. – Л.: Наука, 1981. – 184 с.
4. Кижина, А. Г. Морфофункциональные особенности лейкоцитов крови и костного мозга норок: *Mustela vison* Schr.: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.03.01 / А. Г. Кижина. – Петрозаводск, 2011. – 22 с.
5. МВИ.МН 3201-2009 «Определение содержания свободных аминокислот и их производных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии» / Л. И. Нефедов, А. А. Глазев, Е. М. Дорошенко. – Гродно, ГрГУ им. Я. Купалы, 2009. – 18 с.

УДК 636.2.034.636.087.7

### ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КУР ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ ПО ГЕНУ ГОРМОНА РОСТА (GH) И ПРОЛАКТИНА (PRL)

**В. Ю. Горчаков<sup>1</sup>, А. И. Киселев<sup>2</sup>, С. В. Жогло<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> – УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,

г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by);

<sup>2</sup> – РУП «Опытная научная станция по птицеводству»

г. Заславль, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 223036,

г. Заславль, ул. Юбилейная, 2а; e-mail: onspitisa@tut.by)

**Ключевые слова:** гены, генотип, куры, гормон роста, пролактин, продуктивность.

**Аннотация.** Разработаны и адаптированы методики, позволяющие определить и изучить полиморфизм гена гормона роста и гена пролактина у кур отечественной селекции яичного направления продуктивности. Результаты исследований показали, что в линиях кур по гормону роста (GH) имеются генотипы AA – 46,43 %; AB – 32,14 %; BB – 3,57 %; CC – 10,71 %; AC – 1,43 %; а в линиях кур по гормону пролактину (PRL) встречаются генотипы CC – 52 %, CT – 34 %, TT – 14 %. Более высокими продуктивными показателями обладали куры с генотипом CC по гормону пролактина (PRL) и с генотипом AA по гормону роста (GH).