

нам право говорить об удовлетворительном результате выполненных испытаний и высоком качестве работы оператора, технической компетентности научно-исследовательской лаборатории УО «ГГАУ». Результаты участия в межлабораторном сличении под руководством провайдеров CSMBrest-PT-12/1-2015 и ГНУ «Полесский аграрно-экологический институт НАН РБ» также являются удовлетворительными (количественный показатель $|Z| \leq 2,0$).

Заключение. Таким образом, межлабораторные сличения позволяют научно-исследовательской лаборатории провести самооценку качества измерений, выполняемых при определении технической компетентности, и сравнить их с соответствующим уровнем других участников сличений. Результаты испытаний НИЛ УО «ГГАУ» по определению содержания массовой доли азота и сырого протеина соответствуют требованиям аккредитованной лаборатории в сфере проведения испытаний согласно СТБ ИСО/МЭК 17025-2007.

ЛИТЕРАТУРА

1. СТБ ИСО/МЭК 17025 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»
2. ГОСТ ISO/IEC 17043-2013 «Оценка соответствия. Основные требования к проведению проверки квалификации»
3. СТБ ISO/IEC 17011-2008 «Оценка соответствия. Требования к органам по аккредитации органов по оценке соответствия»
4. СТБ ISO 13528-2011 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.
5. Murphy R.B. // Materials research and standards. 1993. V. 4. N. 1. P. 264–267.

УДК 577.21:599.735.51:577.122.38

АМИНОКИСЛОТНЫЙ ПРОФИЛЬ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ БРАХИСПИНАЛЬНОМ СИНДРОМЕ

А. А. Глазев¹, О. А. Епишко², С. Д. Клисa¹

¹ – УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230023, г. Гродно, ул. Ожешко, 22

e-mail: mail@grsu.by)

² – УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28

e-mail: labgen@mail.ru)

Ключевые слова: генетические дефекты, крупный рогатый скот, метаболизм аминокислот, диагностика.

Аннотация. В данной работе исследовали аминокислотный профиль крупного рогатого скота в норме и при наследственном пороке позвоночника, обусловленного развитием BS-синдрома. ДНК-диагностику носительства мутации гена FANCY у сельскохозяйственных животных проводили методом ПЦР-анализа с использованием специальных праймеров. Скрининг аминокислотного профиля животных проводили методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с детектированием по флуоресценции. Сравнительный анализ содержания свободных аминокислот и их метаболитов в биологическом материале при BS-синдроме показал достоверное увеличение концентраций основных биологически активных групп свободных аминокислот более чем в 15 раз по сравнению с генетически здоровым контролем, что обусловлено влиянием мутации гена на процессы метаболизма свободных аминокислот в клетках ткани крупного рогатого скота голштинской породы.

AMINO ACID PROFILE OF CARTILAGINOUS TISSUE OF COWS AT THE BRAHYPSPINA SYNDROME

A. A. Glazev¹, O. A. Epishko², S. D. Klisa¹

¹ – EI «Yanka Kupala State University of Grodno »

(Belarus, Grodno, 230023, 22 Ozheshko st.; e-mail: mail@grsu.by)

² – EI «Grodno State Agrarian University»

(Belarus, Grodno, 230008 Tereshkova st, 28 e-mail: labgen@mail.ru)

Key words: genetic defects, cattle, metabolism of amino acids, diagnostics.

Summary. In this work was investigated an amino acid profile of tissue of the cattle of Holstein in normal and in hereditary defect of the backbone, which caused by BS-syndrome. DNA-diagnostics of a carriage of a mutation of a gene of FANCY at farm animals was carried out by the PCR-analysis with special primers. Screening of an amino acid profile of the of animals was carried out by reverse phase liquid chromatography with detecting in fluorescence. The comparative analysis of content of free amino acids and their metabolites in cartilaginous tissue of cows have shown reliable increase in concentration of the main biologically active groups of free amino acids more than by 15 times in comparison with genetically healthy control. It's caused by influence of mutations of the gene of FANCY on processes of a metabolism of free amino acids in cells of tissue of cattle of Holstein.

(Поступила в редакцию 07.06.2016 г.)

Введение. Современный период развития скотоводства в развивающихся странах характеризуется широким распространением импорта высокопродуктивных животных, интенсивным перемещением их из одной экологической зоны в другую.

Одной из самых важных проблем на данном этапе животноводства была и остаётся проблема недополучения здорового и жизнеспособного потомства.

Так, селекционная работа при создании голштинской породы привела к тому, что наряду с высокой продуктивностью быки оказались носителями наследственных заболеваний. Эти мутации распространились по всему миру, являясь «шлейфом» высокой молочной продуктивности [1, 2].

В настоящее время у крупного рогатого скота описано более 60 наследственных заболеваний, которые выявляются на уровне ДНК [3].

Одним из распространенных рецессивных генетических дефектов голштинской породы крупного рогатого скота является брахиспинальный синдром (Brahyspina syndrome), или «синдром укороченного позвоночника», причиной возникновения которого является мутация гена FANCY, вызывающая различные морфологические и функциональные аномалии, негативно влияющие на здоровье и продуктивность животного [4].

В связи с интенсивной голштинизацией молочного скота в Республике Беларусь проблема выявления скрытых носителей различных генетических мутаций стоит особо остро.

Однако на данный момент применение только генетических методов выявления данных заболеваний не дает значимого эффекта. Проблема может быть решена при совместном использовании молекулярно-генетических и биохимических скрининг-тестов, позволяющих комплексно оценить наличие характерных генетических и метаболических изменений при данном типе патологии.

Цель работы: исследовать изменения аминокислотного спектра ткани крупного рогатого скота голштинской породы при брахиспинальном синдроме.

Материал и методика исследований. Молекулярно-генетические исследования проводились на базе лаборатории ДНК-технологий Гродненского государственного аграрного университета и НИЛ биохимии биологически активных веществ Гродненского государственного университета им. Янки Купалы.

В качестве объекта исследований использовали крупный рогатый скот голштинской породы, разводимый в хозяйствах КСУП «Племенной завод «Красная звезда» и РСУП «Племенной завод «Муховец».

Геномную ДНК выделяли из ткани животных перхлоратным методом.

Реакционная смесь для проведения полимеразной реакции готовилась в объеме 24,5 мкл и включала следующие компоненты: ПЦР буфер – 2,5 мкл; $MgCl_2$ (25 mM) – 1,25 мкл; dNTP (10-12 mM) – 2 мкл; праймеры – 0,5 мкл; Taq-полимераза – 0,5 мкл; ДНК (100-200 нг/мкл) – 1 мкл; вода (дистиллированная) – 17,8 мкл.

Для проведения амплификации использовались праймеры:

– 5'-GCTCAADTAGTTASTTGCTCCACTG-3';

– 5'-ATAAATAAAATAAAGCAGGATGCTGAAA-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 – 1 мин при температуре 58 °С, синтез – 2,5 мин при 72 °С; достройка – 10 мин при температуре 72 °С.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали электрофоретическим методом в 1,5% агарозном геле (при напряжении 110 В). Генотипы идентифицировали без проведения рестрикции непосредственно по результатам амплификации [5].

Количественный анализ свободных аминокислот и их производных выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии их ортофталевых и флуоренилметилхлороформатных производных в безбелковых хлорнокислых экстрактах образцов на аналитической колонке размером 2,1·150 мм, 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 внутреннего стандарта использовали δ-аминовалериановую кислоту.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ результатов ДНК-типирования популяции крупного рогатого скота КСУП «Племенной завод «Красная звезда» (n=12) и РСУП «Племенной завод «Муховец» (n=16) на носительство мутации гена FANCY показал наличие 2-х гетерозиготных носителей мутации данного гена в популяции коров в РСУП «Племенной завод «Муховец».

Для изучения влияния мутации гена FANCY на биохимические процессы в клетке животных были проведены исследования содержания широкого спектра низкомолекулярных метаболитов – свободных аминокислот и их производных, как интегральных показателей метаболического гомеостаза клетки, отражающих изменение направленности метаболических потоков, функционирования систем транспорта и межорганного распределения, окислительно-восстановительных реакций, скорости синтеза и деградации широкого круга биологически активных соединений в животной клетке.

Определение закономерностей формирования фонда свободных аминокислот и их метаболитов проводили в образцах хрящевой ткани генетически здоровых сельскохозяйственных животных (коров) и животных-носителей мутации гена FANCY, приводящего к развитию BS-синдрома. Основные результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Содержание свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани генетически здоровых коров голштинской породы и коров с BS-синдромом

Наименование аминокислот и их метаболитов	Молярная концентрация аминокислот, мкмоль/г ткани	
	Здоровый контроль	BS-синдром
Цистеиновая кислота	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,01
Фосфосерин	0,03 ± 0,01	0,15 ± 0,02*
Аспарагиновая кислота	0,66 ± 0,26	1,66 ± 0,47*
Глутаминовая кислота	3,46 ± 1,71	34,16 ± 4,26*
Аспарагин	0,05 ± 0,06	0,48 ± 0,14*
Серин	2,50 ± 0,91	37,55 ± 4,68*
Глутамин	0,51 ± 0,31	4,81 ± 0,75*
Гистидин	0,24 ± 0,08	7,12 ± 2,07*
Глицин	1,41 ± 0,53	67,63 ± 0,69*
Фосфоэтаноламин	0,09 ± 0,05	6,34 ± 0,39*
Треонин	0,67 ± 0,26	14,64 ± 1,29*
Цитруллин	0,27 ± 0,22	8,15 ± 2,09*
Аргинин	0,58 ± 0,20	9,96 ± 0,32*
β-аланин	0,69 ± 0,49	6,37 ± 0,58*
Аланин	2,09 ± 0,82	56,75 ± 2,40*
Таурин	4,44 ± 2,69	19,10 ± 30,16*
γ-аминомасляная кислота	0,13 ± 0,05	2,43 ± 1,21*
Тирозин	0,19 ± 0,05	2,47 ± 0,05*
α-аминомасляная кислота	0,09 ± 0,08	0,42 ± 0,03*
Этаноламин	6,90 ± 2,76	13,69 ± 0,67*
Валин	0,69 ± 0,23	9,59 ± 0,31*
Метионин	0,04 ± 0,04	1,89 ± 0,06*
Цистатионин	0,22 ± 0,21	1,07 ± 0,23*
Триптофан	0,05 ± 0,02	0,35 ± 0,06*
Изолейцин	0,20 ± 0,65	3,73 ± 0,14*
Фенилаланин	0,18 ± 0,06	2,05 ± 0,37*
Лейцин	0,29 ± 0,12	8,43 ± 0,47*
Гидроксипролин	7,74 ± 0,04	1,55 ± 0,19*
Орнитин	5,13 ± 1,42	2,91 ± 0,94*
Лизин	0,47 ± 0,17	0,48 ± 0,02
Пролин	0,92 ± 0,26	2,36 ± 0,87*

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении животных с BS-синдромом и здорового контроля по *t*-критерию Стьюдента.

Сравнительный анализ содержания свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани коров с BS-синдромом показал значительные увеличения их концентрации по сравнению с генетически здоровым контролем (таблица 1).

Так, концентрация аспарагиновой кислоты, таурина, α -аминомасляной кислоты, этаноламина, цистатионина и пролина увеличилась более чем в 2 раза, фосфосерина, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина и β -аланина – более чем в 6 раз, серина, ароматических аминокислот (тирозина и фенилаланина), треонина, цитруллина, аргинина, γ -аминомасляной кислоты, аминокислот с разветвленной углеводородной цепью (валина и изолейцина), метионина и гидроксипролина – более чем в 12 раз, аланина, гистидина, глицина, фосфоэтаноламина, лейцина – более чем в 20 раз (таблица 1).

Одновременно молярная концентрация орнитина у коров с BS-синдромом снизилась почти в 2 раза, по сравнению со здоровым контролем.

Вместе с тем содержание метаболита серосодержащих аминокислот – цистеиновой кислоты и незаменимой аминокислоты лизина, не претерпело существенных изменений (таблица 1).

Параллельно с определением спектра индивидуальных аминокислот и их производных был произведён расчёт содержания основных функциональных групп аминокислот, характеризующих метаболическое состояние клеток хрящевой ткани здоровых коров и коров с генетической патологией (таблица 2).

Таблица 2 – Содержание основных функциональных групп аминокислот в хрящевой ткани генетически здоровых коров голштинской породы и коров с BS-синдромом

Наименование функциональных групп аминокислот	Молярная концентрация, мкмоль/г ткани	
	Здоровый контроль	BS-синдром
Незаменимые	2,56 ± 0,78	41,17 ± 2,57*
Заменимые	9,53 ± 2,97	182,11 ± 4,68*
Гликогенные	13,81 ± 4,21	248,61 ± 5,16*
Кетогенные	1,35 ± 38,85	17,52 ± 1,09*
Серосодержащие	4,76 ± 2,74	22,11 ± 2,86*
Ароматические	0,43 ± 0,10	4,86 ± 0,47*
Циклические	1,59 ± 0,27	14,34 ± 2,61*
Основные	2,39 ± 0,33	17,56 ± 2,24*
Кислые	4,12 ± 1,93	35,82 ± 3,84*
Протеиногенные	15,16 ± 4,50	266,13 ± 6,01*
Непротеиногенные	6,61 ± 1,88	22,92 ± 3,00*

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении животных с BS-синдромом и здорового контроля по t -критерию Стьюдента.

Сравнительный анализ содержания свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани здоровых коров, а также коров – носителей генетической патологии (брахиспинального синдрома) показал достоверное увеличение концентраций основных и специальных функциональных групп аминокислот более чем в 10 раз по сравнению с генетически здоровым контролем (таблица 2).

Следует отметить более чем 15-кратное повышение концентраций незаменимых, гликогенных и протеиногенных аминокислот в клетках хрящевой ткани животных с генетической патологией (таблица 2).

Указанные изменения, по-видимому, обусловлены значительным дисбалансом в реакциях промежуточного обмена свободных аминокислот и их физиологически активных метаболитов, поскольку у исследуемых пород сельскохозяйственных животных отсутствуют иные, гистологически и биохимически выявляемые патологии, которые могут быть причиной развития установленного метаболического дисбаланса аминокислот в клетке.

Заключение. Таким образом, сравнительный анализ содержания широкого спектра свободных аминокислот и их метаболитов в хрящевой ткани коров при брахиспинальном синдроме показал многократное увеличение их содержания по сравнению с генетически здоровым контролем.

Значимое изменение содержания исследуемых низкомолекулярных биорегуляторов в хрящевой ткани сельскохозяйственных животных, при отсутствии иных гистологически и биохимически диагностируемых соматических патологий, объясняется возможным влиянием точечной мутации гена FANCY, ответственного за развитие брахиспинального синдрома, на интенсивность и направленность метаболических процессов, протекающих в клетках хрящевой ткани крупного рогатого скота и, в первую очередь, непосредственным влиянием на процессы метаболизма аминокислот – ключевых связующих звеньев клеточного обмена веществ, определяющего физиологическую активность всего организма животного.

Выявленные метаболические особенности крупного рогатого скота голштинской породы, разводимого в Республике Беларусь, дают дополнительную информацию для изучения влияния генетических патологий на обменные процессы низкомолекулярных эндогенных соединений в клетке и могут быть использованы в программах по разработке новых алгоритмов молекулярно-генетического скрининга и оценке метаболических последствий генетических дефектов у хозяйственно ценных пород животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Complex vertebral malformation in Holstein calves / J.S. Agerholm [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 2001. – Vol. 13. – P. 283-289.
2. Effects of complex vertebral malformation on fertility in swedish holstein cattle / B. Berglund [et al.] // Acta Vet. Scand. – 2004. – Vol. 45. – P. 161-165.
3. Jones, C.J. Perosomus elumbis (vertebral agenesis and arthrogryposis) in a stillborn Holstein calf / C.J. Jones // Veterinary Pathology. – 1999. – Vol. 36, № 1. – P. 64-70.
4. Agerholm, J.S. Brachyspina syndrome in a Holstein calf / J.S. Agerholm, F. McEvoy, J. Arnbjerg // J. Vet. Diagn. Invest. – 2006. – Vol. 18, № 4. – P. 418-422.
5. Методические рекомендации по проведению ДНК-тестирования племенных животных субъектов племенного животноводства по генам, определяющим продуктивные качества / В. К. Пестис [и др.]. – Гродно : ГГАУ, 2015. – С. 17-23.

УДК 636.4.085.553:083.037

СНИЖЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ УРОВНЯ СЫРОГО ПРОТЕИНА В КОМБИКОРМАХ ДЛЯ МОЛОДНЯКА СВИНЕЙ

В. М. Голушко, В. А. Рошин, С. А. Линкевич, А. В. Голушко

РУП «Научно практический центр НАН Беларуси по животноводству»

г. Жодино, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 222160, г. Жодино, ул. Фрунзе 11

e-mail: varos66@mail.ru

***Ключевые слова:** дорацивание, незаменимые аминокислоты, откорм, переваримость питательных веществ, продуктивность, сырой протеин.*

***Аннотация:** Показана возможность снижения уровня сырого протеина в рационах молодняка свиней за счет физиологически обоснованного количества потребляемых ими незаменимых аминокислот. Обязательным условием является нормирование количества лизина на 1 МДж обменной энергии рациона при соблюдении соотношений между незаменимыми аминокислотами.*

REDUCING THE CONTENT OF LEVEL CRUDE PROTEIN IN THE COMPOUND FEEDS FOR YOUNG PIGS

V. M. Golushko, V. A. Roshchin, S. A. Linkevich, A. V. Golushko

RUE «Scientific and Practical Center of NAS

of Belarus on Animal Breeding»

Zhodino, Belarus (Republic of Belarus, 222160, Zhodino, Frunze Street 11

e-mail: varos66@mail.ru)

***Key words:** rearing, essential amino acids, fattening, nutrient digestibility, productivity, crude protein.*

***Summary.** The possibility of reducing the crude protein level in the diets of young pigs due to physiologically reasonable amount of essential amino acids they*