

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»  
Институт фундаментальной медицины и биологии  
Кафедра микробиологии


Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
ЭФФЕКТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ  
НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ КИШЕЧНОГО БАРЬЕРА У ЦЫПЛЯТ-  
БРОЙЛЕРОВ

Студент 4 курса  
группы 01-806

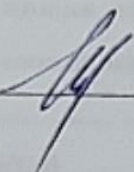
"31" мая 2022 г.



(Коваленко Д.В.)

Научный руководитель  
д.б.н., профессор

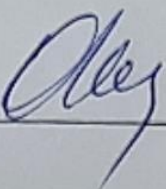
"31" мая 2022 г.



(Шарипова М.Р.)

Заведующий кафедрой  
микробиологии  
д.б.н., профессор

"31" мая 2022 г.



(Ильинская О.Н.)

Казань – 2022

# СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	5
1.1 Применение ферментов в качестве кормовых добавок в птицеводстве.....	5
1.2 Протеазы в качестве кормовых добавок в птицеводстве .....	7
1.3 Влияние пищевых добавок на основе протеаз на иммунный ответ в кишечнике птиц .....	9
1.4 Фитазы в качестве кормовых добавок в птицеводстве .....	10
1.5 Белки, участвующие в регуляции иммунитета ЖКТ бройлеров .....	13
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	17
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	17
2.1 Сбор образцов ткани подвздошной кишки цыплят.....	17
2.2 Выделение и измерение концентрации геномной ДНК.....	17
2.3 Полимеразная цепная реакция.....	18
2.4 Олигонуклеотиды .....	18
2.5 ДНК электрофорез.....	19
2.6 Выделение тотальной РНК .....	20
2.7 Обработка ДНКазой I.....	20
2.8 Синтез кДНК .....	20
2.9 Анализ экспрессии генов иммунитета .....	21
2.10 Статистическая обработка данных .....	21
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1 Подбор целевых генов иммунного ответа в тканях подвздошной кишки цыплят.....	22
3.2 Подготовка образцов для количественного определения экспрессии генов подвздошной кишки цыплят.....	24
3.3 Анализ экспрессии генов подвздошной кишки на 14 сутки роста цыплят .....	25
3.4 Анализ экспрессии генов подвздошной кишки на 35 сутки роста цыплят .....	28
ВЫВОДЫ .....	30
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	31

## ВВЕДЕНИЕ

По мировым тенденциям самой динамичной и быстроразвивающейся отраслью сельского хозяйства является птицеводство, характеризующееся высокой продуктивностью, наименьшими затратами труда и материальных средств, что привлекательно для инвестиций и разработки новых революционных технологий с целью повышения количества и качества продукции, а также удешевления кормов. Другой ключевой проблемой развития птицеводства является поиск альтернативной замены внесения в корма антибиотиков для предотвращения распространения антибиотикорезистентности. Актуальным решением всех этих проблем является разработка новых биодобавок, безопасных для животных и окружающей среды. В этом отношении большим потенциалом обладают микробные ферменты, которые можно использовать в качестве кормовых добавок и получать новые данные о роли микробных препаратов (ферментов и пробиотиков) в повышении продуктивности в птицеводстве. Среди них бактериальные ферменты, фитаза и сериновая протеиназа, представляют интерес в качестве добавок в комбикорма кур для увеличения питательных характеристик корма. В этом направлении приоритетной является задача исследования влияния биодобавок на формирование иммунного статуса птиц. Для этого в работе будет оцениваться влияние кормовых добавок на дифференциальную экспрессию генов в тканях подвздошной кишки цыплят, ответственных за развитие иммунного статуса: ген синтеза муцина Мис 2, гены цитокинов (IL-8, IL-17F, TNFSF15), барьерные кишечные гены (JAM2, occludin, ZO1) с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. Бактериальные ферменты чужеродны для бройлеров, поэтому необходимо исследовать реакцию организма на их потребление.

Целью исследования было оценить влияние микробных ферментов, используемых в качестве кормовых добавок, на иммунный статус клеток желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров. Для этого определяли уровень экспрессии генов – индикаторов иммунного статуса птиц. В качестве

генов - индикаторов использовали гены цитокинов (IL-8, IL-17F, TFNSF15), муцина (MUC2) и белков плотных щелевых контактов (JAM2 и окклюдин).

В работе решались следующие задачи:

- 1) Установить наличие генов домашнего хозяйства (ActB, HPRT1, HMBS, GAPDH), муцина (MUC2), цитокинов (IL-8, IL-17F, TFNSF15), белков плотных щелевых контактов (JAM2, Occludin) в подвздошной кишке цыплят бройлеров.
- 2) Определить иммуногенность протеазы *B. pumilus* 7P/3-19 и фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 при потреблении их в качестве пищевых добавок на 14 день.
- 3) Выявить влияние протеазы *B. pumilus* 7P/3-19 и фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1. на экспрессию генов белков плотных щелевых контактов (JAM2, Occludin) и муцина (MUC2) при потреблении их в качестве кормовых добавок на 14 день.
- 4) Определить влияние протеазы *B. pumilus* 7P/3-19 на экспрессию генов белков плотных щелевых контактов (JAM2, Occludin) и муцина (MUC2) при потреблении их в качестве кормовых добавок на 35 день.

## ВЫВОДЫ

- 1) Установлена экспрессия генов домашнего хозяйства (ActB), муцина (MUC2), белков плотных щелевых контактов (JAM2, Occludin) и цитокинов (IL-8, IL-17F, TNFSF15) в тканях желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров.
- 2) Установлено, что на 14 день потребления протеазы *B. pumilus* 7P/3-19 и фитазы *Pantoea sp.* 3.5.1 в качестве кормовых добавок к рациону цыплят-бройлеров воспаление в подвздошной кишке птиц отсутствует.
- 3) Обнаружено, что на 14 день потребления протеиназы *B. pumilus* 7P/3-19 в качестве кормовой добавки к рациону цыплят-бройлеров повышается экспрессия генов Occludin и MUC2 в подвздошной кишке бройлеров.
- 4) На 35 день потребления протеиназы *B. pumilus* 7P/3-19 в качестве кормовой добавки к рациону цыплят-бройлеров экспрессия генов плотных щелевых контактов (JAM2, Occludin) и муцина (MUC2) в подвздошной кишке цыплят оставалась на уровне контроля.