

2. Цюпко В.В. и др. Нормированное кормление крупного рогатого скота молочного и комбинированного направления продуктивности: Методические рекомендации / Институт животноводства УААН. - Х., 1995.- 75 с.

3. ARC. The Nutrient Requirements of Ruminants Livestock. – Supplement No 1C.A.B., London, 1984, 45 p.

4. National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle (7th Rev. Ed.) Washington, D.C.: National Academy Press. – 382 P.

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ ПИТАНИЯ НА ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ КОРОВ

В.В. Цюпко, В.В.Пронина, Институт животноводства УААН

На основании собственных исследований и обобщения данных мировой литературы рассмотрено влияние высокого уровня протеина в рационе на воспроизводство и продолжительность продуктивной жизни высокопродуктивных коров. Контроль адекватности протеинового питания может проводиться по уровню протеина в крови. Рекомендовано не использовать рационы с уровнем сырого протеина выше 15%.

Ключевые слова: коровы, воспроизводство, ремонтные телки, уровень кормления, протеин

INFLUENCE OF SOME NUTRITION FACTORS ON THE COW REPRODUCTION FUNCTION

V.V. Tsupko, V.V. Pronina, Institute of Animal Science of the UAAS

On the basis of own research and summarizing data in the literature all over the world, the influence of high dietary protein level on reproduction and productive life span of high-yielding cows has been studied. Nutritional protein control can be carried out according to protein level in blood. Rations with raw protein level of above 15% are not recommended to use.

Key words: cows, reproduction, replacement heifer, feedings level, protein.

УДК 636.082.45.3.5

МЕТОДЫ УСКОРЕНИЯ ОКРАШИВАНИЯ СПЕРМИЕВ КРАСИТЕЛЕМ НОЕCHST 33342 ДЛЯ X,Y–СОРТИНГА

О.А. Чернецов, В.А. Шигимага

Институт животноводства УААН

В проточном сортинге спермы метод окрашивания клеток красителем Hoechst 33342 требует сокращения во времени. Для ускорения окрашивания был использован ультразвук. Методом кондуктометрии было показано ускорение проникновения красителя Hoechst 33342 в спермии, обработанные ультразвуком интенсивностью 0,4 Вт/см² в течение 5 минут, по сравнению с неозвученными клетками.

Ключевые слова: Hoechst 33342, X,Y-сортинг, флуоресцентный проточный сортер, сперма, ДНК.

Современные проточные флуоресцентные сортеры позволяют разделять сперму с.-х. животных на X- и Y-фракции с точностью 97–98 % для последующего получения потомства определенного пола. Для окрашивания спермы

при проточном сортинге используют флуоресцентный ДНК краситель бисбензимида Hoechst 33342, по силе свечения которого детектор сортиera определяет наличие в спермии X или Y хромосомы со скоростью 15...20 млн. клеток в час [1,2]. Стандартный метод окрашивания спермы занимает 60 минут при 36 °C, что забирает у клеток значительный метаболический ресурс и является одной из причин, снижающих подвижность спермиев после сортинга. Сокращение времени окрашивания спермиев увеличит в итоге эффективность сортинга спермы. Hoechst 33342 растворим в воде, однако, имеет достаточную липофильность, чтобы проходить интактные клеточные мембраны, достигнув ДНК, Hoechst 33342 не встраивается между азотистыми основаниями как этидиум бромид, а связывается с ДНК по малой борозде селективно с А-Т нуклеотидными парами. Таким образом, времязатратные этапы окрашивания – это прохождение красителя через мембрану спермия и диффундирование по кариоплазме. Какие же современные методические подходы позволят ускорить доставку Hoechst 33342 из внеклеточной среды в кариоплазму спермия и привести к скорейшему достижению эквимольного связывания красителя с ДНК? Мы считаем, что сочетание мягкой обратимой электропорации и озвучивания клеток приведет к методу ускоренного окрашивания спермиев. В этой связи интересна работа, в которой показано, что для успешного прохождения мембраны макромолекулой важна длительность импульса – при длительности электропорирующего импульса меньше 1мс захвата клеткой ДНК (плазмид) не происходит[3]. Электропорирующие импульсы даже при напряженности 12 кВ/см, но длительностью 60 нс не делали мембрану клеток HeLa и GH3 проницаемой для пропидиума йодита (ДНК-краситель, сравнимый с Hoechst 33342), клетки долговременно увеличивали пассивную электрическую проводимость, вероятно, вызванную открытием устойчивых пор. Эти поры были проницаемы к ионам Cs^+ и катионам щелоч-

ных металлов, но не к большим молекулам. Поры постепенно вновь запечатывались; процесс занимал минуты и происходил даже в диализированных клетках в растворах без АТФ и глюкозы. Ионы La^{3+} и Gd^{3+} значительно блокировали увеличение электропроводности (вероятно, блокируя поры) [4]. В

работе [5] разработана модель нелинейного распространения пор, описывающая образование стабильных пор диаметром от 10 до сотен нанометров, способных пропускать плазмидную ДНК. Для ускорения введения красителя Hoechst 33342 будет достаточен диаметр пор в диапазоне 2...10 нм.

Биологическое действие моночастотного и стохастического ультразвука на клетки рассмотрено в работе [6], озвучивание эритроцитов стохастическим ультразвуком при интенсивности 0,3 Вт/см² нормализует активность супероксиддисмутазы при тонзиллите, а интенсивности ультразвука от 0,5 Вт/см² и выше нарушают функционирование мембранных ферментов, увеличивают проницаемость мембраны.

В предыдущих наших работах было показано, что звуковые и электромагнитные поля ускоряют процесс окрашивания спермиев красителем Hoechst 33342 [7]. В этой работе мы провели изучение влияния ультразвука на проникновение красителя Hoechst 33342 в спермии, цифровую видео и фотосъемку подвижных окрашенных Hoechst 33342 спермиев.

Материалы и методы исследований. Работа была проведена на сперме быка. Окрашивание спермы красителем Hoechst 33342 проводили по стандартной методике [7]. Озвучивание спермы проводили одновременно с внесением красителя в сперму, разбавленную до 150 млн. кл/мл в 10-мл стеклянных

флаконах на излучателе ультразвуковой установки УТП – 1 в течение 5 минут при интенсивности $0,4 \text{ Вт/см}^2$.

Для измерения уровня флуоресценции окрашенных спермиев мы провели модификацию оптического выхода микроскопа МБИ-15. В нашем распоряжении имелись: стандартная люминесцентная фотометрическая насадка к микроскопу «ЛЮОМАН» (ЛОМО, Россия) ФМЭЛ-1 с фотоумножителем ФЭУ-39-А и блоком питания УБПВ-1, аналоговая чернобелая видеокамера с ПЗС-матрицей OS-458, цветная видеокамера DV-стандарта Panasonic NV-EX21, а также микроскоп МБИ-15 (ЛОМО, Россия), со штатным оптическим выходным отверстием для присоединения фотоаппарата сверху корпуса. Было изготовлено и испытано два переходных кольца – переходника для фотометрической насадки ФМЭЛ-1 и видеокамеры соответственно. Изображение микрообъекта выводилось на экран телевизора Daewoo, который использовался в качестве монитора. После этого проводили видео запись, видео захват в память компьютера и работали с цифровым изображением. Аналогичные операции проделаны и для насадки ФМЭЛ-1 с той лишь разницей, что вместо монитора объект наблюдали в дополнительный окуляр самой насадки. Для возбуждения флуоресценции применяли светофильтр УФС6, обрезаящий светофильтр – фильтр №5 из комплекта насадки ФМЭЛ-1.

Электропроводность плазмы спермы во время окрашивания и после обработки ультразвуком измеряли методом кондуктометрии при напряженности электрического поля $2,5 \text{ кВ/см}$.

Результаты исследований. Аналоговая черно-белая видеокамера с ПЗС-матрицей OS-458 оказалась более светочувствительной, чем цветная видеокамера DV-стандарта Panasonic NV-EX21. При видеосъемке окрашенной спермы черно-белая видеокамера с ПЗС-матрицей OS-458 отображала и хвосты спермиев, что не требовалось, в то время как в цветной видеокамере DV-стандарта Panasonic NV-EX21 корректно отображались лишь светящиеся головки спермиев, что и было целью нашей разработки. Была произведена цветная видеосъемка подвижной флуоресцирующей спермы.

На рис.1 приведена фотография микроскопа МБИ-15, оснащенного нами фотометрической насадкой ФМЭЛ-1. Фотометр ФМЭЛ-1 при напряжении блока питания в 1500 В давал значительный темновой ток (напряжение на резисторе – 5 В), при этом напряжение регистрируемое при измерении флуоресценции от отдельных спермиев составляло $12...14$

Более того, как мы выяснили, светофильтр УФС6 пропускает свет в области от 690 нм до 1050 нм, о чем не указывалось в прилагаемом описании, тогда как обрезаящий фильтр №5 в насадке ФМЭЛ-1 мог пропускать свет в этой же спектральной области, что, возможно, вносило искажения в наши измерения. Для количественных измерений необходимы светофильтры, не имеющие зоны перекрывания в областях пропускания.

Методом кондуктометрии были количественно измерены концентрации Hoechst 33342, не вошедшего в спермии при окрашивании, что дало возможность сравнить динамику вхождения красителя при стандартном способе окрашивания и при обработке ультразвуком. Был построен график, описывающий с высокой степенью достоверности зависимость электропроводности плазмы спермы от концентрации красителя (рис.2). Методом кондуктометрии было показано ускорение проникновения красителя Hoechst 33342 в спермии, обработанные ультразвуком интенсивностью $0,4 \text{ Вт/см}^2$ в течение 5 минут, по сравнению с неозвученными клетками.

Рис.1. Общий вид микроскопа МБИ-15 с фотометрической насадкой ФМЭЛ-1 и блоками питания.

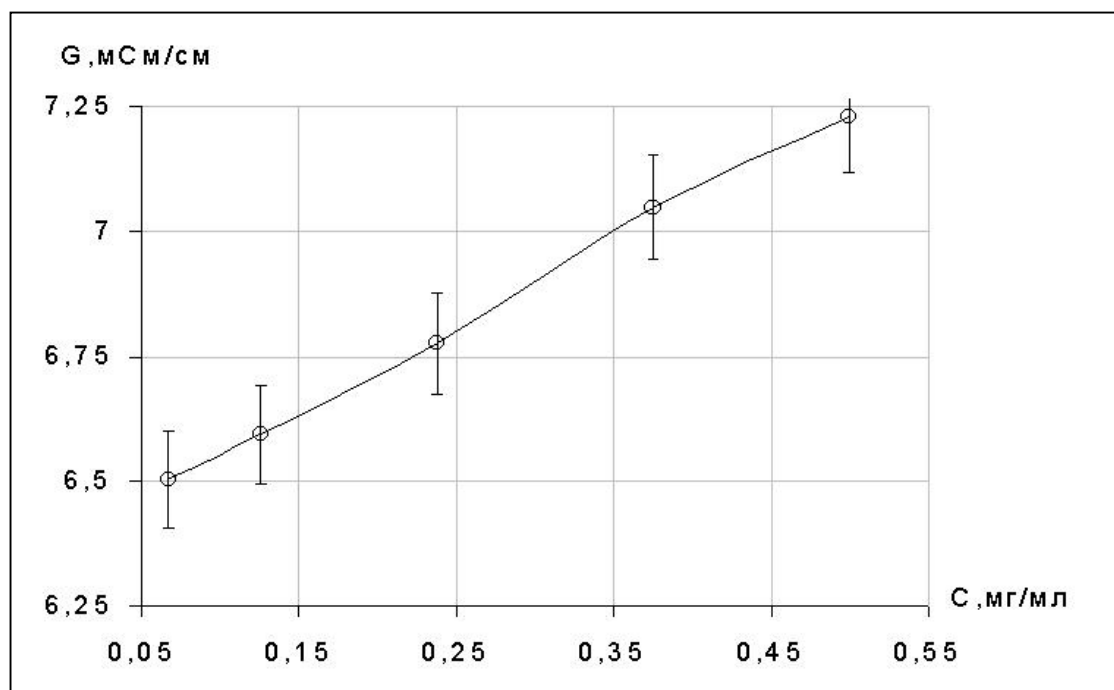
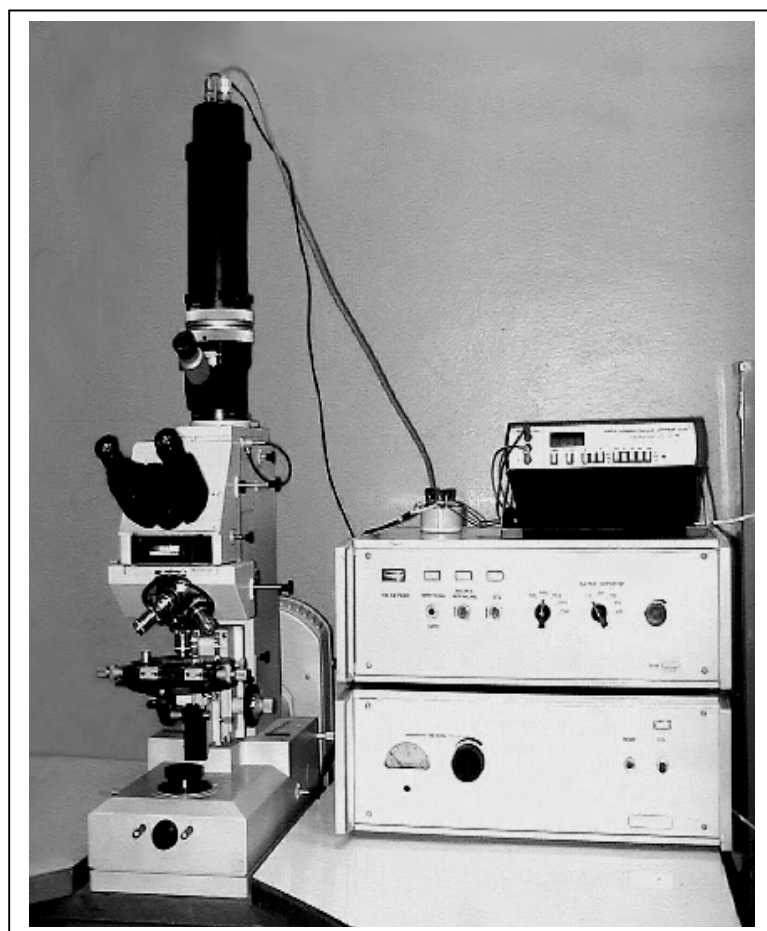


Рис.2. Зависимость проводимости плазмы спермы с несвязанным Hoechst 33342 от его концентрации.

Выводы:

1. Озвучивание спермы быка ультразвуком интенсивностью 0,4 Вт/см² в течение 5 минут ускоряет окрашивание сперматозоидов ДНК-красителем Hoechst 33342.

2. Для количественных измерений флуоресценции на микроскопе МБИ-15, оснащённом нами фотометрической насадкой ФМЭЛ-1, необходимо заменить светофильтры так, чтобы они не имели зоны перекрывания в областях пропускания.

3. Методом кондуктометрии возможно измерять концентрацию в плазме спермы красителя Hoechst 33342 во время окрашивания и после обработки ультразвуком при напряжённости электрического поля 2,5 кВ/см.

Библиографический список

1. Hamano K. Sex preselection in bovine by separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa // J. Reprod. Dev. – 2007. – V. 53. – P. 27 – 38.

2. Rath D., Ruiz S., Sieg B. Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen // Veterinary Record. – 2003. – V. 152. – P. 400 – 401.

3. Rols, M.-P., Teissie J. Electroporabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration // Biophys. J. - 1998. – V. 74. – P. 1415–1423.

4. Pakhomov A.G., Shevin R., White J.A., Kolb J.F., Pakhomova O.N., Joshi R.P., Schoenbach K.H. Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks // Archives of Biochemistry and Biophysics. - V. 465, Issue 1. – 2007. - P. 109-118.

5. Smith K.C., Neu J.C., Krassowska W. Model of Creation and Evolution of Stable Electropores for DNA Delivery // Biophysical Journal. – 2004. – V. 86. – P. 2813–2826.

6. Нурищенко Н.Є. Молекулярні та біофізичні механізми дії ультразвуку на тканини при експериментальному запаленні і хронічному тонзиліті: Автореф. дис. д-ра біол. наук: 03.00.02 / Київ. нац. ун-т ім. Т.Шевченка. — К., 2005. — 40 с.

7. Чернецов О.А., Шигимага В.А., Татарец А.Л. Методические подходы к совершенствованию окрашивания спермиев животных красителем Hoechst 33342 для X,Y-сортирования // Научно-технический бюллетень. – Х.: № 94, ИТ УААН, 2006. – С. 410 – 415.

МЕТОДИ ПРИСКОРЕННЯ ФАРБУВАННЯ СПЕРМИ БАРВНИКОМ НОЕЧСТ 33342 ДЛЯ X,Y-СОРТИНГУ

О.О. Чернецов, В.О. Шигимага, Інститут тваринництва УААН

У проточному сортируванні сперми метод фарбування клітин Hoechst 33342 потребує скорочення у часі. Для прискорення проникнення фарби був застосований ультразвук. Методом кондуктометрії було показано прискорення проникнення барвника Hoechst 33342 у спермії, оброблені ультразвуком з інтенсивністю 0,4 Вт/см² протягом 5хвилин, у порівнянні з незвученими клітинами.

Ключові слова: Hoechst 33342, X,Y-сортинг, флуоресцентний проточний сортер, сперма, ДНК

THE STAINED TECHNIQUE APPLICATION OF THE X,Y FRACTIONS IN THE COLOR SORTER BY THE HOECHST 33342 PAINT

O. Chenetzov , V. Shigimaga , the Institute of animal science, UAAS

This article highlights the experimental research results on the stained technique application of the X,Y fractions in the color sorter by the HOECHST 33342 paint. The time cutback is needed by the stained cell technique application. The X,Y sperm fractions are stained by the HOECHST 33342 paint. Ultrasound was used by paint acceleration. Bull semen was ultra sounded by 0,4 w per sm² power during 5 minutes. The labeling procedure boosts DNA sperm coloring by the HOECHST 33342 paint.

Key words: X,Y sorting, color sorter, sperm, DNA.

УДК 636.2:612.621:591.147:57.017.642

ДОБІР ТЕЛИЦЬ-РЕЦИПІЄНТІВ ЗА АЛЕРГІЧНИМ МЕТОДОМ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІЇ ЯЄЧНИКІВ

М.М.Шаран

Інститут біології тварин УААН, Львів

Наведено дані про результати вивчення алергічної реакції на введення статевих гормонів телицям. Встановлено залежність шкірної реакції з гормональним профілем крові, функціональним станом статевих органів і приживленню трансплантованих ембріонів у телиць-реципієнтів. Показано, що внутрішньошкірне введення стероїдних гормонів може бути важливим додатковим діагностичним тестом для виявлення патології яєчників у телиць із метою раціоналізації відбору потенційних реципієнтів ембріонів.

Ключові слова: телиці-реципієнти, шкірна реакція, стероїдні гормони, ембріон, трансплантація, статеві органи

Добір реципієнтів — це важливий лімітуючий фактор, який відіграє вирішальну роль у трансплантації ембріонів, недостатня ретельність у доборі є однією з головних причин низької приживлюваності [1]. Кількість реципієнтів планують, виходячи з того, що в процесі підготовки телиць до трансплантації близько 50 % їх не використовується через відсутність жовтого тіла в яєчниках [2]. За даними низки авторів приживлення ембріонів залежить від якості жовтого тіла у реципієнтів у день пересадки [3 - 4]. Якість жовтого тіла визначається, як правило, пальпацією. Однак, місце розташування жовтого тіла в яєчнику може призвести до помилкової оцінки його розмірів. Крім того, розміри жовтого тіла не завжди пов'язані з активністю цього органу.

Оскільки існує кореляція між наявністю і ростом жовтого тіла та рівнем прогестерону в крові тварин, дослідниками встановлена залежність приживлення ембріонів від концентрації гормону в крові реципієнта перед трансплантацією [5–8]. При цьому автори рекомендують відбирати телиць з рівнем прогестерону від 2 до 5 нг/мл при концентрації естрадіолу 15–25 пг/мл.

Необхідно відзначити, що майже всі вищезгадані автори у своїх дослідженнях використовували лабораторні методи визначення концентрації естрадіолу-17 β і прогестерону в біологічних рідинах, які вимагають значних витрат часу і досить складні для виконання в умовах виробництва. При