высокой интенсивностью формирования роста: у свинок II и III группы - 0,496 и 0,492, а у кабанчиков - соответственно 0,508 и 0,500. Индекс равномерности свидетельствует о более равномерном формировании свинок II (0,542) и III (0,556) групп и кабанчиков: соответственно 0,570 и 0,587.

Ключевые слова: кабанчики, свинки, живая масса, среднесуточный прирост, относительный прирост.

COMPARATIVE DYNAMICS OF GROWTH IN PIGS OF DIFFERENT GENOTYPES

Tsimbalyuk O. V., Kharkiv state zooveterinary academy

The article presents the data on the growth peculiarities of piglets and hogs of different genotypes. The advantage of hybrid piglets and hogs of Group III (Galaxy x Maxter) and Group II (Galaxy x OptiMus) by their main values of live weight formation. The above animals are characterized by their high intensity of growth: piglets of Group II and III - 0,496 and 0,492 and hogs - 0,508 and 0,500, respectively. The proportion index proves the more proportional formation of piglets in Groups II (0,542) and III (0,556) and hogs respectively: 0,570 and 0,587.

Key words: hogs, piglets, live weight, average daily weight gain, relative weight gain.

УДК 636.082.45.3.5

СЕКСИНГ СПЕРМЫ, СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И МОДИФИКАЦИИ МЕТОДА

Рецензент: д.-тор б. наук, профессор Бугров А.Д.

О.А. Чернецов
Институт животноводства НААНУ

Метод сексирования спермы в настоящее время активно совершенствуется и внедряется в коммерческое животноводство. При подготовке спермы к сортингу этап окрашивания клеток красителем Hoechst 33342 требует сокращения во времени. Для ускорения окрашивания были использованы ультразвук и ДМСО. Проведенные эксперименты на сортере MoFlo SX показали возможность использования 1,5% ДМСО и соникации спермы ультразвуком для ускоренного окрашивания спермиев при подготовке их к сексингу.

Ключевые слова: **Hoechst 33342, сексинг спермы, проточный сортер, цитометр, ДНК.**

Современный агробизнес использует сексинг спермы с/х животных методом сортинга на проточных цитофлуорометрах, с целью управления полом потомства. Метод основан на разделении спермы на две фракции, одна содержит клетки с Х-хромосомой, другая фракция – это спермии с Y-хромосомой. В коммерческих целях сперму сексируют в США, Франции, Голландии, Бразилии, Мексике, Аргентине и других странах. Украинские агрокомпании уже закупают и тестируют сексированную сперму. Биотехнологическая компания Sexing Technologies Inc. является лидером в области получения сексированной спермы, в 2008 году этой компанией и по её лицензии было продуцировано два миллиона спермодоз. Sexing Technologies владеет патентным правом на метод сексинга спермы и на современный спаренный сортер MoFlo, работающий на одном

аргоновом лазере, показан на рис. 1. В этой модели луч одного лазера расщепляется оптическим сплиттером на две установки сортинга.



Рис.1. Общий вид современного спаренного сортера MoFlo (лаборатория Sexing Technologies Inc.).

Впервые потомство от осеменения сексированной спермой было получено в конце 80-х годов сотрудниками исследовательского центра сельхозминистерства США в Белтсвилде [1]. И уже в 90-х началась адаптация этого метода в агробизнес [2]. Однако, скорость сортинга и высокая стоимость сортеров накладывают ограничения на количество спермиев в спермодозе. Сегодня экономически целесообразное количество спермиев в спермодозе составляет около 2 миллионов [3-4]. Недавние сообщения показывают, что коммерческое применение сексированной спермы в Соединенных Штатах в основном является успешным. Наибольшая прибыльность сексированной спермы достигается при осеменении телок, если получают оплодотворяемость на уровне 70–80 % по сравнению с обычной спермой [5].

В настоящее время продолжаются исследования по оптимизации количества спермиев в сексированной спермодозе [6]. Проведены научные исследования по улучшению технологии цитофлуорометрического сортинга спермиев. Спермии в процессе прохождения всех технологических этапов сексинга сталкиваются с различными неблагоприятными физическими и химическими воздействиями. Окрашивание флуоресцентным ДНК-красителем, облучение лазерным светом и прохождение сортера под давлением 3-3,5 атмосферы вносят свой вклад в повреждение клеток. Однако, если уменьшить давление, под которым прогоняются спермии в сортере MoFlo SX, с 3,40 атм. до 2,72 атм., то подвижность спермиев и целостность мембраны спермиев значительно возрастает [7].

Но, важно отметить, что ДНК повреждений в спермиях прошедших, сексирование на проточных сортерах, не обнаружено [8]. Об этом свидетельствуют и десятки тысяч телят, полученных из сексированной спермы, которые нормально без патологий развились и дали уже свое потомство. Более того, метод сексирования на проточных сортерах оказался вполне безопасным и для человеческой спермы. В 1998 году в США было проведено 208 внутриматочных осеменений женщин сексированной спермой, которые дали 22 беременности, что составило 10,6 % оплодотворяемости (при 8,6 %

оплодотворяемости донорской спермой), 15 из 17 (88,2 %) рожденных детей были нормальные девочки [9]. Это широкомасштабное использование сексированной спермы в медицинских целях было предпринято для предотвращения генетических болезней, сцепленных с Х-хромосомой.

Еще одним узким местом технологии цитофлуорометрического сортинга спермиев является минимальное количество спермиев в спермодозе. Так, одна соломинка сексированной спермы быка содержит 2 миллиона спермиев, что в десять раз меньше обычной спермодозы. В Кембридже в 1999 году были проведены исследования на лошадях по разработке методов и инструментов для глубокого внутриматочного осеменения минимальным количеством сексированной спермы, ввиду того, что спермодоза для кобыл обычно содержит 500 миллионов спермиев. Были достигнуты впечатляющие результаты: так, было получено более 70 % оплодотворяемости у кобыл на спермодозах с 5 миллионами спермиев, даже от спермодозы с 0,1 миллиона спермиев было зачатие! [10]. Подобные работы были проведены и на телках, при глубоком внутриматочном осеменении сексированной спермой с 0,2 миллиона клеток в спермодозе было получено 17 телят [11].

Целый ряд исследований было предпринято для улучшения качества сексированной спермы [12-13]. Одно из направлений научных исследований связано с сокращением времени окрашивания клеток, что сэкономит метаболический запас спермиев. В этой работе мы провели изучение влияния ультразвука на частоте 22,5 кГц и 1,5% раствора диметилсульфоксида на скорость окрашивания спермиев быка красителем Hoechst 33342. Целью исследований было сокращение времени окрашивания спермиев при подготовке их к сексингу на проточном цитофлуорометрирующем сортере.

Материалы и методы исследований. Работа была проведена на сперме быка в Краковском институте зоотехнии (Балице, Польша).

Окрашивание спермы красителем Hoechst 33342 проводили стандартно [14] с некоторыми модификациями по методу XY Inc. Готовили маточный раствор красителя – 5 мг/мл в дистиллированной воде. Сперму быка разбавляли при 35 ºС в разбавителе TALP при pH 7,40 и осмотическом давлении 300 +/-5 мОсм. На 1 мл разбавленной спермы с концентрацией клеток 200 млн/мл добавляли 15 мкл маточного раствора красителя Hoechst 33342. Затем выдерживали в термостате при 35 ºС в течение 40 минут (стандартно) или 30 минут в опыте. В опыте окрашивание проводили с 1,5 % ДМСО либо с обработкой окрашиваемой спермы ультразвуком на соникаторе Torbeo (модель 36810, частота 22,5 кГц, уровень интенсивности 1-4), зонд соникатора размещали в пробирке с водой, снаружи надевали большую пробирку с обрабатываемой спермой (рис. 2).

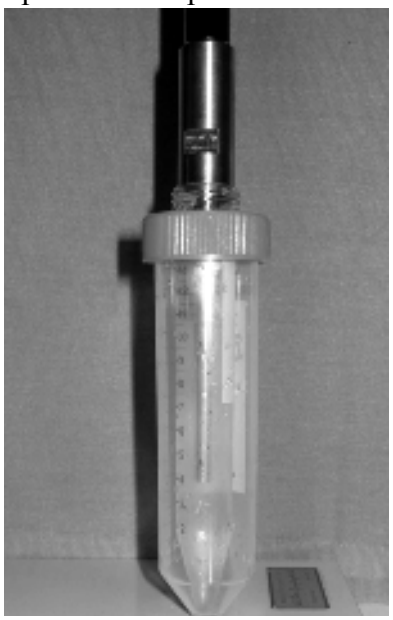

Рис.2. Зонд соникатора в пробирке с водой, сперма в наружной пробирке.

Измерение уровня флуоресцентной светимости окрашенной спермы и качества сепарации на Х-,Y-фракции проводили на проточном сортере цитофлуорометре MoFlo SX (Dako Cytomation). Степень повреждения мембран спермиев измеряли на цитометре Dako Galaxy по окрашиванию

пропидиумом йодидом и красителем SYBR-14 (LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit. Molecular Probes, Inc.). В каждом измерении анализировали 15–20 тысяч спермиев. Результаты измерений фиксировали и обрабатывали с использованием компьютерных программ Flomax (Partex) и Summit (Cytomation).

Результаты исследований. Вначале были исследованы различные варианты соникации спермы для определения безопасного уровня интенсивности ультразвука, неповреждающего сперматозоиды. В табл.1 и на рис.3 и 4 показаны результаты влияния ультразвука на частоте 22,5 кГц на мембрану сперматозоидов быка.

1.Влияние ультразвука низкой интенсивности на мембрану сперматозоидов быка

в процентах

Варианты соникации	Живые клетки	Повреждённые клетки	Мертвые клетки
Контроль	86,33	2,13	11,54
1	83,78	4,91	11,31
2	86,21	4,01	9,79
3	87,56	2,80	9,64

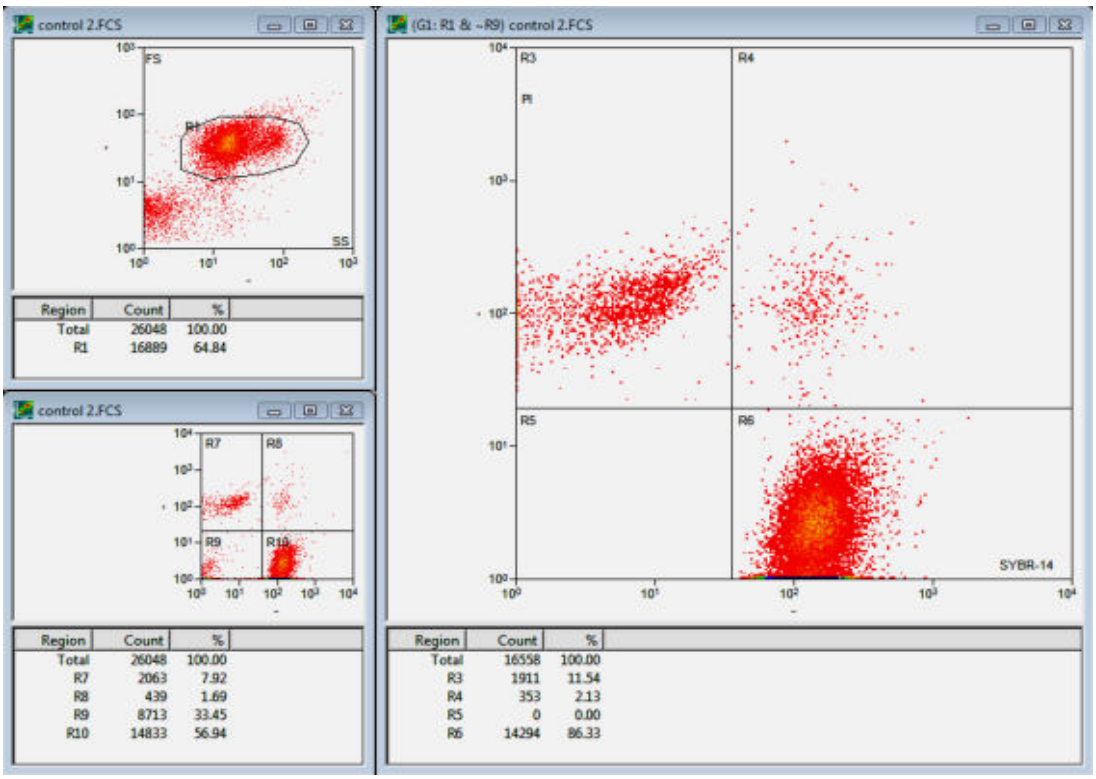

Рис. 3. Цитограмма мембран спермиев в контроле (без соникации).

Из табличных данных (см. табл.1) и цитограмм (см.рис.3 и 4) следует, что соникация в вариантах опытов 2 и 3 на уровне интенсивности 1-4 (по шкале прибора Torbeo) не оказывает повреждающего действия на мембраны сперматозоидов быка. Варианты соникации 1-3 (см. табл. 1) проведены на уровне интенсивности ультразвука 1-4 (по шкале прибора Torbeo).

Далее, используя вышеописанные безопасные для мембраны спермиев режимы соникации, было проведено окрашивание спермы. Затем эту сперму, окрашенную с соникацией и без соникации сепарировали на сортере MoFlo SX,

одновременно с обработкой ультразвуком при интенсивности 4 (по шкале прибора Torbeo).

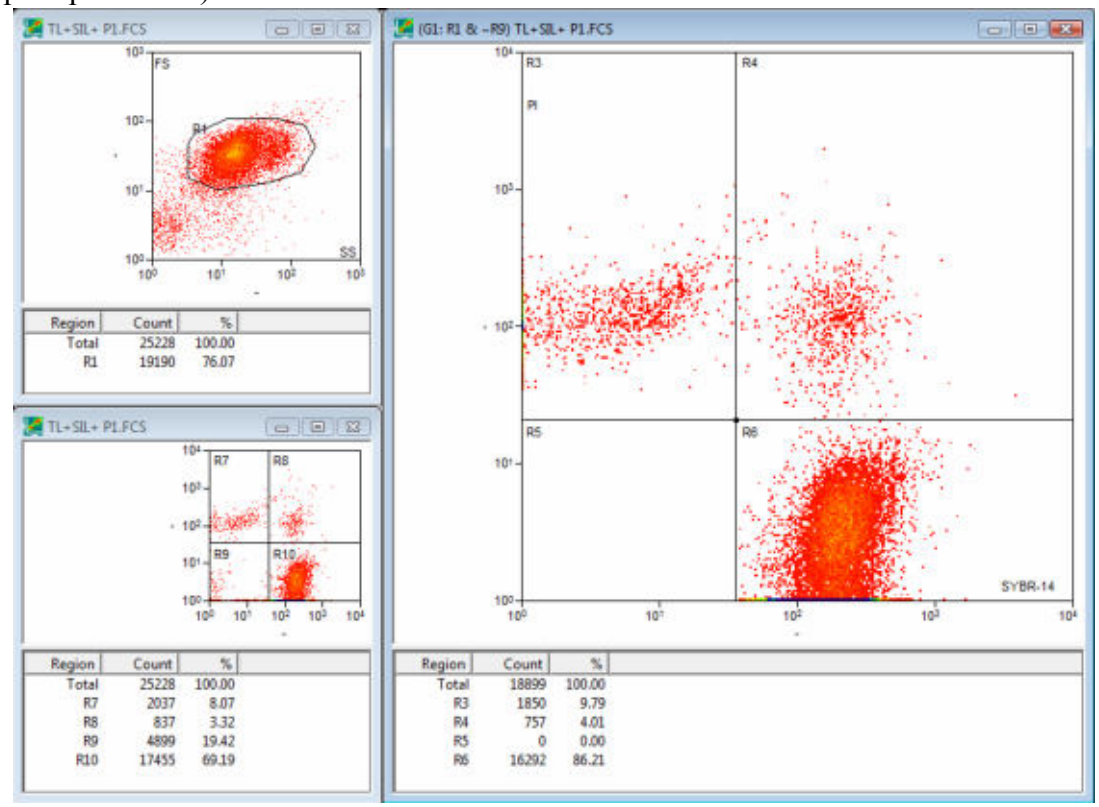

Рис.4. Цитограмма мембран спермиев после соникации (вариант 2).

На рис.5 изображена цитограмма сортинга спермы, окрашенной в течение 30 минут без соникации (контроль), а в эксперименте (рис.6) – те же условия окрашивания, но с соникацией спермы 5 раз по 30 секунд на протяжении 30 минут окрашивания. Приведенные цитограммы показывают, что сепарация спермиев на X-,Y-фракции после окрашивания клеток с их одновременной соникацией лучше, чем в контроле.

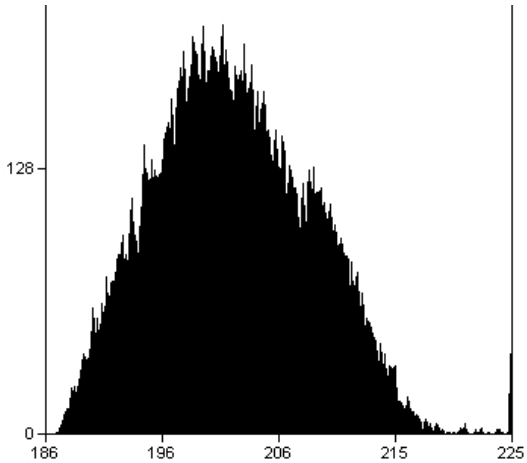

Рис.5. Сепарация спермиев на X-,Y-фракции без соникации (контроль).

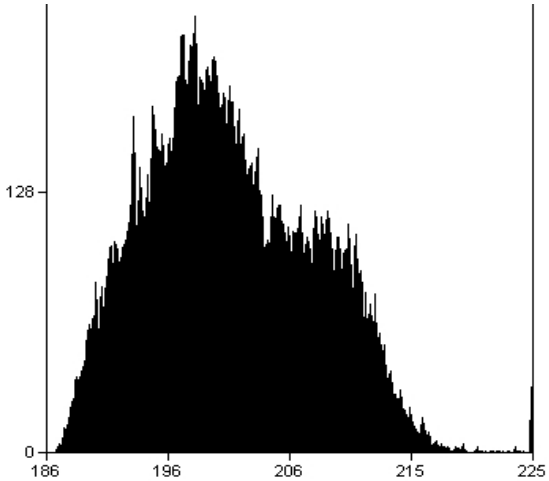

Рис.6. Сепарация спермиев на X-,Y-фракции в опыте с соникацией.

Также был проведен сортинг и получены цитограммы X,Y-сепарации спермы после окрашивания в течение 30 минут с 1,5% ДМСО в разбавителе TALP (рис.7). Контрольное окрашивание без ДМСО (цитограмма на рис.8) имело стандартную продолжительность в 40 минут.

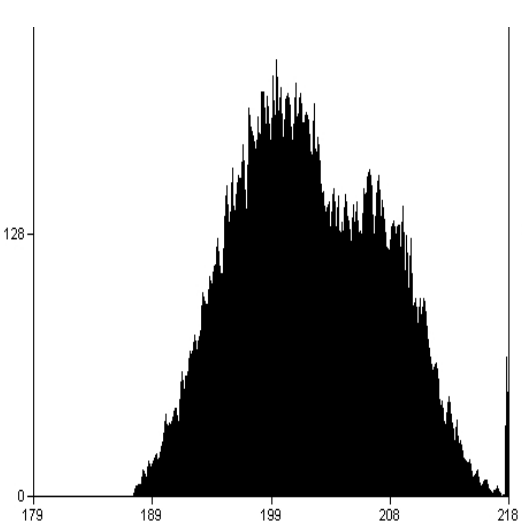

Рис.7. Сепарация спермиев, окрашенных с 1,5% ДМСО.

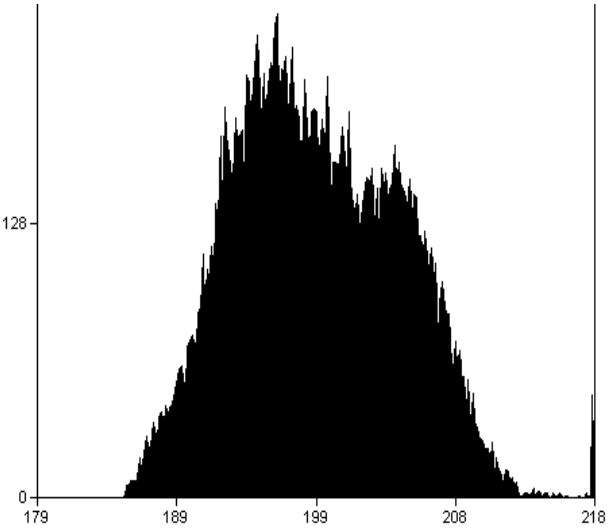

Рис.8. Сепарация спермиев, окрашенных без 1,5% ДМСО (контроль).

В эксперименте разделение на X,Y-фракции прошло лучше, чем в контроле, тогда как длительность окрашивания с ДМСО была на 10 минут меньше контрольного окрашивания. Являясь веществом со свойствами усиливать проницаемость мембран клеток для других молекул, ДМСО в описанном эксперименте ускорил проникновение в сперматозоиды ДНК-красителя Hoechst 33342, что и дало уменьшение длительности процесса достижения стехиометрического соотношения между красителем и ДНК спермиев, а именно достижение этого определённого соотношения есть условием качественной сепарации спермы на X,Y-фракции.

Далее, в процессе сортинга, среда окрашивания полностью удаляется и ДМСО практически не остается в клетках.

Таким образом, проведенные эксперименты на сортере MoFlo SX показали возможность использования 1,5% ДМСО и соникации спермы ультразвуком для ускоренного окрашивания спермиев при подготовке их к сексингу.

Выводы:

1. Соникация спермы ультразвуком на частоте 22,5 кГц при низкой интенсивности не оказывает повреждающего действия на мембрану сперматозоидов быка.
2. Окрашивание сперматозоидов ДНК-красителем Hoechst 33342 ускоряется и улучшается сепарация спермы на X-,Y-фракции при соникации спермы ультразвуком низкой интенсивности на частоте 22,5 кГц.
3. Аналогичный эффект оказывает окрашивание сперматозоидов в присутствии 1,5% ДМСО.

Библиографический список

1. Johnson L. A. Sex preselectionin rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting / Johnson L. A., Flook J. P., Hawk H. W. // Biol. Reprod. – 1989. – V. 41. – P. 199–203.

2. Seidel G.E.Jr., Insemination of heifers with sexed sperm / Seidel G.E.Jr., Schenk J. L., Herickhoff L. A., Doyle S. P., Brink Z., Green R. D., Cran D. G. // Theriogenology. – 1999. – V. 52. – P. 1407–1420.

3. Seidel G.E.Jr., Overview of sexing sperm / Seidel G.E.Jr. // Theriogenology. – 2007. – V. 68. – P. 443–446.

4. Amann R. P. Issues affecting commercialization of sexed sperm / Amann R. P. // Theriogenology. – 1999. – V. 52. – P. 1441–1457.

5. DeJarnette, J. M. Commercial application of sex-sorted semen in Holstein heifers / . DeJarnette J. M, Nebel R. L., Meek B., Wells J., Marshall C. E. // J. Dairy Sci. – 2007. – V. 90 (Suppl. 1) – P. 228. (Abstr.)

6. DeJarnette J. M. Effect of Sex-Sorted Sperm Dosage on Conception Rates in Holstein Heifers and Lactating Cows / DeJarnette J. M., Nebel R. L., Marshall C. E., Moreno J. F., McCleary C. R., Lenz R. W. // J. Dairy Sci. – 2008. – V. 91. – P. 1778–1785.

7. Suh T.K. High pressure flow cytometric sorting damages sperm / Suh T.K., Schenk J.L., Seidel G.E. // Theriogenology. – 2005. - V. 64, Issue 5. - P. 1035-1048.

8. Catt S.L. Hoechst staining and exposure to UV laser during flow cytometric sorting does not affect the frequency of detected endogenous DNA nicks in abnormal and normal human spermatozoa / Catt S.L., Sakkas D., Bizzaro D., Bianchi P.G., Maxwell W.M.C. Evans G. // Molecular Human Reproduction. – 1997. – V. 3. - N. 9. – P. 821–825.

9. Fugger E.F. Births of normal daughters after MicroSort sperm separation and intrauterine insemination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection / Fugger E.F., Black S.H., Keyvanfar K., Schulman J.D. // Human Reprod. – 1998. - V. 13. - N 9. – P. 2367-2370.

10. Morris L. H. A. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares / Morris L. H. A., Hunter R. H. F., W. R. Allen // Journal of Reproduction and Fertility. – 2000. – V. 118. – P. 95–100.

11. Seidel G.E.Jr., Uterine horn insemination of heifers with low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa / Seidel G.E.Jr., Allen C.H., Johnson L.A., Holland M.D., Brink Z., Welch G.R., Graham J.E. // Theriogenology. – 1997. – V. 48. – P. 11255-1265.

12. Rens W. A novel nozzle for more efficient spermorientation to improve sorting efficiency of X- and Y-chromosomebearing sperm / Rens W., Welch G.R., Johnson L.A. // Cytometry. – 1998. – V. 33. – P. 476–481.

13. Rens W. Improved flow cytometric sorting of X- and Y-chromosome bearing sperm: substantial increase in yield of sexed sperm / Rens W., Welch G.R., Johnson L.A. // Mol. Reprod. Dev. – 1999. – V. 52. – P. 50–56.

14. Johnson L.A. Sex preselection**:** high speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency/ Johnson L.A., Welch G.R. // Theriogenology. – 1999. – V. 52. – P. 1323-1341.

СЕКСИНГ СПЕРМИ, СУЧАСНИЙ СТАН ТА МОДИФІКАЦІЇ МЕТОДА

Чернецов О.О., ІТ НААНУ

Метод сексування сперми в даний час активно вдосконалюється і впроваджується у комерційне тваринництво. При підготовці сперми до сортингу етап фарбування клітин барвником Hoechst 33342 потребує скорочення у часі. Для прискорення фарбування були використані ультразвук та ДМСО. Проведені експерименти на сортері MoFlo SX показали можливість використання 1,5% ДМСО і сонікації сперми ультразвуком для прискореного фарбування спермііів при підготовці їх до сексингу.

Ключові слова: Hoechst 33342, сексинг сперми, проточний сортер, цитометр, ДНК .

SPERM SEXING, MODERN STATE AND THE METHOD MODIFICATION

Chernetsov O; Institute of animal science, NAASU

This article highlights the experimental research results on sperm sexing, modern state and the method modification. Nowadays sperm sexing method is being improved and implemented in commercial animal husbandry. Time needed to be reduced by semen preparation for sorting. Sorting is executed by cell painting with Hoechst 33342 dye. Ultra-sound and DMSO were used for painting boost. MoFloSX sorter was implemented for experiment. 1,5%DMSO and ultra-sound-treated sperm was used for accelerated spermatozoa painting by sexing procedure preparation.

Key words: Hoechst 33342, sperm sexing, flow sorter, cyto-meter, DNA.