



УДК 636.2.082.453.5:591.463.1

## СЕКСИНГ СПЕРМЫ БЫКА В СОЕВОМ РАЗБАВИТЕЛЕ

Рецензент: д.-тор б. наук, профессор, академик УААН Осташко Ф.И.

**О.А. Чернецов, Б.М. Павленко, В.В. Мирось**

Институт животноводства УААН

*При подготовке к сексингу спермы быка на проточном сортере MoFlo-SX, при окрашивании сперматозоидов красителем Hoechst 33342, не допускается использование желточных разбавителей спермы, так как липиды желтка препятствуют окрашиванию клеток. Было проведено окрашивание спермиев и последующий их сексинг в соевом разбавителе. Качество окрашивания и сепарация спермиев на X,Y-фракции в соевом разбавителе были одинаковыми со стандартным методом окрашивания. Полученные результаты показывают возможность использования соевого разбавителя при подготовке к сексингу спермы быка как современной альтернативы желточным разбавителям. Применение соевого разбавителя уменьшит риск микробиологического загрязнения сексированной спермы.*

**Ключевые слова: сексинг спермы, соевый разбавитель спермы, краситель Hoechst 33342, сортер MoFlo-SX, проточная цитометрия.**

Сексинг спермы с/х животных методом сортирования на проточных цитофлуорометрах, с целью управления полом потомства, используется в современном агробизнесе уже несколько лет [1-4]. Применение сексированной спермы позволило получить десятки тысяч молочных телок в США, Европе, Китае, Мексике, Аргентине и др. странах. Метод основан на разделении спермы на две фракции, одна содержит клетки с X-хромосомой, другая фракция – это спермии с Y-хромосомой. Спермии, несущие X-хромосому, например, у быка содержат ДНК на 3,8 % больше, чем Y- спермии, что позволяет получать сексированную сперму. Современные проточные сортеры позволяют разделять сперму с.-х. животных на X- и Y-фракции с точностью до 97 % для последующего получения потомства определенного пола.

Первым и очень важным этапом сексирования спермы является окрашивание спермиев витальным флуоресцентным ДНК-красителем Hoechst 33342, при этом количество красителя, связавшегося с ДНК спермия, должно быть пропорционально количеству этой ДНК. Затем по силе свечения красителя Hoechst 33342 детектор сортера определяет наличие в спермии X или Y хромосомы со скоростью 12...15 млн. клеток в час [4-5]. Стандартный метод окрашивания спермы для сексинга был разработан Л. Джонсон и др. [6]. Для прохождения мембраны живого спермия и достижения эквимольного связывания с ДНК красителю Hoechst 33342 требуется 40-60 минут при 35 °С. При этом желточные разбавители не используются, так как препятствуют окрашиванию. Желток куриных яиц из-за обилия в нём фосфолипидов и липопротеинов, модифицирует плазматическую мембрану спермиев, повышая прочность и стабильность, однако, в то же время уменьшается проницаемость мембраны для красителя. Адсорбируясь плазматическими мембранами, липоидные комплексы желтка утолщают клеточную мембрану, что усиливает устойчивость гамет к повреждающим температурным, осмотическим, иммунным и механическим факторам [7-8]. Таким образом, проведение окрашивания спермиев перед их сексингом без липопротеиновых разбавителей не согласуется с



необходимостью сразу разбавлять свежеполученную сперму для её фортификации перед последующими манипуляциями.

Вместе с тем, желток не является идеальным компонентом искусственных сред. Основным недостатком желтка является его термолабильность, что лишает возможности надёжно стерилизовать желтоксодержащие среды общедоступными способами. Доказано, что желток во многих случаях является носителем патогенной и условно-патогенной микрофлоры [9-10]. Бактерии в течение 30 минут после снесения яйца несущкой проникают через скорлупу и оболочку яйца, заражают его содержимое. Установлено проникновение через скорлупу возбудителей пуллороза, тифа, чумы, аспергиллёза, микоплазмоза, сальмонеллёза и ряда вирусных инфекций [10]. Из яиц, снесенных курами, больными туберкулёзом, птичьим гриппом или орнитозом, выделены микобактерии туберкулёза, вирус - H5N1 и возбудитель птичьего хламидиоза - *Chlamydia psittaci*. Не исключена также возможность дополнительной контаминации среды микрофлорой в условиях племенного предприятия при изготовлении её *ex tempore*.

В настоящее время при криоконсервировании спермы быков широко применяются растительные соевые разбавители, например: Biosefos, Biocell, AndroMed. Кроме того, стандартный метод окрашивания спермы красителем Hoechst 33342 и дальнейший сортинг спермы проходит в среде TALP, содержащей 0,3% BSA без фосфолипидов и липопротеинов, что по нашему мнению недостаточно для фортификации мембран. Для улучшения качества сексированной спермы предполагалось провести исследования окрашивания спермиев красителем Hoechst 33342 и сортинг спермы в соевой среде-разбавителе.

Целью настоящей работы было исследование окрашивания спермы быка красителем Hoechst 33342 в соевом разбавителе, изготовленном в лаборатории искусственного осеменения ИЖ УААН[11]. Изучалось влияние соевого разбавителя на качество окрашивания и сепарацию спермиев в процессе сексинга.

**Материалы и методы исследований.** Работа была проведена на сперме быка в Институте Зоотехнии (Балице, Польша). В контроле окрашивание спермы красителем Hoechst 33342 проводили по методу Л. Джонсон и др. [6] с изменениями согласно новому методу XY Inc. При этом концентрация маточного раствора красителя Hoechst 33342 оставалась как в работе [6], но прибавляли краситель в количестве 15 мкл на 200 млн. сперматозоидов в 1 мл раствора TALP при pH 7,45 и осмотическом давлении 300 +/-5 мОсм. Окрашивание длилось 40 минут при 35 °С. В опыте перед окрашиванием соевый разбавитель подщелачивали до pH 7,45 раствором 8М NaOH. Затем нативную сперму при 35 °С смешивали в соотношении 1:1 с нашим соевым разбавителем и далее проводили окрашивание аналогично контролю. Сперму для контроля и опыта брали из одного и того же эякулята.

Качество окрашивания спермиев оценивали по степени сепарации на X,Y-фракции на проточном флуориметрическом сортере DAKO Cytomation модель MoFlo-SX. В каждом сортинге обсчитывалось около 20 000 спермиев.

В качестве сырья для получения соевого разбавителя использовали молотые семена сои, из которых получали водные вытяжки, к которым добавляли глицерин в соответствии с нашей методикой. Осмотическое давление супернатанта измеряли криоскопическим методом, концентрацию водородных ионов на ионметре ЕВ-74 общепринятыми методами. Осмотическое давление исследуемых супернатантов компенсировали при необходимости



дополнительным внесением в них сахарозы. Стерилизацию полностью приготовленного соевого разбавителя производили методом дробной пастеризации.

**Результаты исследований.** На рис. 1 и 2 приведены цитогаммы сортирования спермы окрашенной и сексированной с соевым разбавителем и стандартно (опыт и контроль соответственно). Из цитогамм сортирования следует, что сексирование спермы в соевом разбавителе не изменяет интенсивность флуоресцентной светимости клеток и сепарация на X-, Y-фракции остаётся на одном уровне со стандартным (контрольным) сортированием. В том случае, если бы соевый разбавитель мешал окрашиванию спермиев красителем Hoechst 33342, цитогамма имела бы один

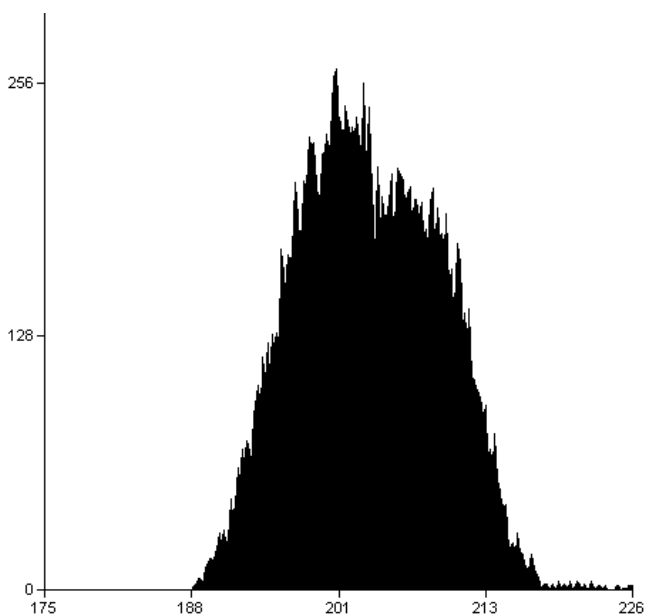


Рис. 1. Цитогамма сортирования спермиев в соевой среде (опыт).

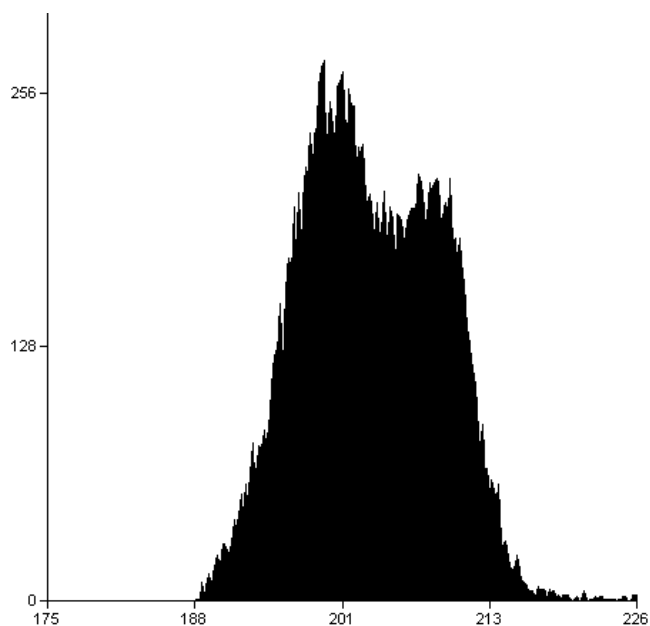


Рис. 2. Цитогамма при стандартном методе сортирования (контроль).



пик при меньшей ширине, тогда как в эксперименте ширина цитограммы (сепарация) несколько больше, чем при стандартном методе сортирования.

Данные проведенных исследований свидетельствуют о том, что с целью фортификации мембран спермиев возможно практическое использование предложенного соевого разбавителя в процессе сексинга спермы.

Мы благодарим профессора З. Сморгонга и доктора М. Бохенка из Института Зоотехнии (Балице, Польша) за предоставленное оборудование и полезные методические советы.

### **Выводы:**

1. Экстракт сои, компенсированный по осмотическому давлению сахарозой, обеспечивая спермии протекторными антишоковыми компонентами растительного происхождения, позволяет окрашивать гаметы красителем Hoechst 33342 и проводить дальнейший сексинг спермы на сортере MoFlo-SX.

2. Данная среда при подщелачивании до pH 7,45 может полностью заменить желточные среды, используемые для спермопротекции в процессе сексинга спермы быка.

### **Библиографический список**

1. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота / Ф.И. Осташко. – К.: Аграрна наука, 1995. – 183 с.
2. Seidel G.E. Sexing mammalian sperm – overview / G.E. Seidel, L.A. Johnson // *Theriogenology*. – 1999. – V. 52. – P. 1267-1272.
3. Seidel G.E. Current status of sexing mammalian spermatozoa / G.E. Seidel, Jr. Garner // *Reproduction*. – 2002. – V. 124. – P. 733–743.
4. Hamano K. Sex preselection in bovine by separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa / K. Hamano // *J. Reprod. Dev.* – 2007. – V. 53. – P. 27 – 38.
5. Rath D. Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen / D. Rath, S. Rulz, B. Sieg // *Veterinary Record*. – 2003. – V. 152. – P. 400 – 401.
6. Johnson L.A. Sex preselection: high speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency / L.A. Johnson, G.R. Welch // *Theriogenology*. – 1999. – V. 52. – P. 1323 – 1341.
7. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Осташко Ф.И. – К.: Урожай. – 1978. – 255 с.
8. Осташко Ф.И. Методика визначення антишокових властивостей захисних компонентів в розбавлювачах при дії низьких температур на спермії / Ф.И. Осташко, М.П. Павленко, Л.Н. Павленко // *Нове в методах зоотехнічних досліджень*. – Інститут тваринництва УААН. – Х. – 1992. – С.138-142.
9. Бреславец В.О. Вплив хімічної обробки у другу половину інкубації на мікробну контамінацію та виводимість яєць / В.О. Бреславец, Н.В. Шоміна, А.А. Ракова // *Ветеринарна медицина: Міжвідомчий наук. зб., №85*. – Т.1. – Харків, 2005. – С.164 – 169.
10. Загаевский И. Источники обсеменения яиц микрофлорой и их дезинфекция. / И. Загаевский // *Птицеводство*. – 1969. – №6. – С.33–34.
11. Павленко М.П. Ефективність заміни курячого жовтка рослинними антишоковими компонентами у складі кріопротективного середовища для заморожування сперми бугаїв. / Павленко М.П., Павленко Б.М. // *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини*. – Ч. 2. – Харків. – 2001. – С. 311 – 315.



#### СЕКСИНГ СПЕРМИ БУГАЯ У СОЄВОМУ РОЗРІДЖУВАЧІ

Чернецов О.А., Павленко Б.М., Мирось В.В., ІТ УААН

*При підготовці до сексингу сперми бугая на проточному сортері MoFlo-SX, при фарбуванні клітин барвником Hoechst 33342, не використовується жовтковий розріджувач сперми, бо ліпіди жовтка перешкоджають фарбуванню. Було проведено фарбування спермій і наступний їх сексинг у соєвому розріджувачі. Якість фарбування і сепарація спермій на X,Y-фракції у соєвому розріджувачі були однакові зі стандартним методом фарбування. Отримані результати вказують на можливість використання соєвого розріджувача у процесі сексингу сперми бугая як сучасної альтернативи жовткового розріджувача. Використання жовткового розріджувача зменшить ризик мікробіологічного забруднення сперми.*

*Ключові слова: сексинг сперми, соєвий розріджувач сперми, барвник Hoechst 33342, сортер MoFlo-SX, проточна цитометрія.*

#### BULL SPERM SEXING INTO SOYBEAN EXTENDER

Chernetsov O.A., Pavlenko B.M., Myros V.V.; IAS UAAS

*At preparation for sexing of bull sperm on flow sorter MoFlo-SX, at a staining of spermatozoa by dye Hoechst 33342, does not admit use of yolk sperm extenders because yolk lipids hinder staining. The sperm staining and subsequent sperm sexing in a soybean extender has been carried out. Quality of a staining and sperm separation into X, Y-fractions in a soybean extender were equal to a standard procedure of a staining. Our experimental results show possibility of using of a soybean extender in sperm preparation for sexing. A soybean extender is a modern alternative to yolk extenders. Application of a soybean extender will reduce hazard of microbiological pollution of sexing sperm.*

*Keywords: a sperm sexing, a soybean sperm extender, dye Hoechst 33342, MoFlo SX sorter, flow cytometry.*

УДК 636.3.32/.38.082.2:637.12.05

#### ДЕЯКІ ПРОБЛЕМИ ВИРОБНИЦТВА ОВЕЧОГО МОЛОКА

Рецензент: канд. с.-г. наук Ячник Р.В.

**Т.О. Черномир, О.Б. Лесник, М.В. Похивка**

Буковинський інститут АПВ, УААН

*Представлені результати досліджень по доїнню овець буковинського типу асканійської каракульської породи. Встановлено, що виробництво товарного овечого молока залежить від породи, типу, кольору овець, кількості народжених і вигодованих ними ягнят, умов господарювання. Визначені втрати молока залежно від виходу ягнят на 100 вівцематок, питомої ваги в стаді повновікових тварин, процесу доїння вівцематок та переробки молока, наявності досвідчених доярів, селекції вівцематок за молочністю і формою вимені.*

*Збільшення виробництва овечого молока й переробка його на бринзу забезпечить конкурентоспроможність галузі вівчарства.*

**Ключові слова: вівці, асканійська каракульська порода, молоко, товарне молоко, плодючість, забарвлення смушку.**

*Доїння овець та виготовлення з їх молока сирів та інших молочно кислих продуктів, має багатовікову історію. Воно поширене в багатьох країнах Європи. Навіть в Голландії і Норвегії, де в основному займаються розведенням молочної худоби, помітне зростання поголів'я молочних овець.*