

THE BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCE APPLICATION FOR THE
METABOLIC PROCESS STABILIZATION OF THE SERVICING BULLS WITH
LOW EMBRYO PRODUCTION

M.Kombarova, Yu.Fomitchev, V.Gvozd, Z. Netecha, B. Iolchev, Russian agricultural academy; G. Eskin, the Central station of artificial insemination

This article highlights the experimental research results on the multifunctional biological active substance use. The substances include double hydro-kvercetine, feed supplement 'Mival-Zoo' for systematic condition & metabolic process improvement of the servicing bulls. The medicine includes chloride-methyl- sylvatrane & succinate chytazane. Motility rate & semen adaptation proved to be better by 4% & 14% respectively in the bull groups. 12% & 18% increase was observed by chytazane administration to the bull group.

Key words: servicing bulls, multifunctional biological active substances, metabolic processes, sperm production.

УДК 575.113:636.03

**ВИЗНАЧЕННЯ СТАТІ ДОІМПЛАНТАЦІЙНИХ ЕМБРІОНІВ
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ
ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

К.В. Копилов

Інститут розведення і генетики тварин УААН

Представлені результати підбору умов та одночасного проведення ампліфікації як з X-, так і Y-послідовностями хромосом методом полімеразної ланцюгової реакції, без наступного рестриктного аналізу, для визначення статі доімплантаційних ембріонів великої рогатої худоби, що спрощує і скорочує час отримання результатів, який складає в середньому 4 години.

Ключові слова: ембріон, бластомер, велика рогата худоба, полімеразна ланцюгова реакція, ампліфікація, праймер.

Перехід до спеціалізованого тваринництва вимагає впровадження економічно доцільних, сучасних методів ведення селекційної роботи, одним із яких є визначення статі та генотипу доімплантаційних ембріонів. Цей метод дає змогу отримувати та відбирати ембріони, які мають племінну цінність та бажану стать і забезпечує можливість трансплантації декількох ембріонів одному реципієнту, виключаючи при цьому народження гетеросексуальних тварин і як наслідок фримартенізм жіночих особин.

У молочному та м'ясному скотарстві трансплантація ембріонів бажаної статі має велике економічне значення. Непотрібне поголів'я, а це половина приплоду, економічно не вигідне для товарного молочного скотарства. Інша ситуація в м'ясному скотарстві, коли необхідно отримувати навпаки велику кількість бугаїв [1].

Є декілька методів визначення статі: каріологічний аналіз; гібридизація з специфічними зразками; імуноаналіз, який базується на визначенні Y-специфічних антигенів, однак усі вони мають низку суттєвих недоліків, а саме - недостатню точність, надійність та значний час проведення аналізу.

ДНК-аналіз, який базується на застосуванні полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР), має наступні переваги: результати легко документуються і їх

інтерпретація проста і об'єктивна; цей метод має таку саму підготовку проб, що й методи дослідження поліморфних локусів; на одному матеріалі одночасно можна визначати стать і проводити дослідження за поліморфними локусами; при виявленні маркерного фрагмента Х-хромосоми при відсутності Y-фрагмента можна однозначно констатувати, що ембріон жіночої статі.

Проведення ДНК-аналізу з визначення статі доімплантаційних ембріонів почали проводитись з 90-х років минулого сторіччя. Основні завдання, які стоять при проведенні аналізу: 1 - біопсія бластомерів не повинна негативно впливати на життєздатність ембріона; 2 – зменшення строку проведення дослідження [2]. Позитивні результати ампліфікації були отримані при застосуванні гомологічних однокопійних генів ZFX та ZFY, локалізованих на Х та Y-хромосомах [3-5]. Перевага цього методу полягає в одночасній ампліфікації послідовностей як Х, так і Y-хромосом, недолік – необхідність наступного тривалого в часі рестриктивного аналізу фрагментів. Цей недолік вирішили шляхом алель-специфічної ампліфікації фрагментів генів ZFX та ZFY, використовуючи як матрицю 2-8 бластомерів великої рогатої худоби [6] та застосовуючи два внутрішні алель-специфічні 5' - праймери разом з одним реверсійним 3'-праймером і метод капілярної ПЛР [7].

З метою розробки та впровадження швидкого методу визначення статі доімплантаційних ембріонів та їх одночасного генотипування за генами продуктивності нами розпочаті дослідження з одночасним застосуванням Y-специфічних та Х-специфічних праймерів методом ПЛР, без наступного рестриктивного аналізу фрагментів, що скорочує процедуру і спрощує інтерпретацію отриманих результатів.

Матеріали і методи досліджень. Для відпрацювання методу визначення статі доімплантаційних ембріонів великої рогатої худоби та проведення ДНК-аналізу було використано 10 штук 8-16-клітинних ембріонів, одержаних *in vitro*. З метою перевірки відповідності отриманих результатів, як контроль були зразки ДНК тварин з відомою статтю (20 голів бугаїв та 20 голів корів).

ДНК ембріонів отримували шляхом перенесення їх в 0,5мл ПЛР-пробірки типу "Eppendorf" з 3-5 мкл деіонізованої води (Sigma). Зразки заморожували-розморозували 2-3 рази при -20°C для звільнення ДНК із бластомерів.

ДНК з периферійної крові великої рогатої худоби виділяли за допомогою системи «Сорб - А» та за наступною методикою. Кров для досліджень брали з яремної вени тварин у пробірки з цитратом натрію. До 200 мкл цільної крові додавали 1 мл деіонізованої води і піддавали зразок заморожуванню-розморозуванню. Центрифугували протягом 5 хв при 7 тис. об/хв для осадження лейкоцитів. Повторювали процедуру до появи безбарвного осаду з додаванням 500 мкл розчину, що містить 25 мМ ЕДТА, рН 8,0 і 75 мМ NaCl. Зразок інкубували 120 хв при $t +56^{\circ}\text{C}$. Для очищення ДНК від наявних у ній протеїнів і жирів суміш екстрагували в 500 мкл хлороформу і знову інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Після центрифугування (5 хв при 14 тис.об/хв) протеїни і жири осаджувалися в нижній фракції з хлороформом, а ДНК залишалася у верхній водяній фазі. В ДНК-розчин додавали такий же об'єм ізопропілового спирту. Зразок витримували від 30 до 180 хв, при $t -20^{\circ}\text{C}$, і центрифугували 15 хв при 14 тис. об/хв. Після видалення рідкої фази ДНК-осад промивали 70 % розчином етанолу і очищену фракцію ДНК висушували при кімнатній температурі, а потім розчиняли в 50 мкл деіонізованої води. Концентрацію ДНК перевіряли за допомогою методу електрофорезу у 2 %-му агарозному гелі.

Для тестування продуктів ампліфікації використовували 2 %-ні агарозні гелі з наступним їх фарбуванням у розчині бромистого етидію. Візуалізацію здійснювали на транслюмінаторі в ультрофіолетовому світлі з наступним фотографуванням електрофореграм цифровою камерою. Диференціацію ампліконів за розмірами проводили за допомогою маркера молекулярної ваги DNA-Ladder 50bp ("Fermentas").

Результати досліджень. Із метою відпрацювання умов кращого перебігу ампліфікації були підібрані оптимальні температурні та часові режими проведення ПЛР, а також склад реакційної суміші.

Склад реакційної суміші був наступний:

10-х ПЛР-буфер (100 мМ Tris HCL, pH- 8,8; 500 мМ KCl; 0,8 % Nonidet P40);

25мМ MgCL₂ – 1,5мМ;

2мМ dNTP – 0,5 мМ кожного;

Tag – полімераза (1,25U/50мкл);

ДНК 50-100 нг/25 мкл, суміш доводили до загального об'єму 25 мкл деіонізованою водою.

Для ампліфікації використовували дві пари праймерів: одна – специфічна для Y-хромосоми великої рогатої худоби, яка була підібрана відповідно до Patent Cooperation Treaty No/WO 89/07154 [8], друга – видоспецифічна для великої рогатої худоби [9].

Умови ампліфікації: температура відпалу виявилася універсальною для перелічених праймерів і складала 65 °С.

Синтез фрагментів ДНК проходив за 35 циклів ампліфікації на термоциклері „Терцик” (“ДНК – технологія”, Москва):

- початкової денатурації – при 94 °С, 5 хв;
- відпал праймерів – 65 °С, 45 с;
- синтез - 72 °С, 45 с;
- денатурація – 94 °С, 30 с;
- реакцію завершували етапом елонгації – 72 °С, 5 хв.

Підібрані нами умови були перевірені на ДНК тварин відомої статі і наші результати співпали.

Довжина специфічного для Y-хромосоми продукту ампліфікації у тварин великої рогатої худоби складала 173 п.н., а довжина X-специфічного фрагменту 216 п.н. У корів спостерігався один амплікон розміром 216 п.н., а у бугаїв - два фрагменти розміром 173 п.н. та 216 п.н.

Наступним етапом нашої роботи було застосування методу на доїмплантаційних 8-16 клітинних ембріонах великої рогатої худоби. У результаті проведення ДНК-аналізу щодо відпрацювання методу визначення статі доїмплантаційних ембріонів нами були отримані такі результати: з 10 досліджених ембріонів 8 мали по одному фрагменту розміром 216 п.н., що вказує на їх жіночу стать і 3 ембріони мали по 2 фрагменти розміром в 216 п.н. і 173 п.н., тобто чоловічої статі.

Висновок. Застосований нами метод дає можливість одночасно проводити ампліфікацію як X, так і Y – послідовностей хромосом без наступного рестриктного аналізу, що скорочує час отримання результатів, який складає в середньому 4 години.

Бібліографічний список

1. Костомахин Н. Нам бы такие технологии //Животноводство России.- 2004.-С.12-13.
2. Machaty Z., Paldi A., Csaki T., et al. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos //Reproduction and Fertility.- 1993.- №. 98 . – P.467-470.
3. Aasen E., Medrano J. //BIO/Technology.-1990.-V.8.-P.1279-1281.
4. Pollivick G., Giambiagi S., Mancardi S. et al. //BIO/Technology.-1992.-V.10.-P.805-807.
5. Horvat S., Medrano J., Behboodi E. et al. //Transgenic Research.-1993.-V.2.-P.134-140.
6. Kirkpatrick B., Monson E. et al. //Cell.-1987.- V.51.-P.1091-1104.
7. Зиновьева Н., Брем Г. Определение пола предимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота путем аллель-специфической амплификации генов ZFX и ZFY // Биотехнология.- 1995.- №1-2.- С.50-53.
8. Reed K.C., Matthaei K.I., Mann D.A., Mattheews M.A. Determination of genetic sex in ruminants using Y-chromosome specific polynucleotides.-1989.-Patent Cooperation Treaty No/WO 89/07154.
9. Plucienniczak A, Skowronski J, Jaworski J. Nucleotide sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences // Mol.Biol.-1982.-№158.-P.293-304.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА ДОИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

К.В. Копылов, Институт разведения и генетики животных УААН

Представлены результаты по подбору условий и одновременной амплификации как X- , так и Y-последовательностей хромосом методом полимеразной цепной реакции, без последующего рестриктивного анализа, для определения пола доимплантационных эмбрионов крупного рогатого скота, что упрощает и сокращает время проведения исследования до 4 часов.

Ключевые слова: эмбрион, бластомер, крупный рогатый скот, полимеразная цепная реакция, амплификация, праймер.

NON-IMPLANTED EMBRYO SEX IDENTIFICATION OF CATTLE BY POLYMERASE CHAIN REACTION

K.Kopylov, the Institute of breeding & genetics of the animals, UAAS

This article highlights the experimental research results on conditioning & simultaneous X- & Y-fractions amplification to identify cattle embryo sex by polymerase chain reaction without subsequent restriction analysis. The cattle embryos are non-implanted. The procedure is proposed for implementation to facilitate test data calculation. The procedure lasts 4 hours.

Key words: embryo, blastometer, cattle, polymerase chain reaction, amplification, primer.