

СЕКСИРОВАНИЕ СПЕРМЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ Sexing the sperm of farm animals

М. Х. Газдиева, студент

Р. Н. Шамилов, студент

И. В. Рогозинникова, кандидат биологических наук

Уральский государственный аграрный университет

(Екатеринбург, ул. Карла Либкнехта, 42)

Рецензент: О. В. Чепуштанова, кандидат биологических наук

Аннотация

При сексировании спермы используется метод проточной цитометрии – это технология, которая позволяет анализировать и сортировать клетки на основе их физических характеристик. Для разделения спермы по полу проточная цитометрия использует флуоресцентный краситель, который связывается с ДНК. Хромосома X у млекопитающих содержит гораздо больше генетической информации по сравнению с Y-хромосомой. В результате, при прохождении сперматозоидов через лазерный луч, флуоресцентный краситель активируется, излучая свет. Интенсивность этого света пропорциональна количеству ДНК в клетке. Более интенсивный сигнал флуоресценции указывает на наличие более крупной X-хромосомы, в то время как более слабый сигнал соответствует более компактной Y-хромосоме. Мощные световые детекторы могут обнаруживать эти различия в интенсивности флуоресценции, с помощью чего и происходит сортировка сперматозоидов в соответствии с их полом.

Ключевые слова: сексирование спермы, высокоскоростная проточная цитометрия, фоточитометрический анализ спермы, сортировка половых клеток, разделение спермы по полу.

Summary

Sperm sexing uses flow cytometry, a technology that allows cells to be analyzed and sorted based on their physical characteristics. To separate sperm by sex, flow cytometry uses a fluorescent dye that binds to DNA. The mammalian X chromosome contains much more genetic information than the Y chromosome. As a result, when sperm pass through a laser beam, the fluorescent dye is activated by emitting light. The intensity of this light is proportional to the amount of DNA in the cell. A more intense fluorescence signal indicates the presence of a larger X chromosome, while a weaker signal corresponds to a more compact Y chromosome. Powerful light detectors can detect these differences in fluorescence intensity, which is how sperm are sorted according to their gender.

Keywords: sperm sexing, high-speed flow cytometry, photocytometric analysis of sperm, sorting of germ cells, separation of sperm by sex.

В настоящее время, во многих странах, сельское хозяйство пользуется передовыми методами биотехнологии для оптимизации процесса разведения сельскохозяйственных животных. Эти технологии включают в себя применение различных научных методов, которые позволяют раскрыть генетический потенциал животных, увеличить их продуктивность, повысить устойчивость к болезням и т.д. Поэтому биотехнология играет огромную роль в современном сельском хозяйстве, особенно в воспроизводстве сельскохозяйственных животных.

В биотехнологии существуют множество способов воспроизводства животных (трансплантация эмбрионов, клонирование, создание трансгенных животных, получение химер,

эмбриональный сплиттинг и т.д.), самым простым и основным из них является искусственное осеменение. Данный метод достаточно давно используется в практике животноводства и является очень популярным. Но, к сожалению, при данном методе невозможно контролировать пол будущего потомства [5, с. 524].

Регулирование пола у сельскохозяйственных животных имеет большое практическое значение, так как способствует улучшению селекционной работы. В сельском хозяйстве стратегии разведения скота различаются в зависимости от целей производства. Так, в производстве мяса выгодно инвестировать в выращивание и откорм бычков, призванных пополнить запасы мяса, в то время как молочное скотоводство предпочитает стратегию выбора и разведения племенных телочек для поддержания и увеличения молочного потенциала стада [3, с. 185]. Поэтому выход потомства желаемого пола является очень важным фактором в повышении общей продуктивности стада. Одним из ключевых аспектов биотехнологии в этой области является сексирование спермы, технология, которая позволяет контролировать пол потомства, что, соответственно, повышает эффективность и производительность стада.

Сексирование спермы – это процесс отделения сперматозоидов, несущих либо Y-хромосому (мужской пол), либо X-хромосому (женский пол). Современная наука и технологии неустанно развиваются, применяя новейшие методы и техники для решения различных задач. В настоящее время метод проточной цитометрии активно применяется в сфере разделении спермы по половой принадлежности. Этот метод базируется на различиях в содержании ДНК между хромосомами X и Y. Уже с 1979 года установлено, что у млекопитающих содержание ДНК в хромосоме X превышает содержание ДНК в Y-хромосоме примерно на 4%. Например, у быков разница составляет 3,8%, у хряков – 3,6%, у баранов – 4,2%, а у жеребцов – 3,7% [2, с. 202]. Для реализации данного метода используются специализированные красители для ДНК, а также высокоточные аналитические системы проточной цитометрии. Важным этапом процесса является также использование специализированных устройств для ориентации сперматозоидов в потоке, что значительно повышает точность выявления различий в световом излучении.

В последние годы XX века американские ученые проделали значительную работу по совершенствованию аналитической проточно-цитометрической системы, разработав и внедрив Белтсвилльскую методику разделения сперматозоидов. Эта методика включает в себя ряд этапов и тщательно продуманных процедур, что позволяет значительно повысить эффективность сортировки спермы по половой принадлежности (рисунок 1).

В начале процесса сперму значительно разбавляют и вводят специальный флуоресцентный витальный краситель для ДНК. Последующая инкубация при контролируемой температуре в диапазоне 30-35 °С на протяжении часа гарантирует эффективное проникновение красителя через мембранные структуры сперматозоидов.

На следующем этапе сперма направляется через высокоскоростной проточный цитометр. Благодаря градиенту давления между анализируемым образцом и окружающей жидкостью сперматозоиды выстраиваются в линейную цепочку, образуя ламинарный поток. По мере прохождения каждой клетки через сфокусированный лазерный луч происходит активация флуоресценции красителя, а также рассеянное излучение в прямом и боковом направлениях. Эти сигналы регистрируются высокочувствительными световыми детекторами. Полученные данные подвергаются компьютерной обработке, в ходе которой происходит идентификация каждой клетки, несущей либо X-, либо Y-хромосому.

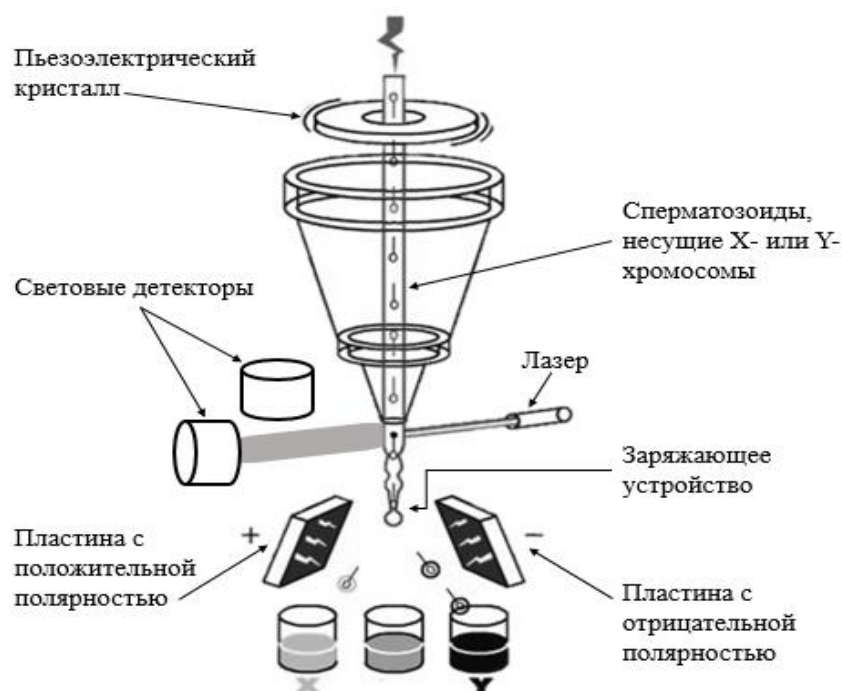


Рис. 1. Схема сексирования спермы животных

При проведении процедуры сортировки половых клеток применяется специальное устройство, которое использует инновационный механизм вибрации для формирования мельчайших микрокапель в растворе [2, с. 202]. Каждая из этих капель содержит ровно одну половую клетку. Далее происходит направление этих микрокапель в заряжающее устройство, где они приобретают электрический заряд, положительный или отрицательный, в зависимости от наличия в клетке хромосомы X или Y. Важно отметить, что микрокапли, содержащие неопределенные половые клетки или клетки крови и кожных покровов животного не заряжаются, тем самым оставаясь нейтральными в процессе сортировки.

Далее заряженные и нейтральные микрокапли направляются в различные пробирки-коллекторы, проходя через электростатическое поле биметаллических пластин с разной полярностью (так называемый электростатический сепаратор). Под воздействием электростатического поля капли с определенным зарядом отклоняются вправо или влево, попадая в соответствующие коллекторные пробирки. Незаряженные микрокапли, содержащие неопределенные клетки, не изменяют траекторию своего движения и попадают в среднюю емкость для отходов.

После разделения сперматозоиды проходят процедуру промывания и центрифугирования для концентрации. Затем они разбавляются специальной средой, состав которой варьируется в зависимости от срока и способа хранения [1, с. 146]. Этот процесс позволяет получить высококачественный материал для последующего использования в процедурах искусственного оплодотворения или криоконсервации.

В начальной стадии применения описанной технологии использовалась обычная система с давлением около $0,84 \text{ кг/см}^2$, обеспечивая разделение спермы на скорости до 350 тысяч сперматозоидов в час. Однако увеличение давления в системе до $4,22 \text{ кг/см}^2$ существенно улучшило эффективность сортировки сперматозоидов, давая возможность обрабатывать значительно больший объем клеток в более короткие промежутки времени, достигая приблизительно 10-11 миллионов в час. Для того чтобы получить одну дозу сексированной спермы от быка-производителя требуется две эякуляции. Это обусловлено ограничениями, связанными

с процессом разделения сперматозоидов при проточной цитометрии, который не гарантирует достаточного объема семени для проведения искусственного оплодотворения. После этапа разделения спермы на X- и Y-фракции, их суммарное соотношение составляет примерно 36% от общего объема эякулята. Кроме того, чистота каждой из фракций достигает примерно 90%.

Для оценки эффективности разделения спермы на X- и Y-фракции применяют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и метод флуоресцентной гибридизации. Эти методы играют ключевую роль в подтверждении точности и эффективности процесса сортировки сперматозоидов. ПЦР дает возможность обнаружить специфические последовательности ДНК, присутствующие X- или Y-хромосоме, что позволяет оценить степень чистоты разделения фракций. Флуоресцентная гибридизация также используется для визуализации X- и Y-хромосом в сперматозоидах, что позволяет определить процентное соотношение этих хромосом в разделенных фракциях.

Жизнеспособность и оплодотворяющая эффективность сексированной спермы меньше примерно на 20% по сравнению с обычной. Это связано с тем, что при прохождении через высокоскоростной проточный цитометр, оснащенный системой для электростатической сортировки, на сперму оказывает влияние ряд неблагоприятных факторов (сильное разбавление, окрашивание, перепады давления, лазерное излучение, электромагнитное поле, центрифугирование). Успех работы с сексированной спермой требует тщательного планирования и подготовки как животного, так и самой спермы [4, с. 68]. Правильный выбор коров и телок для осеменения, а также правильное обращение с сексированной спермой являются ключевыми моментами для получения здорового потомства и успешного развития стада.

Библиографический список

1. Акушерство, гинекология и биотехника репродукции животных [Электронный ресурс]: учебник для вузов / А. П. Студенцов, В. С. Шипилов, В. Я. Никитин и др. 12-е изд., стер. СПб.: Лань, 2022. 548 с. Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/184183>.
2. Бычкова О. В. Сельскохозяйственная биотехнология [Электронный ресурс]: учебное пособие / О. В. Бычкова, Л. П. Хлебова. СПб.: Троицкий мост, 2023. 244 с. Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/313907>.
3. Дюльгер Г. П. Физиология и биотехника размножения животных. Курс лекций [Электронный ресурс]. 3-е изд., стер. СПб.: Лань, 2023. 256 с. Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/314786>.
4. Современные методы селекции при производстве говядины [Электронный ресурс] / Х. А. Амерханов, Р. З. Абдулхаликов, А. Ф. Шевхужев, Л. Н. Скорых. СПб.: Лань, 2023. 196 с. Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/356090>.
5. Чепуштанова О. В., Келин Ю. В. Использование сексированного семени для увеличения воспроизводительной функции тёлочек в АО «Совхоз «Сухоложский» // Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве: материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт. 2017. С.524-528.