

УДК 575.113:598.261.7

ВПЛИВ РІЗНИХ РЕЧОВИН НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ПЕРЕНЕСЕННЯ ЧУЖОРІДНИХ ГЕНІВ У ГЕНОМ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЯПОНСЬКИХ ПЕРЕПЕЛІВ (*COTURNIX JAPONICA*)

Л. І. Калакайло, провідний інженер, Ю. І. Лесняк, аспірант, В. Г. Спиридонов, д. с.-г. н.
kalakajlo92@ukr.net

Українська лабораторія якості безпеки продукції АПК, м. Київ

В останні роки розроблено низку методів для отримання трансгенних тварин. Альтернативним і недорогим є метод введення чужорідної ДНК у сперматозоїди (*Sperm mediated gene transfer*, SMGT) до запліднення. Перспективними у цьому плані є перепели (*Coturnix*), оскільки швидке відтворення робить їх зручним об'єктом для експериментів.

Метою досліджень було збільшення активності трансфекції сперматозоїдів внаслідок використання різних речовин: диметилсульфоксиду (DMSO), *Lipofectamin 2000* (*Life technology*, США) та наночасток хітозану (d=50 нм), отриманих в лабораторних умовах.

Для дослідження використовували сперматозоїди, отримані від самців японського перепела (*Coturnix japonica*). Якість сперматозоїдів оцінювали за рухливістю та активністю з використанням мікроскопу ($\times 20$), кількість сперматозоїдів визначали за допомогою камери Маклера. Для підвищення трансфікування проводили відмивання сперматозоїдів від піни та сім'яної рідини. Як екзогену ДНК використовували плазмиду pEGFP-N1 (*Clontech*, США).

Еякулят перепелів із вмістом сперматозоїдів 10^6 в 1 мл розділяли на 5 груп: 1 — контрольна I (здійснювали відмивання сперматозоїдів і без застосування екзогенної ДНК); 2 — контрольна II (проводили відмивання сперматозоїдів з використанням екзогенної ДНК); 3 — дослідна з використанням DMSO (після відмивання сперматозоїди інкубували протягом 30 хв з екзогенною ДНК та 3 % розчином диметилсульфоксиду); 4 — дослідна з використанням розчину *Lipofectamin 2000* (після відмивання сперматозоїди інкубували протягом 30 хв з екзогенною ДНК та *Lipofectamin 2000*); 5 — дослідна з використанням наночасток хітозану (після відмивання сперматозоїди інкубували протягом 30 хв з екзогенною ДНК та 0,5% розчином наночасток хітозану).

Після проведення трансфекції рухливість та життєздатність сперматозоїдів оцінювали під мікроскопом ($\times 20$). Ефективність трансфекції сперматозоїдів оцінювали за характерним флуоресцентним світінням трансфікованих сперматозоїдів з використанням флуоресцентної мікроскопії внаслідок експресії зеленого флуоресцентного білка (*green fluorescent protein*, GFP). Оцінювали флуоресцентне світіння трансфікованих сперматозоїдів за допомогою 5-бальної шкали від 1 до 5.

Обробка сперматозоїдів за допомогою диметилсульфоксиду незначно зменшувала їх активність, проте помітно сприяла їх успішному трансфікуванню (3 бали).

Обробка сперматозоїдів *Lipofectamin 2000* практично не зменшувала їх активність, проте сприяла успішному трансфікуванню (5 балів).

При обробці сперматозоїдів наночастками хітозану активність незначно зменшувалась, однак відмічено їх успішне трансфікування (4 бали).

Успішність трансгенної передачі у зразках еякуляту з використанням диметилсульфоксиду (DMSO) становила 38 %, *Lipofectamin 2000* та хітозану — 56 %.

Таким чином, ми показали можливість застосування наночасток хітозану, отриманих у лабораторних умовах, як переносника екзогенної ДНК у сперматозоїди перепелів, що відкриває подальшу перспективу для відтворення методики трансгенезу птахів методом SMGT на прикладі перепелів.