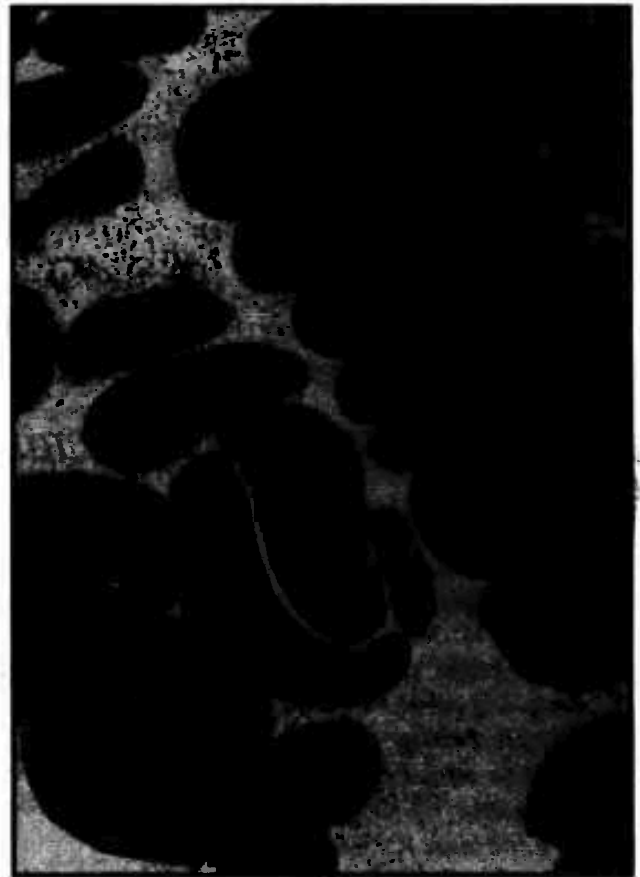


УКРАЇНЬСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ
УКРАЇНЬСЬКА АКАДЕМІЯ НАУК

ВІСНИК ПРОБЛЕМ БІОЛОГІЇ І МЕДИЦИНИ



3

ПОЛТАВА-2005

ЗМІСТ

ЮВІЛЕЙНА ДАТА

- М.С. Скрипніков, М.Ю. Максимук, Ю.П. Костиленко, О.М. Проніна, С.І. Данильченко.* Петро Михайлович Ковтуновський (до 80-річчя з дня народження).....3

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

- Б.А.Насибуллин, С. Г. Гуца.* Возможное участие иона бора в осуществлении регуляции функциональной активности почек.....5
- Б.А.Насібуллін, Л.В.Тихохід.* Сучасне уявлення про механізми формування залізодефіцитних станів та їх коригування різними засобами.....9
- С.П. Ярова, Т.И. Осокина, Т.С. Осипенкова, И.И. Заболотная.* Особенности клинического течения кандидоза слизистой оболочки полости рта.....15

ЛЕКЦІЇ

- Т.П. Гармаш.* Вирішення проблеми штучного осіменіння і трансплантації ембріонів свиней за роботами доктора біологічних наук академіка О.В. Квасницького.....20

БІОЛОГІЯ

- А.К. Гулевский, Е.А. Грищенкова, Л.И. Релина, Л.В. Карева.* Влияние переохлаждения на антиоксидантную систему жуков-чернотелок *tenebrio molitor* на разных стадиях онтогенеза.....27
- О. Н. Денисова.* Исследование уровня 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах животных после низкотемпературного консервирования под защитой диметилсульфооксида и полиэтиленгликоля м. м. 1500.....33
- В.В. Навроцкая, В.Г. Шахбазов.* Влияние видимого света на процесс мутагенеза и проявление гетерозиса у *Drosophila melanogaster*.....38
- Г.Д. Телегеев, А.С. Савов, А.С. Драницина, М.В. Дыбков, Б. Вачев, В.Ф. Безруков.* Определение пола пингвинов дженту методом ПЦР.....44
- Т.В. Тыжненко.* Генетический анализ предрасположенности к ишемическому инсульту в Харьковской популяции.....47
- В.Ю. Філіпов, С.П. Весельський, Л.П. Бучацький.* Вплив хлоріридовірусу комара *aedes cinereus* на вміст ліпідів у личинках великої вошинної молі.....52
- Н.В. Чижанська, О.І. Цирюк, Т.В. Берегова.* Про участь оксиду азоту в цитопротективній дії меланіну на слизову оболонку шлунка.....56
- А.Є. Шепєлєв.* Зміни хімічного складу стегнової кістки щурів після тренування помірними динамічними фізичними навантаженнями в умовах опромінення та споживанню солей важких металів.....60

КЛІНІЧНА І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

- В.Є. Вансович.* Індивідуальні особливості внутрішньочеревної адгезії при експериментальному моделюванні спайкової хвороби.....63

УДК 577.21

Г.Д. Телегеев, А.С. Савов¹, А.О. Драницина²,
М.В. Дыбков, Б. Вачев², В.Ф. Безруков³

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА ПИНГВИНОВ ДЖЕНТУ МЕТОДОМ ПЦР

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины (г. Киев)

¹Лаборатория Молекулярной Биологии (Болгария)²Институт Ядерных Исследований и Ядерной Энергии,
Болгарская Академия Наук (Болгария)³Киевский Национальный Университет имени Тараса Шевченко (г. Киев)

Вступление. Определение пола у морморфных видов (к которым относится большинство морских птиц) является затруднительным процессом. Тогда как точные данные необходимы во многих сферах исследований, например, в молекулярной экологии и биологии развития. Пингвинам, в том числе ослиному пингвину – дженту (*Pygoscelis papua*), присущи незначительные внешние различия в размере тела и оперении, связанные с половым диморфизмом [8, 11]. Несмотря на то, что самцы обычно больше самок, изменения, которые происходят с возрастом, и частичное совпадение в размере между членами пары делает проблематичным определение пола путем прямого наблюдения [3]. Для особей нескольких видов пингвинов была установлена их половая принадлежность разными методами, что включали в себя: наблюдение за процессом копуляции, осмотр клоаки, анатомирование особей [7] и разработка дискриминантных функций для определения пола на основе биометрических данных [3, 9, 10]. Потенциальной альтернативой для точного определения пола пингвинов служат недавно разработанные методы на основе ДНК [3, 6, 7]. Среди них – обнаружение генов на основе EEO.6 последовательности в полимеразной цепной реакции [4, 5]. Eeo R1 фрагмент (EEO.6) длиной 0,6 кб клонирован Итохом и др. с W хромосомы цыплят. Эта неповторяющаяся последовательность, в свою очередь, содержит экзонподобную последовательность ET15, которая, вероятно, является частью псевдогена. Копия фрагмента EEO.6 присутствует на Z хро-

мосоме. Состав половых хромосом птиц следующий: ZW для самок и ZZ для самцов. Степень различия между W- и Z-связанными последовательностями варьирует среди видов. Вышеописанный молекулярно-генетический метод был использован для некоторых видов пингвинов, но не был продемонстрирован на пингвинах дженту.

Целью работы была оценка возможности использования праймеров, сконструированных Итохом и др. [5], для выявления W-специфической и Z-W общей (внутренний контроль) последовательностей ДНК в ходе ПЦР на основе EEO.6 последовательности для определения пола пингвинов дженту.

Объект и методы исследования. Образцы крови пингвинов были получены участниками Болгарской и Украинской Антарктических экспедиций в течение лета 2002, 2003 и 2004 годов с островов Питерман и Ливингстон: 146 и 87 образцов соответственно. К 400 мкл замороженной крови на льду добавляли 1 мл стерильного охлажденного 0,9% NaCl, тщательно перемешивали и осаждали эритроциты центрифугированием 1 мин. при 10000 g. Повторяли этап отмывания еще два раза. К осадку добавляли 5 мл раствора для лизиса ядер (10 mM EDTA; 50 mM Трис-HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl), 10% SDS до концентрации 1% и протеинкиназу K до конечной концентрации 45 мкг/мл. Тщательно перемешивали и инкубировали полученную смесь 18 ч. при +37 °C. Потом добавляли 5 M NaCl (до конечной концентрации 1 M) и центрифугировали при комнатной температуре 8000 g в течение 15 мин. [1]. К супернатанту добавляли 1:1 объем

изопропанола, затем наматывали ДНК на стеклянную палочку, промывали в 70° этаноле, 96° этаноле и, подсушив на воздухе, растворяли в 1000 мкл дистиллированной воды. Полимеразную цепную реакцию проводили в 50 мкл реакционной смеси [5], что содержала 10 нг геномной ДНК матрицы, буфер для ПЦР ("Sigma"), по 200 мкМ каждого dNTP, 0,4 мкМ каждого праймера и 1,75 ед. ДНК полимеразы

("Sigma"). Состав праймеров и условия циклов приведены в таблице. Разделение ПЦР продуктов проводили электрофоретически в 1,5% агарозном геле ("Chemapol") в 0,5 хТВЕ буфере (0,089 М Трис-борат, 0,089 М борная кислота, 0,002 М ЕДТА, рН 8,0), как описано у Маниатиса [2]. Гели красили водным раствором бромистого этидия (20 мг/мл) и фотографировали в УФ свете.

Таблица

Распределение ПЦР продуктов

1. Праймер		Последовательность (5'–3')				Источник
USP3		AGCTGGAYTTCAGWSCATCTTCT				Itoh et al. (2001) [5]
AWSO3		ACAGTTTGTCTGTCTCCGGGGAA				
CPEI5F		AAGCATAGAAACAATGTGGGAC				
CPEI5R		AACTCTGTCTGGAAGGACTT				
2. Праймеры для определения пола	Контрольный праймер	Денатурация	Отжиг	Синтез	Циклы	
AWSO3/USP3	CPEI5F/CPEI5R	95 °С, 80 сек.	59 °С, 90 сек.	72 °С, 60 сек.	35	

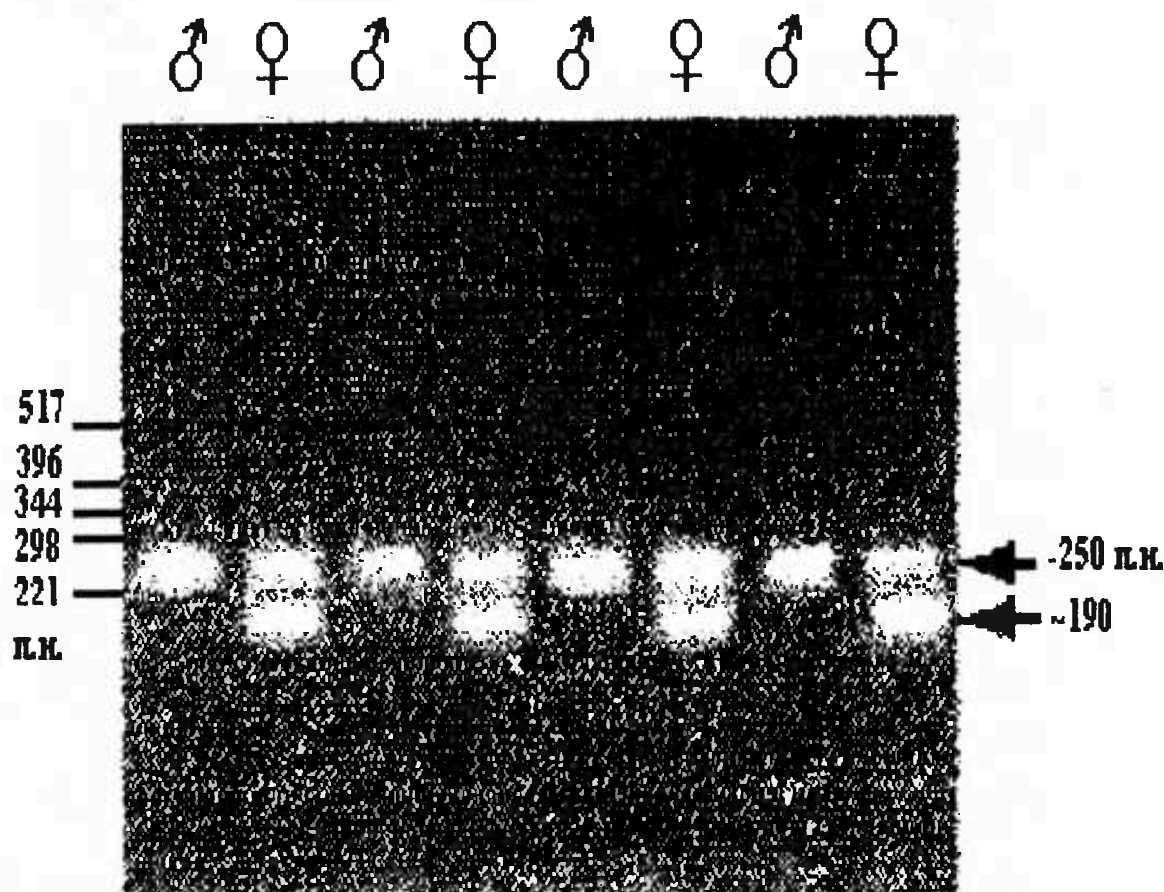


Рис. Определение пола пингвинов дженту методом ПЦР: ♂ - самец; ♀ - самка

Результаты исследования и их об- суждение. Методом ПЦР со специфическими праймерами на основе ЕЕО.6 последовательности было проанализировано 233 образца ДНК пингвинов (146 с о. Питерман и 87 с о. Ливингстон). Как видно из рис. «единичная (W)–специфическая полоса» 190 п.н. и единичная полоса внутреннего контроля были выявлены на электрофореграммах разделения продуктов ПЦР. Таким образом, для образцов ДНК самок были характерными две полосы, а для самцов – одна. На основе полученных результатов были обчислены индексы самка/самец, что составили 0,337 для популяции о. Питерман и 0,390 для популяции о. Ливингстон. Молекулярные методы имеют явные преимущества в сравнении с обычными, включающими наблюдение за поведением птиц, осмотр клоаки и внутреннее исследование гонад при вскрытии тела. Последнее, естественно, влечет за собой смерть животного и, таким образом, этически сомнительно [3]. Определение пола пингвинов при наблюдении за поведением (позиции при копуляции) ограничено небольшим отрезком времени сезона размножения. При осмотре клоаки методом эндоскопии животные нередко испытывают стресс [7]. Измерение размера заднего прохода также

ограничено коротким периодом (несколько дней после откладывания яиц) и применимо только для птиц, которые размножаются. Исследования дискриминантных функций не всегда достоверны, так как различия в морфометрических характеристиках (длина клюва, масса тела и т.д.) часто сопряжены с географическими вариациями границ ареала, а не с половым диморфизмом особей вида [3]. Определение пола с помощью анализа кариотипа может проводиться независимо от возраста птиц и времени, но требует культуры клеток крови, что занимает больше времени, чем молекулярные методы, использованные нами [3, 6].

Выводы. 1. ПЦР со специфическими праймерами на основе ЕЕО.6 последовательности является наиболее простым, удобным и надежным методом определения пола пингвинов дженту. 2. Получены индексы самка/самец, которые составили 0,337 для популяции о. Питерман и 0,390 для популяции о. Ливингстон. 3. Полученные индексы самка/самец могут быть в дальнейшем использованы для изучения уровня генетического и фенотипического разнообразия и оценки структуры генотипа этого вида. Работа частично финансировалась грантом INTAS 2001-0517.

Список литературы

1. Малюта С.С., Дыбков М.В., Телегеев Г.Д. Изучение полиморфизма ДНК жителей Украины, выявляемого зондом на основе фага M13 // Цитология и генетика. – 1996. – 33, №1. – С. 31-35. – 2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. – М.: Мир, 1984. – 480 с. – 3. Bertellotti M., Tella J.L., Godoy J.A., Blanco G., Forero M.G., Bonazar J.A., Ceballos O. Determining sex of Magellanic Penguins using molecular procedures and discriminant functions // Waterbirds. – 2002. – 25, №4. – P. 479-484. – 4. Forero M.G., Hobson K.A. Using stable isotopes of nitrogen and carbon to study seabird ecology: applications in the Mediterranean seabird community // Scientia Marina. – 2003. – 67, Suppl. 2. – P. 23-32. – 5. Itoh Y., Suzuki M., Ogawa A., Munechika I., Murata K., Mizuno S. Identification of the sex of a wide range carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EEO.6 and its related sequences // The American Genetic Association. – 2001. – 92. – P. 315-321. – 6. Knihnicki K., Koontz C., Son J., Tubesing M. Sex determination in chicken tissue samples using PCR // Governor's School for Agriculture, Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061. – 2004. – 7. Malago W.Jr., Franco H.M., Matheucci E.Jr., Medaglia A., Henrique-Silva F. Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers // BMC Biotechnology. – 2002. – №2, 19. – P. 24-28. – 8. Martinez I. Handbook of the Birds of the World // Lynx Editions. – 1992. – P. 140-172. – 9. Massaro M., Davis L.S., Darby J.T. Carotenoid-derived ornaments reflect parental quality in male and female yellow-eyed penguin (Magadypetes antipodes) // Behav. Ecol. Sociobiol. – 2003. – 55. – P. 169-175. – 10. Moreno J., Potti J., Yorio P. Sex differences in cell-mediated immunity in the Magellanic Penguins Spheniscus magellanicus // Ann. Zool. Fennici. – 2001. – 38. – P. 111-116. – 11. Williams T.D. The Penguins // Oxford University Press, Oxford. – 1995. – 295 pp.

УДК 577.21

ВИЗНАЧЕННЯ СТАТІ ПІНГВІНІВ ДЖЕНТУ МЕТОДОМ ПЛР**Телегеев Г.Д., Савов А.С., Драницина А.С., Дибков М.В., Вачев В., Безруков В.Ф.**

Резюме. У даній роботі була проведена оцінка можливості використання ПЛР із специфічними праймерами на основі EEO.6 послідовності для визначення статі пінгвінів дженту. Було проаналізовано 233 зразка ДНК пінгвінів (146 з о. Пітерман та 87 з о. Лівінгстон) і виявлено одиничну (W)–специфічну смугу »190 п.н., яка була характерна лише для самок, та одиничну смугу внутрішнього контролю (Z/W загальна) »250 п.н., характерну як для самок, так і для самців, на електрофореграмах розділення продуктів ПЛР. На основі отриманих результатів обраховано індекси самка/самець, що склали 0,337 для популяції о. Пітерман та 0,390 для популяції о. Лівінгстон. Показано, що даний метод може бути використаний для швидкого і точного визначення статі мономорфних видів птахів, до яких належать пінгвіни дженту.

Ключові слова: пінгвіни, дженту, *Pygoscelis papua*, ДНК, стать, ПЛР, праймери.

UDC 577.21

SEX IDENTIFICATION OF GENTOO PENGUINS USING PCR**Telegeev G.D., Savov A.S., Dranitsina A.S., Dybkov M.V., Vachev B., Bezrukov V.F.**

Summary. In the present work the possibility of PCR technique with specific primers based on the EEO.6 sequence for sex determination of gentoo penguins was evaluated. It was analyzed 233 DNA probes of penguins (146 from Piterman Island and 87 from Livingston Island) and detected a single female (W) - specific band »190 bp and a single band of an internal control (Z/W common) »250 bp which was specific both for females and males at electrophoresis of PCR products. Accordingly to the obtained results female/male indexes were estimated. The results were as follows: 0,337 for population of Piterman Island and 0,390 for Livingston Island. It has been shown that the method could be used for rapid and accurate sex identification of monomorphic avian species such as gentoo penguins.

Key words: penguins, Gentoo, *Pygoscelis papua*, DNA, sex, PCR, primers.