



УКРАЇНА

(19) UA (11) 45687 (13) U  
(51) МПК (2009)  
G01N 33/48  
G01N 15/06

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ПРЕПАРАТІВ МЕТАФАЗНИХ ХРОМОСОМ КУРЕЙ

1

(21) u200904488

(22) 06.05.2009

(24) 25.11.2009

(46) 25.11.2009, Бюл.№ 22, 2009 р.

(72) ГЛЕЧИК МАР'ЯНА ВІКТОРІВНА, СТИБЕЛЬ  
ВОЛОДИМИР ВОЛОДИМИРОВИЧ

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИ-  
ТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНО-  
ЛОГІЙ ІМЕНІ С.З. ГЖИЦЬКОГО

(57) Спосіб виготовлення препаратів метафазних хромосом курей, який включає використання як біологічного об'єкта лейкоцитів периферичної крові, взятої стерильно у посуд з гепарином, культивування в поживному середовищі з додаванням фітогемаглютиніну та 10 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби при температурі 37 °С в термостаті протягом 48 годин при обережному

2

помішуванні інкубату двічі на добу, припинення мітозу хромосом лейкоцитів на стадії метафази додаванням колхіцину за 1-2 години до завершення терміну культивування, відмивання клітин лейкоцитів гіпотонічним розчином (0,3%) хлористого калію з наступним центрифугуванням, фіксацію сумішшю метанол : оцтова кислота (3:1), виготовлення препаратів розкапуванням відмитих клітин з висоти 15-20см на предметні стекла, фарбування 2% розчином Гімза, який **відрізняється** тим, що стерильний відбір крові курей здійснюють з крилевої вени в кількості 10мл у стерильні флакони з гепарином (5 од гепарину на 1 мл крові), в які для культивування попередньо вносять 0,1мл фітогемаглютиніну та 6,5мл поживного середовища 119 на соленому розчині Ерла з додаванням 10% ембріональної бичачої сироватки.

Корисна модель належить до сільськогосподарської біології, зокрема біології курей, а саме до цитогенетичних способів дослідження курей. Заявлений спосіб може бути застосований у лабораторіях науково-дослідних установ, які займаються селекційною роботою в птахівництві.

В каріології курей широко відомі і використовуються в лабораторній практиці для мікроскопічного аналізу хромосом клітини кісткового мозку, пульпи пера, ембріональних тканин, сім'яників, периферичної крові, фібробластів (Панченко Н.А. Исследование хромосом у домашних кур. - «Цитология и генетика», 1972,6,2,153-157).

Виготовлення препаратів хромосом соматичних клітин різних тканин базуються на основних принципах, описаних у працях Форда, Хамертона (Ford, Hamerton. 1956) і Мурхеда із співавторами (Moorhead et al., 1960), але в теперішній час бага-

то із запропонованих цими авторами прийомів піддаються значним модифікаціям.

Так, відомий спосіб отримання каріотипів курей шляхом використання клітин кісткового мозку (Яковлев А.Ф., Цитогенетическая оценка племенных животных.- Москва: Агропромиздат, 1985.- С.201-206 Ford C.E., Hamerton J.L., A colchicine hypotonic citrate squash sequences for mammalian chromosomes // Stain Technol. - 1956. - Vol.31. - P.247-251, Г. Макгрегор, Дж. Варли Методы работы с хромосомами животных.- Москва: Мир, 1986 С.37-38). Для даного способу використовують 1-3-х денних курчат, у яких після забою кістковий мозок витягують з стегнової кістки. Недоліком способу є те, що з пунктатом потрапляє кров, яка є серйозною перешкодою для подальшого культивування.

Відомий також спосіб виготовлення хромосомних препаратів із лейкоцитів периферичної крові

(13) U

(11) 45687

(19) UA

(Moorched P., Nowell P., Mellman W.T., Battips D.M., Hungeford D.A. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood // *Exp. Cell Res.* - 1960.- Vol. 20. - P.613-616). Відомий спосіб включає використання в якості біологічного об'єкту лейкоцитів периферичної крові, взятої стерильно в стерильні пробірки з гепарином та фітогемаглютиніном М, охолодження при температурі +4°C 30 хвилин, відділення лейкоцитів з плазмою і використання її для культивування в поживному середовищі 199 на соленому розчині Ерла у співвідношенні 1:3, інкубування в термостаті при температурі +37°C протягом 72 годин, зупинку мітозу лейкоцитів в стадії метафази, колхіцином за 1-2 години до завершення інкубування, відмивання клітин лейкоцитів розчином Хенкса та гіпотонічним розчином KCl (0,3%) з наступним центрифугуванням, фіксацію сумішшю метанол: оцтова кислота (3:1); розкапування відмитих клітин з висоти 15-20см, фарбування 2% розчином Гімза.

Недоліки відомого способу полягають в його складності, довготривалості здійснення, високих економічних витратах на матеріали і реактиви, при цьому не завжди вдається досягнути стабільності результатів у отриманні достатньої кількості метафазних пластинок, а також високої якості отриманих препаратів.

Найбільш близьким по суті до способу, що заявляється є спосіб виготовлення метафазних хромосом свиней (НУ на корисну модель №4394). Відомий спосіб включає використання в якості біологічного об'єкта лейкоцитів периферичної крові, взятої стерильно з краніальної порожнистої вени в посуд з гепарином, культивування в середовищі Ігла при температурі 37°C в термостаті, припинення мітозу хромосом лейкоцитів колхіцином на стадії метафази за 1,5-2 години до завершення терміну культивування, відмивання клітин лейкоцитів гіпотонічним розчином хлористого калію (0,3%) з наступним центрифугуванням, фіксацію сумішшю метанол:оцтова кислота; виготовлення препаратів розкапуванням відмитих клітин з висоти 15-20см на предметні скла, фарбування 2% розчином Гімза, при цьому для культивування клітин лейкоцитів використовують 0,5мл цільної крові гепаринизованої крові, яку зразу ж після відбору вносять в стерильний посуд з середовищем Ігла, в яке попередньо додатково вводять 10% ембріональної телячої сироватки і культивують у термостаті протягом 48 годин, обережно перемішуючи інкубат двічі на добу.

Заявлений спосіб і прототип мають загальні спільні ознаки: обидва способи включають використання в якості біологічного об'єкта лейкоцитів периферичної крові взятої стерильно у посуд з гепарином культивування в поживному середовищі з додаванням фітогемаглютиніну та 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби при температурі 37°C в термостаті протягом 48 годин при обережному помішуванні інкубату двічі на добу, припинення мітозу хромосом лейкоцитів на стадії метафази додаванням колхіцину за 1-2 години до завершення терміну культивування, відмивання клітин лейкоцитів гіпотонічним розчином (0,35) хлористого калію з наступним центрифугу-

ванням, фіксацію сумішшю метанол:оцтова кислота (3:1) виготовлення препаратів розкапуванням відмитих клітин з висоти 15-20см на предметні скла, фарбування 2% розчином Гімза.

Недоліком відомого способу є те, що він придатний для виготовлення препаратів метафазних хромосом лейкоцитів свиней і не використовується для виготовлення препаратів метафазних хромосом лейкоцитів інших тварин і птахів.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки прототипа і забезпечує одержання за короткий термін якісних препаратів метафазних хромосом курей в достатній для досліджень кількості.

В основу корисної моделі покладено завдання розробити зручний у виконанні, швидкий у здійсненні та економічно вигідний спосіб виготовлення високоякісних препаратів метафазних хромосом курей.

Технічний результат досягається тим, що стерильний відбір крові курей здійснюють з крилевої вени в кількості 10мл у стерильні флакони з гепарином (50д гепарину на 1мл крові), в які для культивування попередньо вносять 0,1мл фітогемаглютиніну та 6,5мл поживного середовища 119 на соленому розчині Ерла з додаванням 10% ембріональної бичачої сироватки.

Культивування клітин лейкоцитів цільної гепаризованої крові (10мл) курей в ростовому середовищі 199 на соленому розчині Ерла (6,5мл) шляхом інкубування в термостаті при температурі +37°C забезпечує оптимальні умови для росту і поділу хромосом, при цьому додавання до середовища 10% ембріональної бичачої сироватки сприяє склеюванню формених елементів крові (тромбоцитів і еритроцитів) і забезпечує чистоту культури клітин лейкоцитів, що необхідно для виготовлення якісних препаратів. При зазначених умовах тривалість інкубації 48 годин виявляється оптимальною і забезпечує одержання достатньої кількості високоякісних метафазних пластинок з добрим розкидом хромосом.

В зв'язку з вище зазначеним, одержані за заявленим способом препарати мають високу якість, є показовими і з добрим розкидом хромосом.

При проведенні заявником патентно-інформаційного пошуку знайдено технічне рішення (ПУ на корисну модель №4394), яке містить найбільшу кількість суттєвих ознак, спільних із заявленим способом: використання в якості біологічного об'єкта лейкоцитів периферичної крові взятої стерильно у посуд з гепарином культивування в поживному середовищі з додаванням фітогемаглютиніну та 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби при температурі 37°C в термостаті протягом 48 годин при обережному помішуванні інкубату двічі на добу, припинення мітозу хромосом лейкоцитів на стадії метафази додаванням колхіцину за 1-2 години до завершення терміну культивування, відмивання клітин лейкоцитів гіпотонічним розчином (0,3%) хлористого калію з наступним центрифугуванням, фіксацію сумішшю метанол:оцтова кислота (3:1) виготовлення препаратів розкапуванням відмитих клітин з висоти 15-20см на предметні скла, фарбування 2% розчином Гімза.

Однак наявність зазначених суттєвих ознак недостатня для одержання технічного результату, який забезпечує заявлений спосіб.

Технічних рішень, які б за сукупністю ознак повністю співпадали з ознаками заявленого рішення не виявлено. Це дозволяє зробити висновок про відповідність заявленого рішення критерію винаходу (корисної моделі) "новизна".

В джерелах патентної і науково-технічної інформації не знайдено відомості про ознаки, що відрізняють заявлений спосіб від прототипу і забезпечують досягнення технічного результату: стерильний відбір крові курей здійснюють з крилової вени в кількості 10мл у стерильні флакони з гепарином (5од гепарину на 1мл крові), в які для культивування попередньо вносять 0,1мл фітогемаглютиніну та 6,5мл поживного середовища 119 на соленому розчині Ерла з додаванням 10% ембріональної бичачої сироватки.

Отже, заявлене технічне рішення не впливає явним чином з рівня техніки, що дозволяє зробити висновок про його відповідність критерію винаходу (корисної моделі) "винахідницький рівень".

Заявлений спосіб належить до сільськогосподарської біології, зокрема, біології курей, а саме до цитогенетичних способів дослідження курей і може бути застосований в лабораторіях науково-дослідних установ, які займаються селекційною роботою в птаківництві, а тому відповідає критерію винаходу (корисної моделі) "промислова придатність".

Таким чином, заявлене технічне рішення є новим, промислово придатним, має винахідницький рівень, тобто відповідає всім умовам патентоспроможності винаходу (корисної моделі) відповідно до статті 7 розділу II Закону України «Про охорону прав на винаходи і корисні моделі» №1771-III, 2000р.

Кров для досліджень беруть стерильним способом з крилової вени. Місце взяття крові ближче, до ліктьового суглобу, звільняють від пуху, шкіру дезинфікують і проколюють вену. Кров в дозі 10мл відбирають в шприц і переносять в стерильну пробірку із гепарином (5од. гепарину на 1 мл крові).

У стерильно перекриті флакони вносять 0,1мл фітогемаглютиніну, 6,5мл ростового середовища 199 на соленому розчині Ерла +10% ембріональної бичачої сироватки та 0,5мл гепаризованої крові, струшують і вміщують для культивування у термостат на 48 годин при температурі +37°C.

Клітини лейкоцитів культивують протягом 48 годин при температурі +37°C, обережно перемішуючи вміст флаконів двічі на добу.

У кожний флакон додають до кінцевої концентрації 10 у колхіцину (0,1мл на флакон за 1 годин до закінчення культивування клітин). Починаючи з цього етапу можна працювати у нестерильних умовах.

Перемішавши вміст флаконів, переливають їх у 15мл центрифужні пробірки. Клітини осаджують центрифугуванням за режиму 1500об/хв протягом 10 хвилин і відбирають надосадову рідину за допомогою пастерівської піпетки.

Осад ресуспендують і додають 6мл попередньо нагрітого до 37°C піпотонічного розчину 0,075M KCl і ставлять на 40-50 хвилин у термостат при температурі 37°C. Потім центрифугують при 1500об/хв протягом 10 хвилин. Надосадову рідину обережно відсмоктують, осад ресуспендують.

До осаду додають 10мл метанол + оцтова кислота (3:1) і вміщують у холодильник на 20 хвилин. Клітини осаджують центрифугуванням при 1500об/хв. протягом 10 хвилин. Надосадову рідину відсмоктують. Фіксатор змінюють 2-3 рази з проміжним ресуспендуванням і центрифугуванням клітин.

Після третьої зміни фіксатора суспендант відсмоктують, залишаючи 0,5мл осаду.

Препарати метафазних хромосом готують методом розкапування з висоти 15-20см на знежирені вологі охолоджені предметні скельця. Скла підсушують в полум'ї горілки.

Препарати фарбують 2% розчином Гімза.

Запропонований нами спосіб дозволяє отримати значну кількість метафазних пластинок з добрим розкидом хромосом.

Приклад конкретного виконання способу.

Ефективність заявленого способу і його переваги перед прототипом підтверджені прикладом конкретного виконання способу завдання:

У Аф «Ватра» Дрогобицького району Львівської області відібрано 20 курей 25 денного віку породи «Хайсекс», які були поділені шляхом аналогів на 2 групи.

Із 10 курей 1-ої групи готували препарати метафазних хромосом за відомим способом (прототип).

Із 2-ої групи - за заявленим способом з цільної крові курей.

В цільну кров, добуту з крилової вени курей, описаним в розділі 4.1 методом, додавали середовище 199 на соленому розчині Ерла з глутаміном, ембріональну сироватку биків і фітогемаглютинін. Вміст пробірки перемішували двічі на добу та інкубували 48 годин.

Решта елементів релізації заявленого способу були однаковими при виготовленні препаратів метафазних хромосом за прототипом і новим способом.

Перелік технологічних елементів виготовлення препаратів метафазних хромосом лейкоцитів периферичної крові курей за відомим способом (прототип) та заявленим (новий спосіб) наведений в таблиці 1.

Аналіз якості одержаних препаратів подано в таблиці 2.

Таблиця 1

Технологія виготовлення препаратів метафазних хромосом курей за різними способами

Етапи виготовлення препаратів	Відомий спосіб (прототип)	Новий спосіб
Відбір крові стерильно в стерильну посудину з гепарином 5 од на 1мл крові.	0,5мл у пробірку	10мл у флакон
Культивування: - додавання фітоаглютиніну, - поживного середовища з ембріональної сироватки - в термостаті при $t=37^{\circ}\text{C}$ протягом 48год з струшуванням (перемішуванням)вмісту посуду двічі на добу	0,1мл ростове середовище Ігла+6,5мл телячої сироватки	0,1мл поживне середовище №199 на соленому розчині Ерла+10% бичачої сироватки
Припинення мітозу хромосом лейкоцитів внесенням колхіцину загальної концентрації 10 $\mu$	за 1-2год до кінця культивування	за 1год до кінця культивування
Відмивання клітин лейкоцитів гіпотонічним розчином 0,3% КСІ центрифугуванням		
Фіксація відмитих клітин сумішшю метанол: оцтова кислота (3:1)		
Виготовлення препаратів розкапуванням з висоти 15-20см на підготовлені скла		
Фарбування 2% розчином Гімза		

Таблиця 2

Характеристика застосованих способів отримання препаратів хромосом курей

Група	Об'єкт дослідження	Всього метафазних пластинок	Якісних	Неякісних
I (прототип)	Лейкоцити крові	1000	930	70
II новий спосіб	Лейкоцити крові	1000	1000	0

Дані таблиці свідчать, що найбільш оптимальним є отримання метафазних хромосом за новим способом, про що говорить велика кількість аналізів метабельних метафазних пластинок.

Отже, заявлений нами спосіб забезпечує одержання високоякісних препаратів метафазних хромосом при економії часу на виготовлення і використання реактивів.