

Изобретение относится к области животноводства, преимущественно биотехнологии, и может быть использовано при получении химер сельскохозяйственных животных.

В современной биотехнологии используются химеры - составные организмы, объединяющие в себе эмбриональные клетки двух или более животных, относящихся не только к одной породе, но и к разным породам и даже видам.

Наиболее близким по технической сущности является способ получения химер методом агрегации двух (или более) генотипически разнородных эмбрионов [Завертяев Б. П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. -Л.: Агропромиздат, 1989, с. 170].

Сущность способа состоит в том, что два эмбриона, различающиеся генотипами на определенной стадии развития освобождают от зоны пеллюцида, обрабатывая проте-олитическим ферментом проназой. Освобожденные от зоны пеллюцида эмбрионы сближают друг с другом в культуральной среде. Соединенные эмбрионы культивируют в среде до завершения агрегации, т. е. образования бластоциды. Методом агрегации можно получить химеры как между двумя эмбрионами, так и между различным числом изолированных бластомеров или отдельными частями эмбрионов. При этом масса химерных эмбрионов бывает не больше, чем у обычных эмбрионов, т. е. она подтверждена действию механизмов эмбриональной регуляции.

Недостатком способа прототипа является невозможность получения химер крупного рогатого скота, так как в этом случае трудно удалить 5% проназой зону пеллюцида.

Задачей изобретения является усовершенствование способа получения химер сельскохозяйственных животных, в котором путем изменения условий освобождения от зоны пеллюцида возможно получение химер сельскохозяйственных животных, а именно крупного рогатого скота, с определенными, заранее запланированными признаками и свойствами: продуктивностью, молочностью, невосприимчивостью к болезням, что необходимо для планирования результатов селекции и создания сельскохозяйственных животных с определенным набором признаков, которые невозможно получить при обычной селекции или применения методы генной инженерии.

Поставленная задача решается в способе получения химер сельскохозяйственных животных методом агрегации, включающий освобождение находящихся в закрытой или открытой канюли с культуральной средой генотипически разнородных эмбрионов от зоны пеллюцида, соединение их в культуральной среде и культивирование до завершения агрегации, согласно изобретению освобождение от зоны пеллюцида производят путем воздействия акустической волной, создаваемой лучом лазера, сфокусированным на поверхности культуральной среды или в самой среде, или на жесткой поверхности канюли.

Сущность предлагаемого способа поясняется чертежами, где на фиг. 1 показана схема получения химер сельскохозяйственных животных; на фиг. 2 (а, б, в) - варианты фокусировки луча лазера; а - на поверхности питательной среды, б - в питательной среде, в - на жесткой поверхности канюли; на фиг. 3 - возможные диаграммы направленности звука.

Сущность способа заключается в следующем.

Генетически разнородные эмбрионы помещают в закрытую или открытую канюлю с питательной средой. Канюлю устанавливают на предметный столик и в (в зависимости от степени развития эмбриона) устанавливают фокусное расстояние. Далее с помощью акустической волны, созданной в месте фокусировки лазерного излучения, удаляют зоны пеллюцида эмбрионов. После этого разнородные эмбрионы или их половинки соединяют в культуральной среде. Соединенные эмбрионы культивируют в течение 24-48 часов до завершения агрегации, т. е. до образования бластоциды. Полученные таким образом химерные эмбрионы трансплантируют животным или замораживают с последующей консервацией.

При сравнительно малых значениях интенсивности излучения, когда не происходит изменения агрегатного состояния среды (питательная жидкость), проявляются два механизма генерации звука: тепловой и электрострикционной. Наиболее универсальным по диапазону звуковых частот является тепловой механизм возбуждения звука. Уступая испарительному и пробойному в эффективности, он обладает по сравнению с ними рядом преимуществ с точки зрения практики и возможных применений. В частности он позволяет легко контролировать возбуждаемые звуковые поля и управлять их пространственными и временными характеристиками.

Таким образом, при фокусировки лазерного излучения длительностью t_d внутри жидкости в сферической области радиуса R часть энергии лазерного излучения поглощается в этой области, нагревает жидкость, которая за время τ_p расширяется, образуется область отрицательного давления, т. е. из области фокусировки излучения распространяются сферические акустические волны.

При этом звуковое давление в среде p описывается неоднородным волновым уравнением

$$\Delta p - (1/v^2)(a^2 p/at^2) = -\beta c_p^{-1}(aQ/at), \quad (1)$$

где v - скорость звука в среде;

β - коэффициент объемного расширения;

c_p - удельная теплоемкость среды,

Q - энергия излучения, поглощенная в объеме $V \sim R^3$ и перешедшая в тепло.

Решение этого уравнения требует задания начальных и граничных условий для p , а также явного вида зависимости aQ/at . Начальные и граничные условия могут быть заданы в следующей форме

$$p(r, t=0)=0, \quad p(r \rightarrow \infty, t)=0,$$

где время t отсчитывается от начала лазерного импульса.

При решении уравнения (1) важно выделить два случая исходя из соотношения размера нагреваемой области R и расстояния, на которое распространяется звук за время действия излучения ($v \tau_n$).

Для устранения термических воздействий на эмбрион рассматривается случай длинного импульса, когда за время τ_n звук распространяется за границу нагретой области, т. е. $v \tau_n > R$. При этом давление-, возникающее в среде под действием лазерного излучения, распространяется на гораздо больший объем

$\sim (\tau_n)^3$ по сравнению с другим случаем, когда объем $\approx R^3$.

решение уравнения (1) для длинного импульса излучения ($v \cdot \tau_n > R$) имеет вид

$$p(\tau_{n,\max}) \approx (\beta Q / c_p r) (1 / \tau_n)^2.$$

Таким образом, выбирая исходные данные лазерного излучения, длину импульса, зная исходное состояние питательной среды осуществляется амплитуда давления созданной звуковой волны, достаточная для разрушения зоны пеллюцида эмбрионов, взятых для создания химер.

Кроме того, изменяя диаметр фокусного пятна и подбирая волновое число для звуковой волны, и коэффициент поглощения света в жидкости, можно изменять диаграмму направленности звука в очень широких пределах, и также выбирать наиболее эффективный процесс разрушения зоны пеллюцида для данного эмбриона.

Способ реализуется на установке для лазерного деления эмбрионов, использующей непрерывный аргоновый лазер ЛГН-502, а также электромеханический затвор, позволяющий получать импульсы с заданной длительностью.

Опытным путем определено, что наиболее целесообразно уничтожать зону пеллюцида бластоциды при фокусировке луча лазера на жесткую поверхность канюли, зону пеллюцида ранней морулы при фокусировке луча лазера в саму питательную жидкость и зону пеллюцида ранней бластоциды и поздней морулы - на поверхности жидкости. В каждом из трех случаев брали по два различных эмбриона, помещенных в одну канюлю, и воздействовали на них акустической волной. При этом в каждом эксперименте образовывалось два, а в случае распада эмбрионов на отдельные части, несколько изолированных друг от друга половинок эмбрионов, освобожденных от зоны пеллюцида. Затем в каждом эксперименте различные эмбрионы или их половинки соединяли в этой же среде. Соединенные эмбрионы культивировали в течение 24-48 часов до образования бластоциды. Далее в каждом эксперименте проводилась морфологическая оценка полученных химерных эмбрионов. После чего жизнеспособные химерные эмбрионы либо консервировались, либо имплантировались животным. Данные сведены в таблицу.

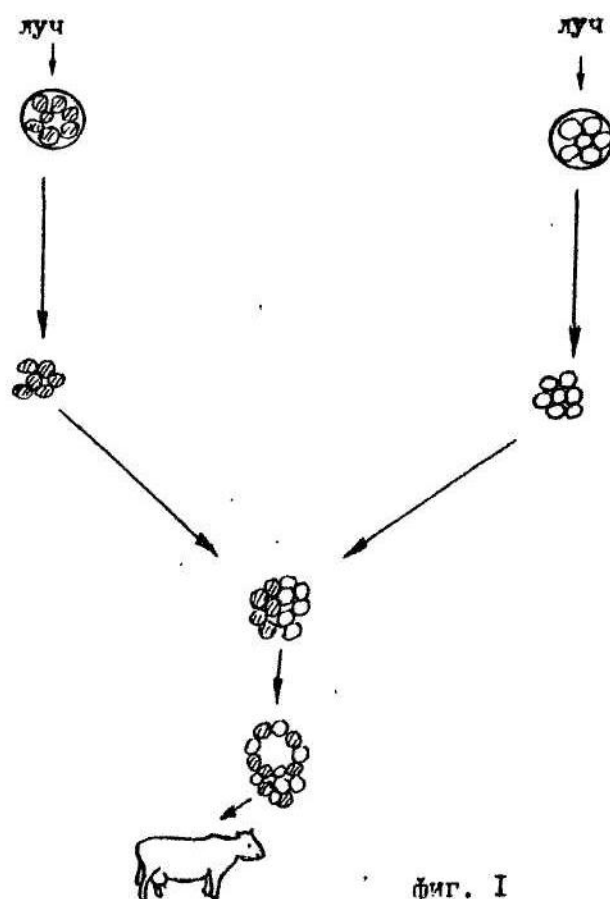
Таким образом, как видно из результатов экспериментов предложенный способ позволяет успешно получать химерные эмбрионы сельскохозяйственных животных, при наибольшем выходе жизнеспособных, среди существующих способов.

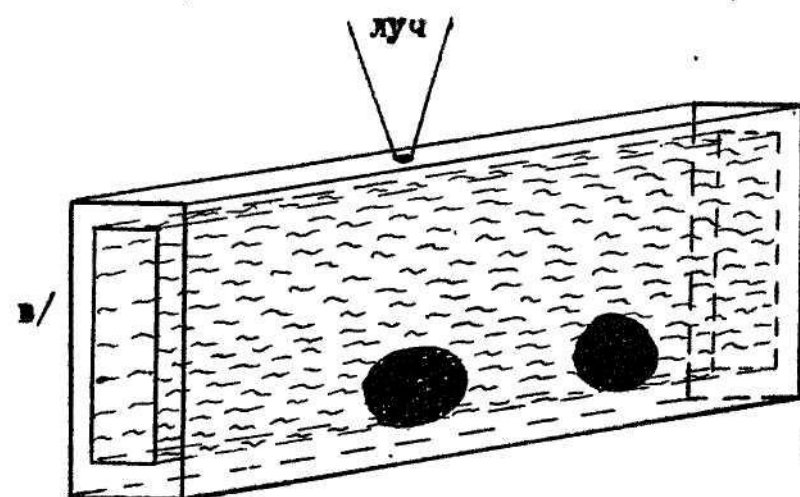
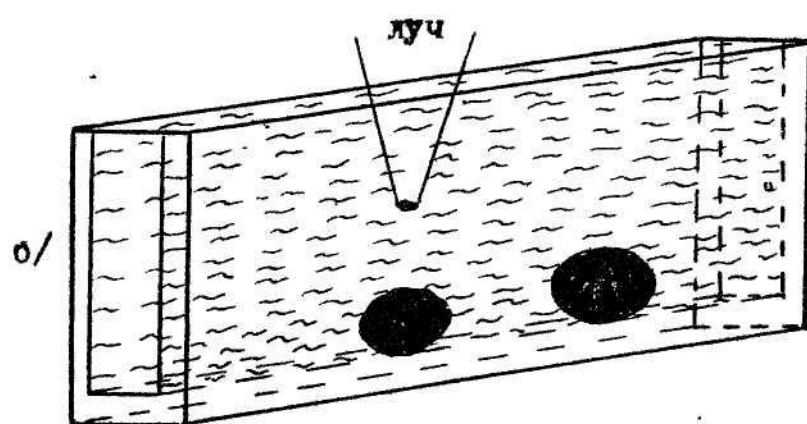
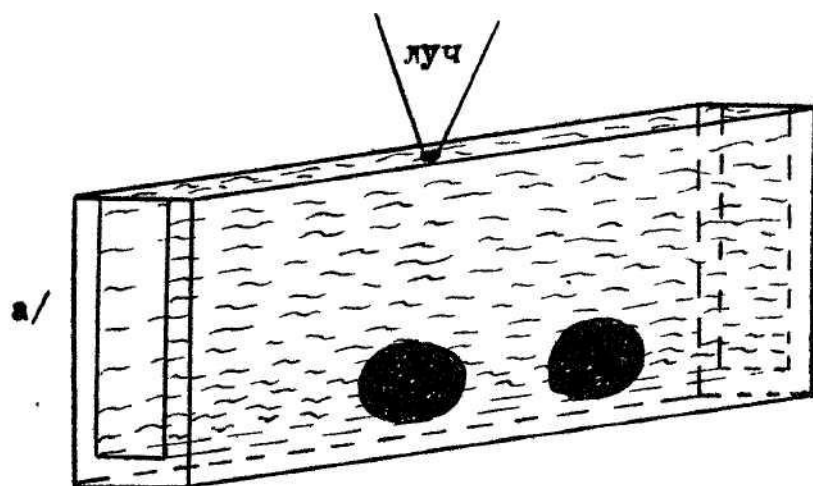
Пример 1. Луч лазера сфокусирован на поверхность канюли, в которой расположены эмбрионы, находящиеся на стадии развития - бластоцида. С помощью акустической волны, созданной лучом лазера, два генотипически различных эмбриона делим на две половинки. Далее в каждом эксперименте различные половинки различных эмбрионов соединяли, культивировали до образования бластоцисты и проводили морфологическую оценку полученных химерных эмбрионов. Таких экспериментов проводили 10 и каждый раз получали выход жизнеспособных химерных эмбрионов - около 70%.

Пример 2. Луч лазера сфокусирован в культуральную среду, в которой расположены эмбрионы, находящиеся на стадии развития - ранняя морула. С помощью акустической волны, созданной лучом лазера, два генотипически различных эмбриона делим на две половинки. Далее в каждом эксперименте различные половинки различных эмбрионов соединяли, культивировали до образования бластоциды и проводили морфологическую оценку полученных химерных эмбрионов. Таких экспериментов проводили 10 и каждый раз получали выход жизнеспособных химерных эмбрионов - около 80%.

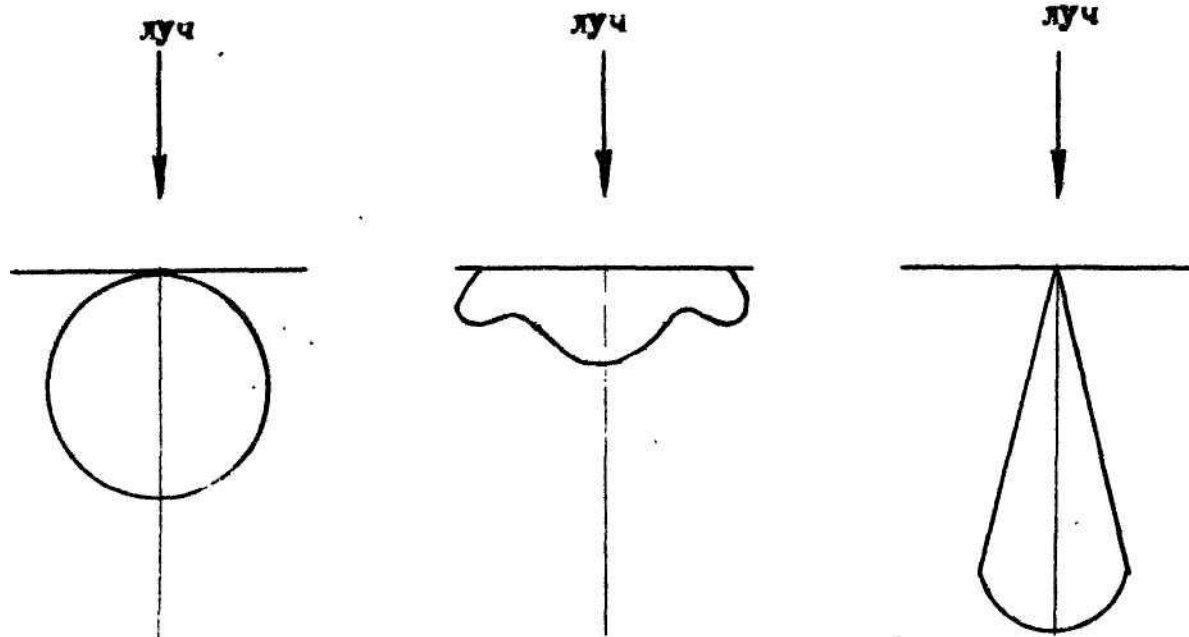
Пример 3. Луч лазера сфокусирован на поверхности культуральной среды, в которой расположены эмбрионы, находящиеся на стадии развития - ранняя бластоцида, поздняя морула. С помощью акустической волны, созданной лучом лазера, два генотипически различных эмбриона делим на две половинки. Далее в каждом эксперименте различные половинки различных эмбрионов соединяли, культивировали до образования бластоциды и проводили морфологическую оценку полученных химерных эмбрионов. Таких экспериментов проводили 10 и каждый раз получали выход жизнеспособных химерных эмбрионов - около 70%.

	№ эксперимента		
	1	2	3
Расположение фокус-ного пятна	Поверхность канюли	В культуральной среде	На поверхности культуральной среды
Степень развития эмбрионов	Бластоциста	Ранняя морула	Ранняя бластоциста, поздняя морула
Кол-во произведен. экспериментов	10	10	10
Кол-во генотипически различных эмбр. в каждом эксперименте	2	2	2
Кол-во полученных химерных эмбрионов	Более 2	Более 2	Более 2
Кол-во жизнеспособных химер. эмбрионов	70 %	80 %	70 %





фиг. 2



фиг. 3