



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86523** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
G01N 21/00

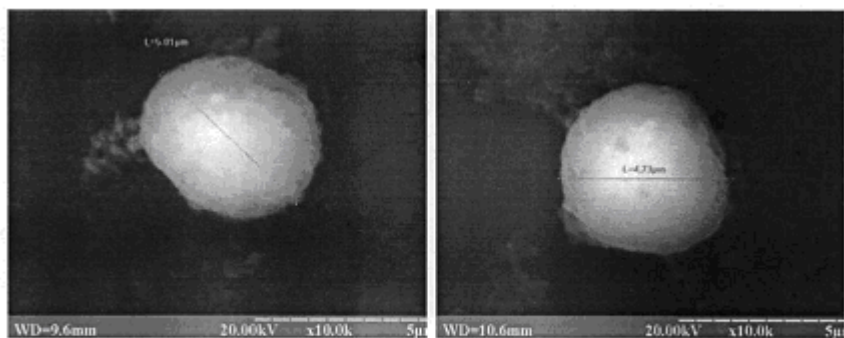
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2013 01324	(72) Винахідник(и):	Бергілевич Олександра Миколаївна (UA), Касянчук Вікторія Вікторівна (UA), Скляр Олександр Іванович (UA)
(22) Дата подання заявки:	04.02.2013	(73) Власник(и):	СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Кірова, 160, м. Суми, 40021 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.01.2014		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.01.2014, Бюл.№ 1		

(54) СПОСІБ ФІКСАЦІЇ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН МОЛОКА ФІКСАТОРОМ ТРУМПСА 4F:1G ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ УЛЬТРАСТРУКТУРИ ПІД РАСТРОВИМ ЕЛЕКТРОННИМ МІКРОСКОПОМ

(57) Реферат:

Спосіб фіксації соматичних клітин молока фіксатором Трумпса 4F:1G для дослідження їх ультраструктури під растровим електронним мікроскопом полягає у центрифугуванні сирого молока або секрету вимені корів протягом 5 хвилин при 3000 обертах для осадження соматичних клітин з наступною їх дво-триразовою обробкою фіксатором Трумпса 4F:1G та витримкою в різних концентраціях етилового спирту, причому як досліджуваний об'єкт є клітини молока, при цьому час фіксації зменшується до 1-2 годин.



Фіг. 1

UA 86523 U

Корисна модель належить до тваринництва, зокрема до ветеринарної медицини, і може бути використаний при дослідженні морфологічних характеристик соматичних клітин молока або секрету вимені корів під растровим електронним мікроскопом.

Аналогом даної корисної моделі є спосіб фіксації біологічних об'єктів, таких як тканини організму людини та тварини з використанням глутарового альдегіду для гістологічних досліджень. Глутаровий альдегід вважається найкращим фіксатором, так як він забезпечує збереженість морфологічної структури досліджуваних біологічних об'єктів та стабільність багатьох ферментів. Проте від використання глутарового альдегіду більша кількість ліпідів клітин тканин в досліджуваному зразку розчиняється та вимивається, тому для запобігання цьому необхідно проводити дофіксацію в тетраоксиді осмію [Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов/ под редакцией Д.С.Саркисова и Ю.Л. Перова/ М.: Медицина, 1996.-544 с.].

Прототипом даної корисної моделі є спосіб фіксації біологічних об'єктів (тканин організмів, окремих клітин (сперма), комах та інших багатоклітинних простих організмів) з використанням фіксатора Трумпса 4F:1G [McDowell, E.M., and B.F. Trump. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. Arch. Pathol. Lab. Med., 100:405-414].

Подібними ознаками з прототипом із заявленим способом є те, що для фіксації соматичних клітин молока використовували фіксатор Трумпса 4F:1G, який складається з 4 % формальдегіду, 1 % глутаральдегіду та фосфатно-буферного розчину, який наприкінці приготування повинен мати рН 7,2-7,4. Цей фіксатор стабілізує білкові клітинні компоненти та готує їх до зневоднення спиртами. Досліджувані зразки можна зберігати в фіксаторі Трумпса 4F:1G до 6 місяців за температури 4 °C [McDowell, E.M., and B.F. Trump. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. Arch. Pathol. Lab. Med., 100:405-414].

Відмінним ознаками прототипу від заявленого способу є те, що до цього часу фіксатор Трумпса 4F:1G застосовували лише для фіксації біологічних тканин з наступним приготуванням гістозрізів, а не для фіксації окремих соматичних клітин і, зокрема соматичних клітин молока чи секрету вимені, для дослідження під растровим (скануючим) електронним мікроскопом. Згідно з нашими дослідженнями, цей фіксатор добре зберігає морфологічну структуру зазначених клітин. Крім того, досліджувані біологічні об'єкти можуть зберігатися довготривалий час без змін їх морфологічних властивостей.

В основу корисної моделі поставлена задача: розробити спосіб фіксації соматичних клітин молока корів фіксатором Трумпса 4F:1G, для дослідження їх ультраструктури під растровим електронним мікроскопом.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

Сире молоко корів або секрет вимені корів в кількості 5 см³ центрифугують протягом 5 хвилин при 3000 обертах для осадження соматичних клітин. Надосадову рідину зливають і до осаду додають фіксатор Трумпса 4F:1G, який попередньо готують з таких компонентів: 86 см³ дистильованої води, 10 см³ 37-40 % формальдегіду, 4 см³ 25 % глутаральдегіду, 1,16 г NaH₂PO₄·H₂O та 0,27 г NaOH.

Після додавання фіксатора Трумпса 4F:1G проводять ретельне перемішування в пробірках до утворення рівномірної суспензії. Суспензію центрифугують протягом 5 хвилин при 3000 обертах для утворення концентрованого осаду із соматичних клітин. Зливають надосадову рідину і знову додають фіксатора Трумпса 4F:1G, перемішують, центрифугують і так роблять 2-3 рази. Осад, із соматичних клітин, який був отриманий вищезазначеним способом, відмивають фосфатним буфером від фіксатора Трумпса 4F:1G.

Після цього осад із соматичних клітин витримують в етиловому спирті за схемою: по 15 хвилин в 30 %, 50 %, 75 %, 95 %, 100 % спирті, а потім ще одну годину - в 100 % спирті. Після кожного витримування у спирті проводять центрифугування. Невелику кількість осаду із соматичних клітин, отриманого після останнього центрифугування, за допомогою препарувальної голки наносять на графітові "столики", висушують на повітрі, напилькують у вакуумній камері вуглем або золотом, досліджують в скануючому електронному мікроскопі.

Переваги способу, перш за все, полягають в тому, що його можна застосовувати для фіксації соматичних клітин молока або секрету вимені корів з метою дослідження їх під растровим електронним мікроскопом. По-друге, це досить швидкий спосіб фіксації соматичних клітин, так як використання фіксатора 4F:1G, зменшує час фіксації до 1-2 годин (на відміну від 3-4 годин при використанні лише глутарового альдегіду, що обов'язково повинно супроводжуватися дофіксацією), при цьому якість зображених об'єктів не погіршується. По-третє, при застосуванні фіксатора Трумпса 4F:1G добре зберігається структура соматичних клітин, що дає можливість їх добре вивчити та встановити їхні розміри. Крім того, цей спосіб не потребує дорогих реактивів та його можна застосовувати поряд з класичними методами

досліджень соматичних клітин під світловим мікроскопом, як такий що точно (адекватно) відображає найбільш важливі морфологічні характеристики досліджуваних об'єктів.

Корисна модель ілюструється наступними прикладами.

5 Приклад I. Вивчення форми та розмірів соматичних клітин, для фіксації яких використали фіксатор Трумпа 4F:1G на ультраструктурному рівні з використанням растрового електронного мікроскопа (фіг. 1). За використання запропонованого методу було встановлено форму соматичних клітин (округла форма) та розміри: діаметр від 4,5 до 5,5 мкм.

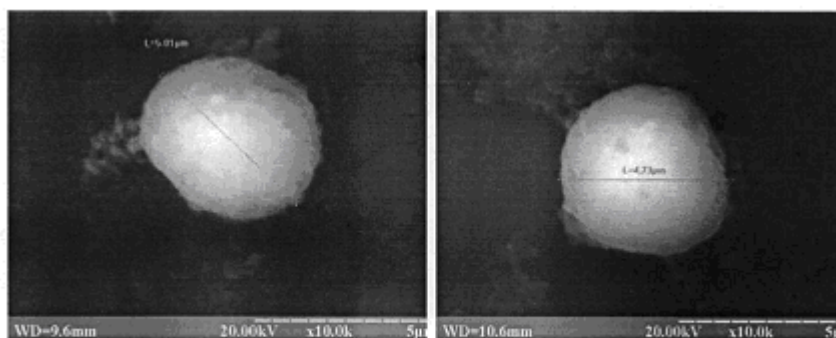
10 Приклад II. Вивчення стану поверхні соматичних клітин, для фіксації яких використали фіксатор Трумпа 4F:1G на ультраструктурному рівні з використанням растрового електронного мікроскопа (фіг. 2). За використання запропонованого методу було встановлено повний або частковий лізис соматичних клітин.

Як видно з наведених прикладів I-II, запропонований спосіб фіксації соматичних клітин з використанням фіксатора Трумпа 4F:1G точно відображає найбільш важливі морфологічні характеристики досліджуваних об'єктів.

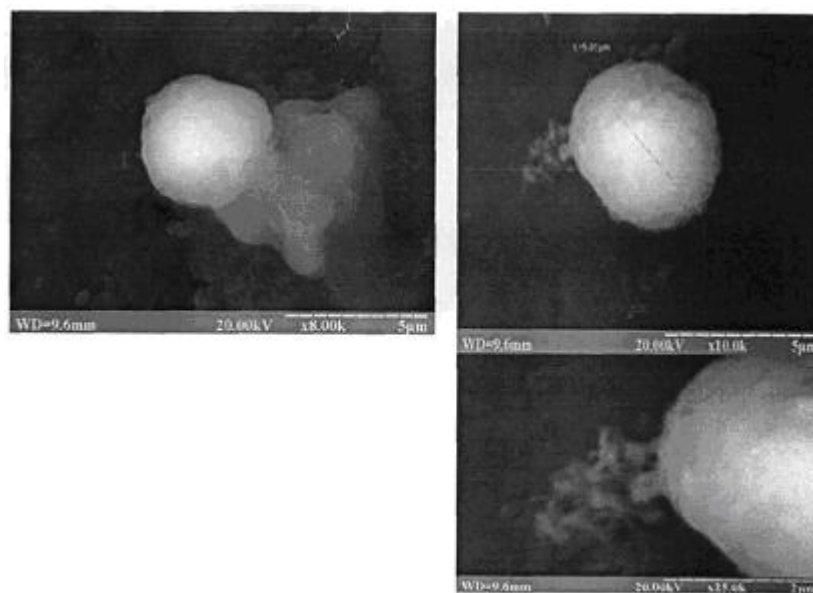
15

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб фіксації соматичних клітин молока фіксатором Трумпа 4F:1G для дослідження їх ультраструктури під растровим електронним мікроскопом, який полягає у центрифугуванні сирого молока або секрету вимені корів протягом 5 хвилин при 3000 обертах для осадження соматичних клітин з наступною їх дво-триразовою обробкою фіксатором Трумпа 4F:1G та витримкою в різних концентраціях етилового спирту, який **відрізняється** тим, що як досліджуваний об'єкт є клітини молока, при цьому час фіксації зменшується до 1-2 годин.



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601