



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **84110** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**G01N 33/48** (2006.01)  
**A61K 39/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: <b>u 2013 04587</b>	(72) Винахідник(и): <b>Глушко Юлія Миколаївна (UA), Тарасюк Сергій Іванович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>12.04.2013</b>	(73) Власник(и): <b>ІНСТИТУТ РИБНОГО ГОСПОДАРСТВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вул. Обухівська, 135, м. Київ, 03164 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.10.2013</b>	(74) Представник: <b>Колесник Наталія Леонідівна</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.10.2013, Бюл.№ 19</b>	

**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ МЕТАФАЗНИХ КЛІТИН ДЛЯ ПРИЖИТТЄВОГО ДОСЛІДЖЕННЯ КАРІОТИПУ КОРОПА**

**(57) Реферат:**

Спосіб отримання метафазних клітин для прижиттєвого дослідження каріотипу коропа передбачає відбір біологічного матеріалу з подальшим культивуванням в поживному середовищі, обробку гіпотонічним розчином, фіксування метильно-оцтовою сумішшю та приготування препарату методом розбитої краплі та фарбуванням барвником Гімза. Як біологічний матеріал використовують лімфоцити периферійної крові коропа, які культивують протягом 48 год. за температури 26 °С з додаванням 0,2 мл розведеного фітогемаглютиніну П (ФГА П) (з розрахунку 1 мг ФГА П/1 мл 0,6 % NaCl) та інактивованої сироватки крові від досліджуваної особи.

**UA 84110 U**



Корисна модель належить до галузі сільськогосподарського рибництва, зокрема до способів отримання метафазних клітин для прижиттєвого дослідження каріотипу риб, і може бути використана в рибницьких господарствах різних форм власності з метою повної інформативної оцінки генетичної структури стад коропа та підвищення ефективності селекційно-племінної роботи.

В Україні активно ведеться селекційно-племінна робота в коропівництві, проте дослідження хромосомного поліморфізму, мінливості каріотипу мають фрагментарний характер [Лобойко Ю.В. Еколого-цитогенетичний моніторинг при вирощуванні коропа в рибницьких ставах: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с-г. наук.: спец. 06.02.03 «Рибництво» / Ю.В. Лобойко. - К., 2002. - 18 с.].

На сьогоднішній день розроблено значну кількість способів дослідження каріотипу риб, проте всі вони вимагають або ін'єкціювання об'єктів колхіцином, або інкубування їх в басейнах з даним канцерогеном для накопичення метафазних клітин з подальшим вилученням органів лімфопоезу (селезінка, переднирка) та приготування препаратів. Так наприклад при дослідженні каріотипу рибам в черевну порожнину вводять відповідну кількість 0,005 % розчину колхіцину (з розрахунку 1 мл розчину на 100 г маси). Через дві години видаляють селезінку, печінку, далі тканини гомогенізують в розчині KCl. Після цього суспензію клітин гіпотонують, фіксують метильно-оцтовою сумішшю (3:1), готують препарати методом розбитої краплі та фарбують барвником Гімза [Бердышев Г.Д. Приготовление хромосомных препаратов из тканей растительных рыб. / Г.Д. Бердышев, В.В. Архипчук // Гидробиологический журнал АН УССР. - 1985. - Том XXI, № 1. - С. 21-30]. Дана методика дає можливість виявити лише незначну частину метафазних клітин, причому з невисокою якістю забарвлення хромосом.

Для аналізу каріотипів коропових риб також використовують ембріональні клітини [Васильев В.П. О триплоидии отдельных гибридов карпа с другими представителями семейства Cyprinidae / В.П. Васильев, А.П. Макеева, И.Н. Рябов // Генетика. - 1975. - № 8 - С. 49-56; Marian T. Comparative karyological studies on Chinese carps / T. Marian, Z. Krasznai // Aquaculture. - 1979. - Vol. 18, № 4. - P. 325-336]. Проте при застосуванні даної методики до коропових риб отримують метафазні пластинки низької якості. Також даний метод придатний лише для загальної біологічної характеристики виду, проте не дає можливості прослідкувати як будуть розвиватися коропи з тим чи іншим каріотипом.

Відносно проста методика приготування хромосомних препаратів з луски риб [Denton T.E. A technique for obtaining chromosomes from scaled epithelium of teleost fisher / T.E. Denton, W.M. Howell // Copeia. - 1969. - № 2. - P. 393-395], проте вона не дає можливості отримати метафазні пластинки достатньої якості, щоб говорити про специфіку каріотипу коропа.

При відпрацюванні методики цитогенетичного аналізу каріотипу тих чи інших видів риб складнощі виникають і під час вибору оптимальної концентрації колхіцину для ін'єкцій. В даній ситуації кращий спосіб накопичення клітин на стадії метафази - роботи не ін'єкцію, а витримувати рибу в 0,005-0,01 % розчині колхіцину протягом 6-7 год. Після інкубування риби у воді з колхіцином, за умови інтенсивної аерації, для досліджень використовують зяберні дуги з подальшою їх гіпотонією в 0,5 % розчині цитрату натрію та фіксацією в метильно-оцтовій суміші [Бердышев Г.Д. Приготовление хромосомных препаратов из тканей растительных рыб / Г.Д. Бердышев, В.В. Архипчук // Гидробиологический журнал АН УССР. - 1985. - Том XXI, № 1. - С. 21-30]. Проте якість препаратів дає можливість проаналізувати каріотип лише за кількістю хромосом.

Основними ж недоліками даних способів є те, що вони не дають можливості залишити об'єкти живими. Дані підходи абсолютно не припустимі при роботі з племінним матеріалом коропа рамчастої та лускатої порід, оскільки кількість особин в стадії значно обмежена.

В основу корисної моделі поставлена задача - розробка способу отримання метафазних клітин для прижиттєвого дослідження каріотипу коропа.

Позитивних результатів досягають шляхом культивування лімфоцитів периферійної крові в поживному середовищі з мітогеном (фітогемаглютинін П), що дає можливість отримати якісні препарати метафазних клітин.

Спосіб здійснюється наступним чином.

1. В лабораторії готують стерильний посуд (пеніцилінові флакони з пробками).

2. В стерильних умовах вносять 2,5 мл складного синтетичного середовища Хенкса 199.

3. На господарствах у риб з хвостової вени стерильним шприцом відбирають 2 мл периферійної крові, попередньо набравши в голку краплю гепарину для запобігання реакції аглютинації.

4. В стерильні флакони з середовищем Хенкса вносять від кожної особини окремо по 0,5 мл гепаринізованої периферійної крові, 0,05 мл стрептоміцину (0,1 мг/мл), 0,2 мл розведеного

фітогемаглютиніну П (ФГА П) (з розрахунку 1 мг ФГА П / 1 мл 0,6 % NaCl). Інші 1,5 мл периферійної крові вносять в сухі стерильні флакони.

5. Далі вміст флаконів з культурою клітин обережно перемішують і транспортують в сумці-холодильнику протягом доби за температури 10-15 °С.

6. В лабораторних умовах центрифугують гепаринізовану кров, відділяють плазму та інактивують її на водяній бані. Далі вносять по 0,5-0,7 мл інактивованої сироватки крові у флакони з культурою клітин відповідної особи, максимально дотримуючись умов стерильності.

7. Вміст флаконів обережно перемішують та ставлять в термостат за температури 26 °С на 48 год., щодоби обережно струшуючи в один і той же час.

8. Через 48 годин у флакони з культурою вводять 0,1 мл 0,02 % розчину колхіцину розведеного в 0,6 % NaCl, не дотримуючись умов стерильності.

9. Через 90-120 хвилин вміст флаконів переносять в центрифужні пробірки, додають в кожен по 5 мл 0,44 % розчину KCl та витримують протягом 20 хв. за кімнатної температури.

10. Культуру клітин центрифугують протягом 8 хв. при 1000 об./хв., зливають супернатант і додають 3-5 мл свіжоприготовленого холодного фіксуючого розчину (3 CH<sub>3</sub>OH : 1 CH<sub>3</sub>COOH), витримують 20 хв. у холодильнику та центрифугують. Далі зливають  $\frac{3}{4}$  супернатанту і додають стільки ж нового метильно-оцтового розчину, центрифугують. Процедуру повторюють тричі.

11. Осад ресуспендують та готують препарати метафазних лімфоцитів периферійної крові. Препарати готують методом розбитої краплі (скляною паличкою на знежирене, охолоджене предметне скло з висоти 25-30 см наносять суспензію клітин). Далі сушать препарати в термостаті за температури 26 °С.

12. Фарбування препаратів проводять 5 % розчином барвника Гімза по Романовському протягом 40-60 хв.

13. Отримані препарати метафазних клітин мікроскопіюють з іммерсією при збільшенні 10×100. Для одержання об'єктивних результатів аналізують не менше 20 метафазних клітин для кожної особи.

Використання даного способу дає можливість отримати достатню кількість високої якості метафазних клітин.

Приклад. Заявлений спосіб випробували в умовах повносистемного ставового господарства СГЦР "Поділля", розташованого в селищі Ярославка Летичівського району Хмельницької області.

Для досліджень каріотипу було відібрано 14 трирічок коропа племінного стада, з яких 7 особин лускатої та 7 рамчастої порід. Риби характеризувалися нормальним фізіологічним станом, який оцінювали за зовнішнім виглядом, морфометричними та гематологічними показниками.

З метою максимального наближення умови культивування лімфоцитів коропа *in vitro* до умов в межах організму риб та зменшення витрат на поживне середовище було запропоновано додавати в його склад інактивовану сироватку досліджуваної особи. Експериментальним шляхом було встановлено, що для отримання якісних хромосомних препаратів оптимальна температура культивування лімфоцитів периферійної крові коропа становила 26 °С. Для активної проліферації лімфоцитів використовували розведений фітогемаглютинін П (з розрахунку 1 мг ФГА П / 1 мл 0,6 % NaCl). Для отримання якісного розподілу хромосом на метафазній пластинці використовували 0,44 % KCl.

Заявленим способом у групах коропа рамчастої та лускатої порід отримано хромосомні препарати високої якості. В результаті досліджень встановлено каріотип кожної особи та виявлено кількісний хромосомний поліморфізм. Диплоїдне число хромосом в групі рамчастого коропа коливалось в межах 2n=98-102 (табл. 1).

Даним способом вдалося не лише проаналізувати каріотип за кількістю хромосом, але і протипувати їх відповідно до розміщення центромери. Для визначення хромосомної формули було використано загальноприйняту в каріології риб класифікацію хромосом А. Левана [Levan A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes / A. Levan, K. Fredga, A.A. Sandberg // Hereditas. - 1964. - Vol. 52. - P. 201-220]. Досліджуючи рівень хромосомного поліморфізму, встановлено значні розбіжності за будовою хромосом в межах групи рамчастого коропа.

Таблиця 1

## Характеристика каріотипу української рамчастої породи коропа

№ п/п	№ особини	2n	Тип хромосом			NF
			М	СМ	СТ, А	
1	1	102	10	32	60	144
2	2	100	12	32	56	144
3	3	98	14	36	48	148
4	4	100	12	36	52	148
5	5	100	12	34	54	146
6	7	100	12	34	54	146
7	9	98	14	34	50	146

Примітки тут і в табл. 2:

1. М - метацентричні хромосоми; СМ - субметацентричні хромосоми; СТ - субтелоцентричні хромосоми; А - акроцентричні хромосоми.

2. NF - кількість хромосомних плечей.

- 5 Під час досліджень каріотипу лускатої породи коропа було встановлено, що диплоїдне число хромосом, характерне для даних особин, знаходилося в межах  $2n=98-100$  (табл. 2). Порівнюючи каріотиби лускатих коропів з диплоїдним числом  $2n=100$  за розміщенням центромери, було встановлено хромосомний поліморфізм. За плечовим індексом (NF) в групі лускатої коропа з диплоїдним набором хромосом  $2n=100$  дане значення знаходилося в межах від 142 до 146.

Таблиця 2

## Характеристика каріотипу української лускатої породи короп

№ п/п	№ особини	2n	Тип хромосом			NF
			М	СМ	СТ, А	
1	1	98	12	30	56	140
2	2	100	12	30	58	142
3	3	100	12	34	54	146
4	4	98	12	30	56	140
5	6	100	10	32	58	142
6	7	100	12	34	54	146
7	8	100	10	34	56	144

10

В групі лускатої коропа було виявлено дві особини з диплоїдним набором хромосом  $2n=98$ , які мали ідентичну хромосомну формулу (табл. 2).

- 15 Отже, заявлений нами спосіб забезпечує одержання високоякісних препаратів метафазних хромосом, при цьому об'єкти селекційно-племінної справи не тільки залишаються живими, але й зазнають мінімальної шкоди.

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 20 Спосіб отримання метафазних клітин для прижиттєвого дослідження каріотипу коропа, що передбачає відбір біологічного матеріалу з подальшим культивуванням в поживному середовищі, обробку гіпотонічним розчином, фіксування метильно-оцтовою сумішшю та приготування препарату методом розбитої краплі та фарбуванням барвником Гімза, який відрізняється тим, що як біологічний матеріал використовують лімфоцити периферійної крові коропа, які культивують протягом 48 год. за температури  $26^{\circ}\text{C}$  з додаванням 0,2 мл розведеного фітогемаглютиніну П (ФГА П) (з розрахунку 1 мг ФГА П/1 мл 0,6 % NaCl) та інактивованої сироватки крові від досліджуваної особини.
- 25

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

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