



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003104595/13, 18.02.2003

(24) Дата начала действия патента: 18.02.2003

(45) Опубликовано: 10.12.2004

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SU 818578 A1, 07.04.1981. SU 591164 A1, 02.02.1976. SU 786947 A1, 15.12.1980.

Адрес для переписки:

141821, Московская обл., Дмитровский р-н,
 пос. Рыбное, ВНИИПРХ, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Цветкова Л.И. (RU),
 Докина О.Б. (RU),
 Пронина Н.Д. (RU),
 Миленко В.А. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

Федеральное государственное унитарное
 предприятие "Всероссийский научно-
 исследовательский институт пресноводного
 рыбного хозяйства" (RU)

(54) СПОСОБ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ СПЕРМЫ КАРПОВЫХ РЫБ

(57) Реферат:

Изобретение относится к рыбной промышленности. В качестве защитного раствора используют водный раствор хлорида натрия и сахарозы, в который добавляют криопротекторы этиленгликоль и метанол. Смесь спермы с защитным раствором замораживают в три этапа. Компоненты защитного раствора берут в следующем соотношении, мас. %: хлорид натрия 0,2-0,5; сахароза 0,05-0,15; этиленгликоль 18-20; метанол 24-25; дистиллированная вода -

остальное. Замораживание спермы осуществляют от 5 до -15°C со скоростью 1-2°C/мин, от -15 до -70°C со скоростью 15-20°C/мин, а затем плавно погружают в жидкий азот. Способ позволяет повысить сохранность оплодотворяющей способности спермы при криоконсервации за счет введения в защитный раствор более эффективного состава криопротекторов, а также повысить производительность замораживания за счет простоты и удобства приготовления защитного раствора. 2 з.п. ф-лы, 4 табл.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 241 324** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.⁷ **A 01 D 19/02, A 01 K 61/00**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2003104595/13, 18.02.2003**

(24) Effective date for property rights: **18.02.2003**

(45) Date of publication: **10.12.2004**

Mail address:

**141821, Moskovskaja obl., Dmitrovskij r-n,
pos. Rybnoe, VNIIPRKh, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Tsvetkova L.I. (RU),
Dokina O.B. (RU),
Pronina N.D. (RU),
Milenko V.A. (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe
predpriyatie "Vserossijskij nauchno-
issledovatel'skij institut presnovodnogo
rybnogo khozajstva" (RU)**

(54) **METHOD FOR CRYOGENIC PRESERVATION OF CARP FISH SPERM**

(57) Abstract:

FIELD: fish industry.

SUBSTANCE: method involves using preservative solution, such as aqueous solution of sodium chloride and saccharose; adding cryogenic preservatives, such as ethylene glycol and methanol; freezing mixture of sperm and preservative solution in three stages; using preservative solution components in the following ratio, wt%: sodium chloride 0.2-0.5; saccharose 0.05-0.15; ethylene glycol 18-20; methanol 24-25; distilled water the balance; freezing sperm to

temperature of from 5⁰C to -15⁰C at freezing rate of 1-2⁰C/min, to temperature of from -15⁰C to -70⁰C at freezing rate of 15-20⁰C/min, with following immersing of sperm into liquid nitrogen.

EFFECT: increased retention of impregnation capacity of sperm upon cryogenic preservation owing to introducing into preservative solution of more effective cryogenic preservatives and increased freezing efficiency owing to simplified and convenient process for preparing of preservative solution.

3 cl, 4 tbl

RU 2 241 324 C2

RU 2 241 324 C2

Изобретение относится к рыбной промышленности и может быть использовано в искусственном разведении рыб, преимущественно карповых, при создании банка генов с целью сохранения биоразнообразия.

Известны способы криоконсервации спермы карпа в гранулах с использованием для разбавления спермы растворов солей неорганических кислот с добавлением в качестве криопротекторов диметилацетамида и желтка куриного яйца (Babiak I., Glogowski J., Brzuska E., Szumiec J., Adamek J. Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyphnus carpio* L. // *Aquacult. Res.* - 1997. - V. 28, №7. - P.567-571) и в соломинках с применением диметилсульфоксида как криопротектора, добавленного в раствор солей (Linhart O., Rodina M., Cosson J. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos // *Cryobiology.* - 2000. - V. 41. - P.241-250).

Однако используемые в качестве криопротекторов вещества в этих способах консервации недостаточно эффективны. Кроме того, замораживание спермы в гранулах приводит к снижению качества спермы за счет ее окисления на поверхности гранул во время хранения. Использование указанных способов обеспечивает лишь 60-70% оплодотворения икры размороженной спермой.

Известен способ криоконсервирования спермы лососевых рыб, в котором используются криопротекторы метанол и желток, добавляемые в защитный раствор сложного состава, содержащий соли неорганических кислот, HEPES, бычий сывороточный альбумин. Замораживание спермы осуществляется в соломинках (Cryopreservation in Aquatic Species. Ed. T.R.Tiersch and P.M.Mazik. World Aquaculture Society. *Advances in World Aquaculture.* - Baton Rouge, Louisiana, USA, 2000. -V.7. - P.91-100).

Недостатком этого способа является трудоемкость приготовления и неудобство работы с многокомпонентным раствором. Кроме того, этот способ не позволяет получать достаточно высокие уровни оплодотворения икры дефростированной спермой.

Наиболее близким способом того же назначения к заявленному изобретению является способ консервирования спермы рыб, преимущественно карпа, предусматривающий разбавление спермы защитным раствором, приготовленным на трис-HCl буфере, содержащим поливиниловый спирт, йодид серебра и маннитол с использованием в качестве криопротектора этиленгликоля, и последующее ступенчатое замораживание. (Авт. свид. №818578, кл. А 01 К 61/00, 1981).

В данном способе защитный раствор содержит компоненты, практически не оказывающие влияния на сохранность и оплодотворяющую способность размороженной спермы. Применение этого способа дает около 50% оплодотворения икры деконсервированной спермой. Приготовление многокомпонентного раствора требует больших затрат времени, что замедляет технологический процесс криоконсервации.

Настоящее изобретение направлено на повышение сохранности оплодотворяющей способности спермы при криоконсервации за счет введения в защитный раствор более эффективного состава криопротекторов, а также на повышение производительности замораживания за счет простоты и удобства приготовления защитного раствора.

Указанный технический результат достигается тем, что в известном способе криоконсервирования спермы карповых рыб, предусматривающем разбавление спермы перед замораживанием защитным раствором, содержащим криопротектор этиленгликоль, и последующее ступенчатое замораживание в парах жидкого азота, особенностью заключается в том, что сперму разбавляют водным раствором хлорида натрия и сахарозы, а в качестве дополнительного криопротектора в раствор вводят метанол.

При этом предпочтительно компоненты защитного раствора брать в следующем соотношении, мас. %: хлорид натрия 0,2-0,5; сахароза 0,05-0,15; этиленгликоль 18-20; метанол 24-25; дистиллированная вода - остальное.

Замораживание целесообразно осуществлять в три этапа: от 5 до -15°C со скоростью 1-2°C/мин, от -15 до -70°C со скоростью 15-20°C/мин, а затем плавно погружать в жидкий азот.

Использование в защитном растворе двух криопротекторов сходного действия (проникающих в клетку через мембрану) - этиленгликоля и метанола - обусловлено тем, что благодаря разному химическому строению и разному размеру их молекул они взаимодействуют с разными структурами клетки, чем и достигается больший защитный эффект, действие которого, возможно, продлевается из-за разной скорости проникновения этих веществ через мембрану.

Использование простой основы защитного раствора с экспериментально подобранным содержанием хлорида натрия и сахарозы предотвращает обезвоживание клеток из-за экзоосмоса, снимает осмотическое напряжение на мембранах, что в совокупном воздействии с предлагаемым составом криопротекторов обеспечивает почти 100%-ную сохранность сперматозоидов в процессе криоконсервации. Простота и удобство приготовления защитного раствора снижает затраты времени, что позволяет существенно повысить производительность технологического процесса криоконсервации.

Рекомендуемые пределы содержания компонентов защитного раствора и режимы замораживания установлены в процессе многочисленных экспериментов. Таким образом, совокупность отличительных признаков описываемого способа обеспечивает достижение указанного технического результата.

Проведенный анализ уровня техники позволил установить, что не обнаружен источник, характеризующийся признаками, тождественными всем существенным признакам заявленного изобретения, следовательно, предлагаемое изобретение соответствует условию "новизна".

Дополнительный поиск известных решений показал, что заявленное изобретение не вытекает для специалиста явным образом из известного уровня техники, поскольку в качестве криопротекторов используются два вещества, совокупное действие которых проявляет новые свойства с точки зрения воздействия на биологические объекты. Следовательно, заявленное изобретение соответствует условию "изобретательский уровень".

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения с получением вышеуказанного технического результата.

Способ осуществляют следующим образом.

Защитный раствор для криоконсервации спермы карповых рыб готовят непосредственно перед применением, растворяя в дистиллированной воде в соответствующих концентрациях, мас. %: хлорид натрия 0,2-0,5; сахарозу 0,05-0,15; этиленгликоль 18-20; метанол 24-25; дистиллированная вода - остальное. Сперму охлаждают до 10-15°C в холодильнике в течение 30 мин. К охлажденной сперме при непрерывном перемешивании добавляют охлажденный до той же температуры защитный раствор в объемном соотношении 1:1. Суспензию спермы в защитном растворе оставляют на эквilibрацию в течение 30 мин при температуре 0-5°C. Разбавленную сперму разливают в хлорвиниловые ампулы емкостью 0,5-1,5 см³ и устанавливают на диск замораживателя. Замораживание спермы проводят путем медленного опускания к поверхности жидкого азота ампул со спермой, установленных на диск замораживателя, снабженного датчиком температуры и самописцем, регистрирующим температуру спермы в ампуле. Сперму замораживают по следующей программе:

I этап: от +5 до -15°C со скоростью 1-2°C/мин,

II этап: от -15 до -70°C со скоростью 15-20°C/мин,

III этап: плавное погружение в жидкий азот.

Размораживание спермы осуществляют, извлекая ампулы из жидкого азота и помещая их в водяную баню или устройство для размораживания МТА-70 с температурой 38-40°C, где встряхивают в течение 20-40 с до появления в них жидкой фазы.

В размороженных образцах определяют количество подвижных сперматозоидов. Непосредственно после этого размороженную сперму удовлетворительного качества используют для осеменения икры. Для активации размороженных сперматозоидов используют 0,07-0,1%-ный раствор карбоната натрия. Для получения максимального

оплодотворения икры сперму берут из расчета $(0,1-1)10^6$ спермиев на икринку. Осемененную икру обесклеивают и инкубируют в аппаратах Вейса согласно технологии воспроизводства карповых рыб.

Сущность изобретения иллюстрируется примерами.

5 Пример 1.

В криобанке ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства была криоконсервирована смесь спермы сазанов при различном составе защитных растворов. Охлажденные до 15°C образцы спермы разбавляли в соотношении 1:1 защитными растворами, охлажденными до той же температуры. Полученную суспензию эквilibрировали при 5°C в течение 30 мин, 10 затем разливали в хлорвиниловые ампулы объемом 1,5 мл и замораживали по трехступенчатой программе: от $+5$ до -15°C со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, от -15 до -70°C со скоростью $20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, затем плавно погружали в жидкий азот. Размораживание ампул осуществлялось в приборе МТА-70 при температуре 40°C . Эффективность 15 криоконсервации оценивали по оплодотворению икры размороженной спермой. Опыты ставились в лабораторных условиях на чашках Петри. В качестве активатора движения дефростированной спермы использовался 0,1%-ный раствор карбоната натрия. Зависимость результатов оплодотворения икры сазана размороженной спермой от состава защитного раствора представлена в табл.1.

20 Во всех опытах были достигнуты высокие проценты оплодотворения, что определялось действенностью технологии замораживания образцов спермы и качественным составом защитного раствора. В опытах №№2, 3, 4, 8, 9, где количественный состав защитных растворов соответствовал рекомендуемому в заявляемом изобретении пределам содержания компонентов, уровень оплодотворения икры криоконсервированной спермой 25 даже превышал уровень оплодотворения свежей спермой в контроле, что свидетельствует о высокой эффективности примененного способа криоконсервации, позволяющего сохранять жизнеспособность и высокую оплодотворяющую способность сперматозоидов.

Пример 2.

30 В производственных условиях ЦЭБ "Якоть" при ВНИИПРХ было проведено осеменение промышленных партий икры сазана спермой, взятой от одного производителя и криоконсервированной способом, описанным в примере 1, за исключением того что защитный раствор содержал, мас. %: хлорид натрия - 0,35; сахароза - 0,1; этиленгликоль - 18; метанол - 24; дистиллированная вода - остальное. Размораживание ампул проводилось в водяной бане при температуре 38°C . Инкубация оплодотворенной икры 35 осуществлялась в аппаратах Вейса. Результаты оплодотворения партий икры по 100 г разным количеством размороженной спермы сазана представлены в табл.2.

Оплодотворение икры дефростированной спермой во всех случаях превышало оплодотворение свежей спермой в контроле. Полученные результаты подтверждают высокую эффективность заявленного способа криоконсервации спермы и свидетельствуют 40 о возможности его успешного применения для замораживания спермы и оплодотворения икры в промышленных масштабах.

Пример 3.

В лаборатории криобиологии ВНИИПРХ была криоконсервирована сперма карпа (одного самца) заявляемым способом. Охлажденные до 10°C образцы спермы разбавляли в 45 соотношении 1:1 защитными растворами с различным количественным составом компонентов при той же температуре. Полученную суспензию после 30-минутной эквilibрации при 2°C разливали в ампулы объемом 0,5 мл и замораживали по программе, описанной в примере №1. Размораживание ампул проводили в приборе МТА-70 при температуре 38°C . Непосредственно после оттаивания сперма использовалась для 50 осеменения икры в лабораторных условиях на чашках Петри. Для активации оттаявшей спермы использовали 0,07%-ный раствор карбоната натрия. Зависимость результатов оплодотворения икры карпа размороженной спермой от состава защитных растворов представлена в табл.3.

Сперма, криоконсервированная в защитных растворах с содержанием компонентов в

рекомендуемых заявляемым способом пределах (опыты №№1, 4, 6, 7), оплодотворила икру практически одинаково со свежей спермой в контроле.

Пример 4.

5 Криоконсервация смеси спермы карпов разных пород с использованием защитных растворов с различным количественным составом компонентов была проведена в лаборатории криобиологии ВНИИПРХ. Разбавление и замораживание образцов спермы проводилось аналогично тому, как было описано в примере 3.

Размораживание ампул со спермой осуществлялось в водяной бане при температуре 40 °С. Для активации оттаявшей спермы использовался 0,1% раствор карбоната натрия. 10
Опыты по оплодотворению икры размороженной спермой проведены на чашках Петри. Результаты оплодотворения икры карпа представлены в табл.4.

Эксперимент показал высокую воспроизводимость результатов оплодотворения икры дефростированной спермой и выклева личинок при рекомендуемом содержании компонентов защитного раствора (опыты 1-8).

15 Приведенные примеры иллюстрируют высокую эффективность криоконсервирования спермы рыб заявляемым способом, обеспечивающим выживаемость и высокую оплодотворяющую способность сперматозоидов.

Таким образом, изложенные выше сведения свидетельствуют о выполнении при использовании заявленного изобретения следующей совокупности условий:

- 20 - способ криоконсервирования спермы рыб по заявленному изобретению предназначен для использования в промышленности, в частности, для криоконсервации спермы карповых рыб с введением в защитный раствор криопротекторов, обеспечивающих выживаемость и высокую оплодотворяющую способность размороженных сперматозоидов;
- 25 - для заявленного способа в том виде, как он охарактеризован в независимом пункте изложенной формулы изобретения, подтверждена возможность его осуществления с помощью описанных в заявке средств и методов.

Следовательно, заявленное изобретение соответствует условию "промышленная применимость".

30

35

40

45

50

Таблица 1
Зависимость результатов оплодотворения икры сазана размороженной спермой от
состава защитного раствора

5

10

15

20

25

30

35

40

45

| № опыта | Содержание компонентов защитного раствора, % | | | | | Оплодотворение икры сазана размороженной спермой | |
|--------------------------|---|----------|------------------------|--------------|----------------------------|--|--------------------|
| | NaCl | сахароза | эти- ленгли коль | мета- нол | дистиллиро- ванная вода | % оплодо- творения | % от кон- троля |
| 1 | 0,1 | 0,1 | 18 | 24 | до 100 | 80,5 | 82,9 |
| 2 | 0,2 | 0,1 | 18 | 24 | до 100 | 97,5 | 100,4 |
| 3 | 0,35 | 0,1 | 18 | 24 | до 100 | 98,3 | 101,2 |
| 4 | 0,5 | 0,1 | 18 | 24 | до 100 | 99,1 | 102,1 |
| 5 | 0,6 | 0,1 | 18 | 24 | до 100 | 94,2 | 97,0 |
| 6 | 0,35 | 0,03 | 18 | 24 | до 100 | 90,8 | 93,5 |
| 7 | 0,35 | 0,2 | 18 | 24 | до 100 | 84,4 | 86,9 |
| 8 | 0,35 | 0,15 | 18 | 24 | до 100 | 97,7 | 100,6 |
| 9 | 0,4 | 0,1 | 18 | 24 | до 100 | 100 | 103,0 |
| 10 | 0,35 | 0,1 | 16 | 24 | до 100 | 93,3 | 96,1 |
| 11 | 0,35 | 0,1 | 21 | 24 | до 100 | 96,2 | 99,1 |
| 12 | 0,35 | 0,1 | 18 | 23 | до 100 | 96,8 | 99,7 |
| 13 | 0,35 | 0,1 | 18 | 26 | до 100 | 96,5 | 99,4 |
| Контроль (свежая сперма) | | | | | | 97,1 | - |

50

Результаты оплодотворения икры сазана размороженной спермой в промышленных условиях

5

условиях

10

15

20

25

30

35

40

45

50

| № опыта | Количество размороженной спермы, мл | Оплодотворение икры сазана размороженной спермой, % |
|----------|-------------------------------------|---|
| 1 | 3,5 | 87,4 |
| 2 | 7,5 | 90,0 |
| 3 | 15 | 92,6 |
| 4 | 20 | 92,6 |
| Контроль | - | 62,0 |

Зависимость результатов оплодотворения икры карпа размороженной спермой от
состава защитных растворов

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

| № опыта | Содержание компонентов защитного раствора, % | | | | | Оплодотворение икры карпа размороженной спермой | |
|--------------------------|--|--------|---------------|---------|-----------------------|---|---------------|
| | NaCl | сахара | этиленгликоль | метанол | дистиллированная вода | % оплодотворения | % от контроля |
| 1 | 0,35 | 0,1 | 18 | 24 | до 100 | 91,2 | 98,1 |
| 2 | 0,1 | 0,1 | 18 | 24 | до 100 | 20,6 | 22,2 |
| 3 | 0,7 | 0,1 | 18 | 24 | до 100 | 88,2 | 94,8 |
| 4 | 0,25 | 0,05 | 18 | 24 | до 100 | 91,9 | 98,8 |
| 5 | 0,35 | 0,25 | 18 | 24 | до 100 | 85,0 | 91,4 |
| 6 | 0,5 | 0,1 | 18 | 24 | до 100 | 92,9 | 99,9 |
| 7 | 0,4 | 0,12 | 18 | 24 | до 100 | 91,2 | 98,1 |
| 8 | 0,35 | 0,1 | 10 | 10 | до 100 | 71,5 | 76,9 |
| 9 | 0,35 | 0,1 | 20 | 20 | до 100 | 80,5 | 86,6 |
| 10 | 0,35 | 0,1 | 15 | 25 | до 100 | 89,6 | 96,3 |
| 11 | 0,35 | 0,1 | 20 | 30 | до 100 | 81,1 | 87,2 |
| Контроль (свежая сперма) | | | | | | 93,0 | - |

Зависимость результатов оплодотворения икры карпа размороженной смесью спермы карпов от состава защитных растворов

5

10

15

20

25

30

35

| № опыта | Содержание компонентов защитного раствора, % | | | | | Оплодотворение икры карпа размороженной спермой | | Выклев личинок (% от оплодотворения) |
|--------------------------|--|----------|---------------|---------|-----------------------|---|---------------|--------------------------------------|
| | NaCl | сахароза | этиленгликоль | метанол | дистиллированная вода | % оплодотворения | % от контроля | |
| 1 | 0,2 | 0,05 | 18 | 24 | до 100 | 88,6 | 99,9 | 95,7 |
| 2 | 0,4 | 0,05 | 18 | 24 | до 100 | 93,9 | 105,7 | 93,5 |
| 3 | 0,4 | 0,15 | 18 | 24 | до 100 | 90,0 | 101,5 | 95,2 |
| 4 | 0,3 | 0,15 | 18 | 24 | до 100 | 89,2 | 100,6 | 97,3 |
| 5 | 0,5 | 0,1 | 18 | 24 | до 100 | 95,1 | 107,2 | 98,7 |
| 6 | 0,5 | 0,05 | 18 | 24 | до 100 | 94,4 | 106,4 | 100,0 |
| 7 | 0,3 | 0,1 | 20 | 24 | до 100 | 89,5 | 100,9 | 97,4 |
| 8 | 0,3 | 0,1 | 18 | 25 | до 100 | 94,1 | 106,1 | 95,8 |
| 9 | 0,3 | 0,1 | 22 | 25 | до 100 | 71,6 | 80,7 | 94,8 |
| Контроль (свежая сперма) | | | | | | 88,7 | - | 97,9 |

Формула изобретения

1. Способ криоконсервирования спермы карповых рыб, предусматривающий разбавление спермы перед замораживанием защитным раствором, содержащим в качестве криопротектора этиленгликоль, и последующее ступенчатое замораживание в парах жидкого азота, отличающийся тем, что сперму разбавляют водным раствором хлорида натрия и сахарозы, а в качестве дополнительного криопротектора в раствор вводят метанол.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что компоненты защитного раствора берут в следующем соотношении, мас. %:

Хлорид натрия 0,2-0,5

Сахароза 0,05-0,15

Этиленгликоль 18-20

50 Метанол 24-25

Дистиллированная вода Остальное

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что замораживание осуществляют в три этапа: от 5 до -15°C со скоростью 1-2°C/мин, от -15 до -70°C со скоростью 15-20°C/мин, а затем

плавно погружают в жидкий азот.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50