



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2009115035/12, 20.04.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.04.2009

(45) Опубликовано: 20.09.2010 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2317703 C1, 27.02.2008. RU 2241324 C2,
10.12.2004. CN 1600097 A, 30.03.2005. CN
101161064 A, 16.04.2008.Адрес для переписки:
414025, г.Астрахань, ул. Татищева, 16, ФГОУ
ВПО АГТУ, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Пономарева Елена Николаевна (RU),
Тихомиров Андрей Михайлович (RU),
Богатырева Мария Михайловна (RU),
Болонина Наталья Владимировна (RU),
Джаригазов Ерболат Сисенгалиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
Астраханский государственный технический
университет (ФГОУ ВПО АГТУ) (RU),
Южный научный центр Российской
академии наук (ЮНЦ РАН) (RU)(54) СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК ОСЕТРОВЫХ РЫБ
ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к рыбной промышленности и может использоваться при искусственном воспроизводстве ценных видов рыб, в частности осетровых, а также для создания криобанков с образцами генетического материала. Способ повышения выживаемости половых клеток осетровых рыб при криоконсервации включает разбавление спермы протектором, эквilibрацию, замораживание ступенчатым режимом, оттаивание. Новым является то, что

непосредственно перед эквilibрацией проводят стимулирование прямоугольным электрическим сигналом частотой 20 герц при амплитуде раздражителя 150 Мв в течение 1 минуты, а выведение протектора из клеток после дефростации с помощью раствора NaCl (6,5 г/л) в соотношении 1:1 проводят в течение 7 минут. Технический результат, достигаемый заявленным изобретением, состоит в повышении качества дефростированной спермы осетровых рыб. 1 табл.

RU 2 399 201 C1

RU 2 399 201 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A01K 61/00 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2009115035/12, 20.04.2009**

(24) Effective date for property rights:
20.04.2009

(45) Date of publication: **20.09.2010 Bull. 26**

Mail address:

**414025, g.Astrakhan', ul. Tatishcheva, 16, FGOU
VPO AGTU, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Ponomareva Elena Nikolaevna (RU),
Tikhomirov Andrej Mikhajlovich (RU),
Bogatyreva Marija Mikhajlovna (RU),
Bolonina Natal'ja Vladimirovna (RU),
Dzharigazov Erbolat Sisengalievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe obrazovatel'noe
uchrezhdenie vysshego professional'nogo
obrazovanija Astrakhanskij gosudarstvennyj
tehnicheskij universitet (FGOU VPO AGTU)
(RU),
Juzhnyj nauchnyj tsentr Rossijskoj akademii nauk
(JuNTs RAN) (RU)**

(54) METHOD OF IMPROVEMENT OF SURVIVAL RATE OF GERMINAL CELLS OF STURGEONS AT CRYOPRESERVATION

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: invention relates to the fishing industry and can be used for artificial reproduction of valuable fish species, in particular the sturgeons, as well as to create cryobanks with samples of genetic material. Method of improvement of survival rate of germinal cells of sturgeons at cryopreservation includes sperm dilution with protector, equilibration, freezing with step regime,

thawing. What is new is that just before the equilibration a rectangular electrical signal stimulating is carried out with frequency of 20 hertz with an amplitude of stimulus of 150 mV for 1 min, and removing the protector from the cells after defrosting with a solution of NaCl (6.5 g/l) in a ratio 1:1 is held for 7 minutes.

EFFECT: improvement of quality of defrosted sperm of sturgeons.

1 ex, 1 tbl

Изобретение относится к рыбной промышленности и может использоваться при искусственном воспроизводстве ценных видов рыб, в частности осетровых, а также для создания криобанков с образцами генетического материала.

5 Известен способ замораживания спермы осетровых рыб на фторопластиковой пластине (см. ст. Савушкина С.И., Ерохина А.С. Опыт совершенствования способов криоконсервации спермы русского осетра и стерляди // Рыбное хозяйство. Серия «Аквакультура»: информ. пакет ВНИЭРХ. Проблемы сохранения геномов рыб. - М., 1999. Вып. I. - С.43-45).

10 Однако этот способ не обеспечивает высокой выживаемости половых клеток после дефростации, а также приемлем только для небольшого объема генетического материала, так как достаточно трудоемок.

15 Наиболее близким по технической сущности является способ криоконсервации половых клеток осетровых рыб, включающий: разбавление спермы протектором, эквilibрацию, замораживание ступенчатым режимом, оттаивание (см. Цветкова Л.И., Савушкина С.И., Титарева Л.Н. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых рыб. - М., 1997. - 10 с.)

20 Однако этот способ криоконсервации не учитывает негативного воздействия протекторов на клетки, что является основной причиной их гибели. Выживаемость сперматозоидов составляет всего 30-40%. Оплодотворяющая способность такой спермы недостаточно велика.

25 Техническая задача - создание способа повышения выживаемости половых клеток осетровых рыб при криоконсервации, позволяющего получать дефростированную сперму, обладающую лучшими рыбоводными качествами.

Технический результат - повышение качества дефростированной спермы осетровых рыб.

30 Он достигается тем, что в известном способе криоконсервации половых клеток осетровых рыб, включающем: разбавление спермы криопротектором, эквilibрацию, замораживание, оттаивание, перед эквilibрацией проводят стимулирование проникновения протектора внутрь клетки, а после оттаивания - выведение протектора из половых клеток.

35 Стимулирование спермы прямоугольным электрическим сигналом частотой 20 герц при амплитуде раздражителя 150 Мв в течение 1 минуты обеспечивает лучшее проникновение криопротектора внутрь клеток, при этом наблюдается высокий процент выживаемости дефростированной спермы.

40 После оттаивания при активации водой спермии начинают проявлять признаки жизни через 30-40 секунд. Это может быть связано с отрицательным действием протекторов. В качестве изотонического раствора, способного вывести протекторы из клеток, был избран физиологический раствор для осетровых рыб.

45 После дефростации сперму соединяли с раствором NaCl (6,5 г/л) в соотношении 1:1 и оставляли на 7 минут. За это время протектор вымывался из половых клеток, что способствовало их метаболизму.

Способ повышения выживаемости половых клеток осетровых рыб при криоконсервации осуществлялся следующим образом.

50 Пример 1. Работы по криоконсервации половых клеток осетровых рыб проводили в лаборатории «Аквакультура и биологические ресурсы» Южного научного центра РАН совместно сотрудниками кафедры «Аквакультура и водные биоресурсы» Астраханского Государственного Технического Университета. Биологический материал заготавливали на осетровых рыбоводных заводах Астраханской области

(Сергиевский, Житнинский, Кизанский). Объектом исследований служила сперма севрюги.

Перед началом работы всю необходимую посуду, сперму, криозащитные среды охлаждали до температуры 10-15°C. К охлажденной сперме добавляли криозащитную среду. Соотношение спермы и криозащитной среды составляло 1:1. Затем проводили облучение прямоугольным электрическим сигналом частотой 20 герц при амплитуде раздражителя 150 Мв в течение 1 минуты.

После этого сперму разливали в предварительно пронумерованные полиэтиленовые контейнеры объемом 1,5 мл и осуществляли эквilibрацию при температуре 10-15°C в течение 40 минут.

Затем проводили глубокое замораживание образцов спермы в жидком азоте в автоматическом криозамораживателе в ступенчатом режиме (3°/мин в течение 4 минут, затем 10°) в течение 10 минут, после чего погружали сперму в жидкий азот.

Размораживание образцов биологического материала проводили на водяной бане при температуре 38-40°C в течение 40 секунд.

После появления жидкой фракции сперму соединяли с раствором NaCl (6,5 г/л) в соотношении 1:1 и оставляли на 7 минут. За это время протектор вымывался из половых клеток, это способствовало их метаболизму.

После этого проводили оценку качества спермы, криоконсервированной известным способом и предлагаемым, по двум основным рыбоводным показателям - времени жизни и проценту подвижных сперматозоидов. По времени жизни сперматозоидов в предлагаемом варианте получено преимущество в 2,2 раза по сравнению с известным способом (345 с и 159 с, соответственно); выживаемость сперматозоидов составила 80% и 60%, соответственно (табл.1).

Таблица 1		
Сравнительные показатели качества дефростированной спермы прототипа и полученной новым способом		
Показатели	Прототип	Новый способ
Выживаемость сперматозоидов, %	60	80
Время жизни спермиев, с	159	345

В результате использования новых операций в процессе криоконсервации спермы осетровых рыб: стимулирование электрическим сигналом и выведение протектора из клеток после разморозки, удалось получить более высокие рыбоводные качества дефростированных образцов, выживаемость сперматозоидов повышается на 20%, а время жизни на 186 с.

Формула изобретения

Способ повышения выживаемости половых клеток осетровых рыб при криоконсервации, включающий разбавление спермы протектором, эквilibрацию, замораживание ступенчатым режимом, оттаивание, отличающийся тем, что стимулирование прямоугольным электрическим сигналом частотой 20 Гц при амплитуде раздражителя 150 мВ в течение 1 мин проводят непосредственно перед эквilibрацией, а выведение протектора из клеток после дефростации с помощью раствора NaCl (6,5 г/л) в соотношении 1:1 проводят в течение 7 мин.