

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 487 934** (13) **C1**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

[C12N 5/00 \(2006.01\)](#)[A01K 67/00 \(2006.01\)](#)**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 07.06.2016)
Пошлина: учтена за 3 год с 15.05.2012 по 14.05.2013

(21)(22) Заявка: [2012106704/10](#), 22.02.2012(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.05.2010

Приоритет(ы):

(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
[2010119469](#) 14.05.2010(45) Опубликовано: [20.07.2013](#) Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: HILL D.L. Chemical removal of the
chorion from *Drosophila* eggs, *Drosophila*
Information Service. 19, 1945, P.62. JAMES
A. ROBB. Maintenance of Imaginal
Drosophila melanogaster, 1969, p.877.
FRCELIK T.M. at al, Differentiation of eggs
with dominant, lethal mutations from
parthenogenic, unfertilized, and viable eggs in
Frichoplusia ni (Lepidoptera,

Nosfuidae), *Annalog. Entomol. Soc. Amer.*, 1973 -
v.66, №2, p.292-297. RU 2072780 10.02.1997.

Адрес для переписки:

620000, г.Екатеринбург, пр. Ленина, 51,
Уральский федеральный университет

(72) Автор(ы):

**Марвин Александр Михайлович (RU),
Давиденко Ксения Александровна (RU),
Антосюк Ольга Николаевна (RU),
Марвин Николай Александрович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н.
Ельцина" (RU)**

(54) МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕОПЛОДОТВОРЕННЫХ ЯИЦ ДРОЗОФИЛЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Незавившиеся яйца помещают на 45-50 минут в четырехпроцентный раствор гипохлорита натрия (NaOCl) и по количеству растворенных яиц определяют количество неоплодотворенных яиц. Предложенный метод позволяет осуществить массовые исследования достаточно больших выборок, выявить на уровне частоты встречаемости неоплодотворенных яиц специфику как генетически обусловленных факторов, так и стрессов внешней среды различной природы на репродуктивную систему дрозофилы. Кроме того, предложенный метод дехорионазации позволяет выявить долю партеногенетически развивающихся яиц, что характерно для некоторых видов дрозофилы, а также нарушения в репродуктивной системе самцов дрозофилы. Метод позволяет обработать за краткий

период времени (1 час) достаточно значительное количество (100-200 шт.) неразвившихся яиц, отнесенных к ранним эмбриональным деталям, позволяет выявить стерильность самцов. С помощью применения данного метода как для родительского, так и для нескольких последующих поколений дрозофилы определяется пролонгирующий эффект биологического воздействия стрессового агента на способность оставлять потомство. 5 ил., 5 пр.

Изобретение относится к области биохимии, касается метода определения неоплодотворенных яиц дрозофилы и может быть использовано, в частности, в фундаментальных исследованиях по клеточной биологии, а также прикладных медицинских, вирусологических исследованиях, для биологического тестирования качества пищевой, косметической промышленности и мониторинга окружающей среды.

Известен способ определения жизнеспособности дрозофилы, заключающийся в подсчете общего количества отложенных яиц и общего количества эмбриональных и постэмбриональных деталей за весь период (Lawrence D. Friedman. X-ray induced sex-linked lethal and detrimental mutations and their effect on the viability of drosophila melanogaster. Genetics №9: 689699 April 1964, p.690).

Для анализа жизнеспособности по принятой методике используются суммарные показатели частоты встречаемости доминантных эмбриональных и постэмбриональных деталей. Однако частота встречаемости эмбриональных и постэмбриональных деталей не является константным признаком, а ее динамика отражает специфику воздействующего фактора. При изучении данного показателя за период в 3-5 дней исследователь получает лишь фрагментарные представления о биологическом эффекте агента.

Как известно, доминантные эмбриональные летали подразделяются на ранние и поздние. Проблемы в определении поздних эмбриональных леталей, как правило, не существует (подсчитываются яйца бурого цвета). Что касается методики определения частоты встречаемости ранних эмбриональных деталей и неоплодотворенных яиц (яйца белого цвета в обоих случаях), то эта проблема до сих пор была не решена.

Определение частоты встречаемости неоплодотворенных, яиц среди ранних эмбриональных деталей с использованием давленных препаратов, окрашенных ацетокармином (Hadorn E., Zeller H. Fertilitatsstudien an Drosophila melanogaster. I. Untersuchungen zum altersbedingten Fertilitatsabfall // Wilhelm Roux' Archiv fur Entwicklungsmechanik der organismen, 1943. Bd. 142. H.2. p.276-300), и при изучении ультра структуры развивающихся яиц дрозофилы в месте проникновения сперматозоида через микропиле (Zarani F., Margoritis L.H. The eggshell of Drosophila melanogaster // Can. J. Zool. 1986, 64, №11, p.2509-2519) данной проблемы до конца не решает в силу следующих причин.

Способ, предложенный Hadorn E. и Zeller H. позволяет, используя метод давленных препаратов с последующей окраской, установить среди неразвившихся яиц белого цвета долю неоплодотворенных.

Недостатком этого метода является то, что, самые ранние этапы дробления зиготы в яйце (начало эмбриогенеза) на таких препаратах невозможно обнаружить, поскольку яйца дрозофилы центролицетального типа, и средняя область яйца занята желтком. В связи с чем, физически невозможно обнаружить самые ранние этапы синхронного деления центрального ядра. Таким образом, данная методика не дает гарантии обнаружения эмбриональных деталей на самых ранних стадиях развития.

Второй способ, предложенный Zarani F. и Margoritis L., предполагает изучение структуры микропиле яйца с помощью электронного микроскопа, когда по изменению желточной мембраны при прохождении сперматозоида через микропиле в яйцо наблюдается изменение ее структуры. Однако, при этом возможно работать лишь с единичными яйцами.

Известен метод массового определения доли оплодотворенных и неоплодотворенных яиц на ранних стадиях развития с использованием гипохлорита натрия (Hill D.L. Chemical removal of the chorion from Drosophila eggs / Drosophila Information Service. 19, P.62, 1945).

Согласно этому методу яйца *D.virilis* помещали на 2 минуты в 3% р-р гипохлорита натрия. При этом хорион исчезал, без какого либо вреда для эмбриона. Применение данного реактива при изучении эмбрионального развития дрозофилы осуществляется с 1950 года в опытах по дехорионизации яиц. Смысл этой методики состоит в том, чтобы растворить наружную оболочку яйца и сделать его прозрачным. Это позволяло дезинфицировать яйца для последующих исследований, а во-вторых, обнаружить неразвившиеся яйца на более поздних этапах эмбрионального развития. В этом случае, в центре яйца можно наблюдать темные скопления.

С помощью данного метода осуществлялось точное наблюдение за развитием эмбриона, но не представлялось возможным отделить яйца, погибшие в течение нескольких часов после оплодотворения от тех, которые не были оплодотворены вовсе.

Также использовался метод снятия хориона и стерилизации поверхности яиц *Drosophila melanogaster* путем помещения их на 2 минуты в 2,6% раствор гипохлорита натрия, затем на 15 минут в 70% раствор этанола, после чего в дистиллированную воду (James A. Robb. Maintenance of Imaginal *Drosophila melanogaster*, June 1, 1969, p.877).

Данный метод не позволяет обнаружить неоплодотворенные яйца, так как с помощью него происходит растворение хориона яйца, а это не дает возможности разделить ранние эмбриональные летали и яйца, которые не были оплодотворены (после растворения вителлиновой оболочки такие яйца морфологически неразличимы).

В 1973 году Frcelik T.M., Adams T.S., Holt G.G. и Nelson D.K. (Frcelik T.M., Adams T.S., Holt G.G., Nelson D.R. Differentiation of eggs with dominant, lethal mutations from partenogenic, unfertilized, and viable eggs in *Frichoplusia ni* (Lepidoptera, Nosfuidae) // *Annalog. Entomol. Soc. Amer.*, 1973 - v.66, №2, p.292-297) была предложена методика определения неоплодотворенных и партеногенетически развивающихся яиц у совки *Trichoplusia*. В основе ее лежал метод дехорионизации яиц в 3% растворе NaOCl в течение 5-10 минут. В этом случае неоплодотворенные яйца растворяются, а партеногенетические нет.

Использование данной методики не дает аналогичных результатов на объекте *Drosophila melanogaster* (неоплодотворенные яйца не растворяются за период экспозиции 5-10 минут).

Задачей изобретения является более точное определение частоты встречаемости неоплодотворенных яиц.

Поставленная задача решается за счет того, что в методе определения неоплодотворенных яиц дрозофилы путем дехорионизации яиц в растворе гипохлорита натрия (NaOCl), неразвившиеся яйца помещают на 45-50 минут в четырехпроцентный раствор гипохлорита натрия и по количеству растворенных яиц определяют количество неоплодотворенных яиц.

Сущность изобретения поясняется следующими диаграммами:

фиг.1 - Диаграмма 1. Частота встречаемости эмбриональных деталей в мутантной линии *Var*,

фиг.2 - Диаграмма 2. Частота встречаемости эмбриональных леталей в мутантной линии *vestigial*,

фиг.3 - Диаграмма 3. Частота встречаемости эмбриональных деталей в линии дикого типа «Север», подвергнутой облучению 3000 рентген на стадии ранней куколки,

фиг.4 - Диаграмма 4. Частота встречаемости эмбриональных деталей в линии дикого типа «Север», подвергнутой гамма облучению 3000 Р на стадии ранней куколки,

фиг.5 - Диаграмма 5. Частота встречаемости эмбриональных деталей в линии дикого типа «Екатеринбург», выращенной на среде с формальдегидом (концентрация 0,025%).

Определение количества неоплодотворенных яиц дрозофилы осуществляют следующим способом.

После вылета мух в изучаемой линии отобранные виргинные самки (20-40 шт.) в паре с самцами помещаются в отдельные пластиковые пробирки, каждая из которых закрывается пробкой, содержащей стандартную агаровую среду, и содержатся таким образом на протяжении 10-15 суток.

Агаровая среда предварительно смазывается дрожжевой суспензией. Каждые 3 дня пробки со средой заменяются. Ежедневно подсчитывается количество отложенных яиц.

Далее отложенные яйца переносятся на черные агаровые пластинки, выдерживаются при температуре 25С°. Вылупившиеся личинки периодически подсчитываются и удаляются с пластинки для дальнейшего опыта. Через 5 дней (с момента откладки яиц), пластинки просматриваются и подсчитывается количество неразвившихся яиц.

Среди неразвившихся яиц можно обнаружить яйца бурого и белого цвета. Яйца бурого цвета относятся к поздним эмбриональным деталям (ПЭЛ). Среди неразвившихся яиц белого цвета могут присутствовать в определенном процентном соотношении неоплодотворенные яйца и ранние эмбриональные летали (РЭЛ).

Для определения доли неоплодотворенных яиц на ранних стадиях развития лежит неразвившиеся яйца помещают на 45-50 минут в четырехпроцентный раствор гипохлорита натрия. Если они растворялись - их относили к неоплодотворенным, если оставались в целостном виде - к ранним эмбриональным деталям.

Предложенный метод принципиально отличается от ранее известного: во-первых, используется 4-% раствор NaOCl, во-вторых, время обработки составляет 45-50 минут, в третьих, позволяет обработать за краткий период времени (1 час) достаточно значительное количество (100-200 шт.) неразвившихся яиц, отнесенных к ранним эмбриональным деталям и не требует дорогостоящего оборудования.

Предложенная методика опробирована с использованием девственных самок, которые, как известно, откладывают неоплодотворенные яйца. В частности, было показано, что среди 50 яиц, отложенных девственными самками, только в одном случае яйцо не растворилось. В данном случае, это связано с физиологией откладки яиц у дрозофилы, а именно с первыми этапами образования пребластодермы без участия ядер при значительной задержке откладки яиц, что характерно для девственных самок. То есть, на поверхности виттелиновой мембраны происходит образование защитного слоя, как и в случае оплодотворения, который препятствует проникновению NaOCl в яйцо.

Для экспериментальной проверки предложенного метода по обнаружению частоты встречаемости неоплодотворенных яиц, было осуществлено несколько экспериментов с использованием различных факторов антропогенной природы и ряда мутантных линий. Результаты представлены в виде пяти экспериментов.

В опыте №1 была использована мутантная линия Var. В ходе эксперимента было получено 6412 яиц. Общее число неразвившихся яиц составило 477 штук (7,5% от общего числа). Из них 139 (2,2%) судя по бурой окраске могут быть отнесены к поздним эмбриональным деталям (ПЭЛ). На долю ранних эмбриональных деталей (РЭЛ) + неоплодотворенные яйца приходится 338 яиц (5,3%). 201 яйцо белого цвета, т.е. РЭЛ, были подвергнуты дехорионизации по нашей методике. Из них 17 яиц растворилось, что составило 8,5% от числа РЭЛ (фиг.1).

В опыте №2 была использована мутантная линия vestigial. Общее число проанализированных яиц составило 5028. Из них 1047 яиц не развилось, что составило 20,6%. На долю ПЭЛ пришлось 193 яйца (3,8%), тогда как на долю РЭЛ + неоплодотворенные яйца пришлось 854 яйца (16,8%). 724 яйца белой окраски, т.е. РЭЛ были подвергнуты дехорионизации по заявляемому методу 55 яиц растворилось, что составило 7,7% от числа РЭЛ (фиг.2).

В опытах №3 и №4 была использована линия дикого типа "Север", предварительно было показано, что при использовании 11500 яиц в контроле в отношении частоты встречаемости неразвившихся яиц обнаруживает не более 3%. Из них один процент (120 яиц) приходится на долю ПЭЛ, тогда как на долю РЭЛ + неоплодотворенные яйца приходится около 2% (279 яиц).

В опыте №3 ранние куколки были подвергнуты действию рентгена дозой 3000. Всего было использовано 4125 яиц. Не развилось 3109 яиц, что составило 75,4%. Из них 378 яиц бурого цвета могут быть отнесены к ПЭЛ, тогда как 2731 яйцо относятся к РЭЛ + неоплодотворенные яйца. 2584 яйца белого цвета были подвергнуты дехорионизации. 147 яиц растворилось, что составило 5,6% от числа проанализированных нами белых яиц (фиг.3).

В опыте №4 так же использовали линию дикого типа "Север". Ранние куколки были подвергнуты гамма облучению дозой 3000 рентген. Всего было использовано 4581 яйцо. Из них 2550 яиц не развилось, что составило 56%. Из них 216 яиц оказались бурого цвета, т.е. ПЭЛ, что составило 8,4%. 2326 (47,7%) яиц - белого цвета, т.е. РЭЛ + неоплодотворенные яйца. 2110 яиц белого цвета были подвергнуты дехорионизации, из них 216 растворилось, что составило 10,2% (фиг.4).

В опыте №5 был изучен генотоксический эффект формальдегида, с использованием линии дикого типа "Екатеринбург". В этом опыте личики развивались на питательной среде с формальдегидом в концентрации 0,025%, вплоть до вылета имаго. В ходе эксперимента было использовано 6756 яиц. Среди них не развилось 2971 яйцо, что составило 44%. Из них 257 яиц демонстрировали бурую окраску, т.е. ПЭЛ, что составило 3,8% от числа отложенных яиц. Тогда как 2714 яиц были отнесены к РЭЛ + неоплодотворенные яйца, что составило 40,2%. 2087 яиц белого цвета были подвергнуты дехорионизации по нашему методу. 627 яиц растворилось, что составило 30% от числа ранних эмбриональных леталей (фиг.5).

Как видно из приведенных данных по учету числа неоплодотворенных яиц, которые раньше были отнесены к ранним эмбриональным деталям, предложенная методика по дехорионизации яиц, позволяет осуществить массовые исследования достаточно больших выборок. Предложенный метод позволяет выявить на уровне

частоты встречаемости неоплодотворенных яиц влияние генетически обусловленных факторов и стрессов внешней среды различной природы на репродуктивную систему дрозофилы.

Также предложенный метод дехорионизации позволяет выявить долю партеногенетически развивающихся яиц, что характерно для некоторых других видов дрозофилы.

Метод обнаружения частоты встречаемости неоплодотворенных яиц, позволяет выявить нарушения в репродуктивной системе самцов дрозофилы (стерильность самцов). Ранее эти нарушения невозможно было учесть, так как неоплодотворенные яйца не выявлялись существующими методами в массовом количестве.

Кроме того, заявленный метод позволяет обработать за краткий период времени (1 час) достаточно значительное количество (100-200 шт.) неразвившихся яиц, отнесенных к РЭЛ, и не требует дорогостоящего оборудования.

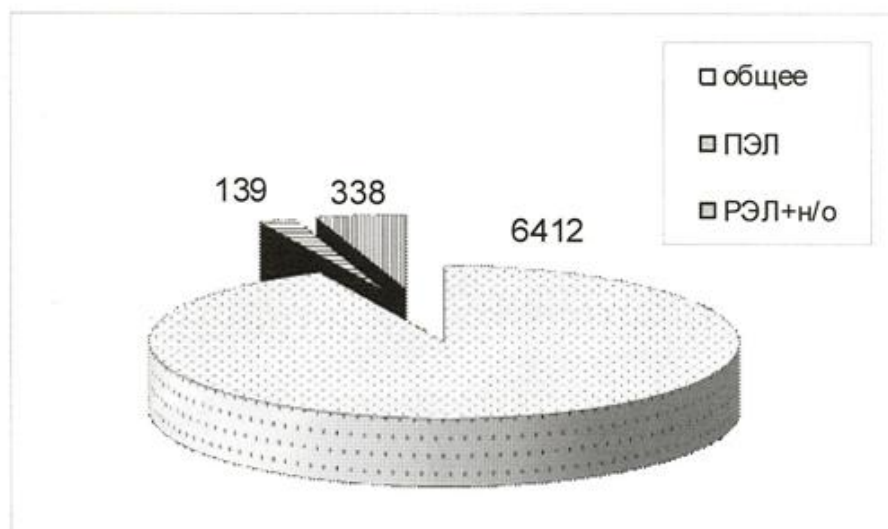
Метод дает более полное представление о влиянии стрессового агента на репродуктивную систему дрозофилы, а именно, позволяет выявить стерильность самцов.

Метод подходит для анализа биологического эффекта лекарственных препаратов, пищевых продуктов, компонентов косметических препаратов, радиационного излучения, состояния окружающей среды.

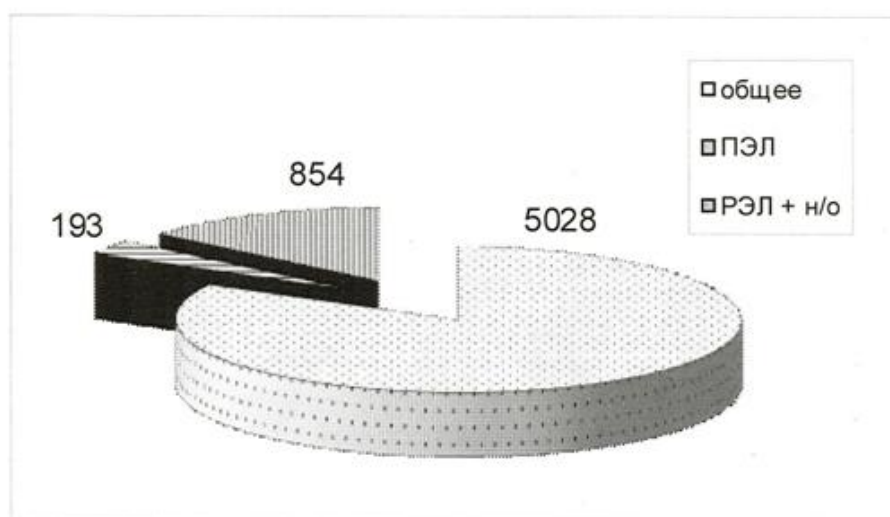
С помощью применения данного метода как для родительского, так и для нескольких последующих поколений дрозофилы определяется пролонгирующий эффект биологического воздействия стрессового агента на способность оставлять потомство.

Формула изобретения

Метод определения неоплодотворенных яиц дрозофилы путем дехорионизации яиц в растворе гипохлорита натрия (NaOCl), отличающийся тем, что неразвившиеся яйца помещают на 45-50 мин в четырехпроцентный раствор гипохлорита натрия и по количеству растворенных яиц определяют количество неоплодотворенных яиц.

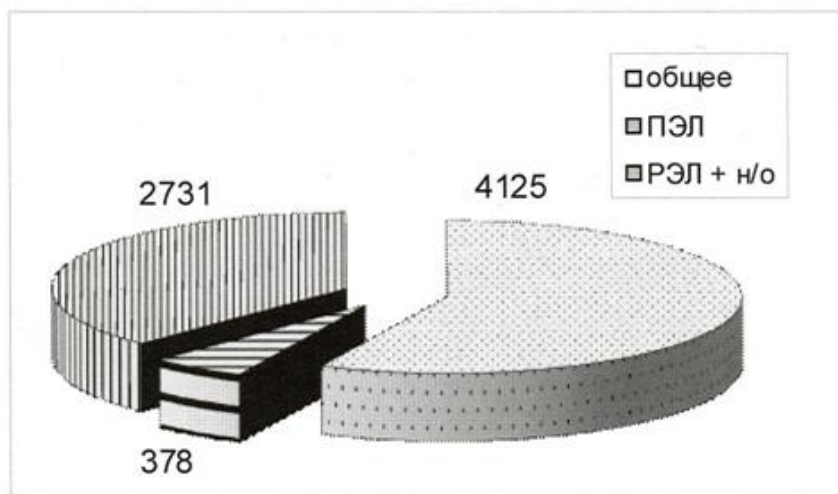
Частота встречаемости эмбриональных леталей в мутантной линии *Var*

Фиг.1

Частота встречаемости эмбриональных леталей в мутантной линии *vestigial*

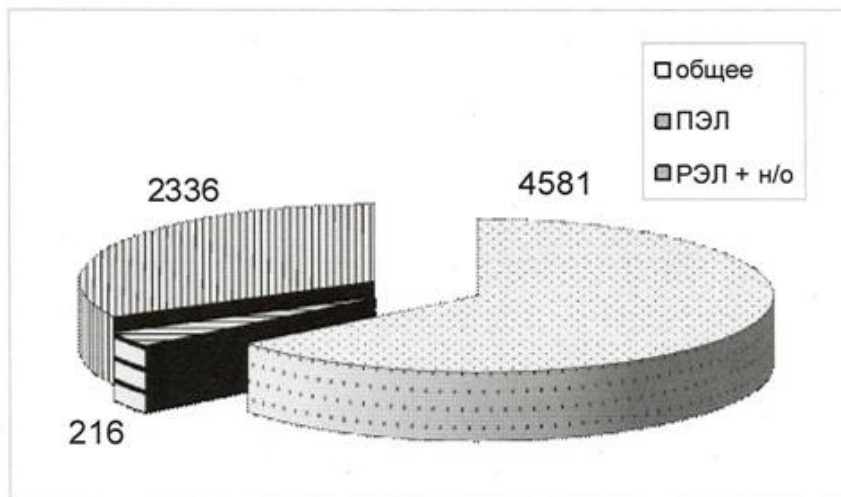
Фиг.2

Частота встречаемости эмбриональных леталей в линии дикого типа «Север», подвергнутой облучению 3000 рентген на стадии ранней куколки



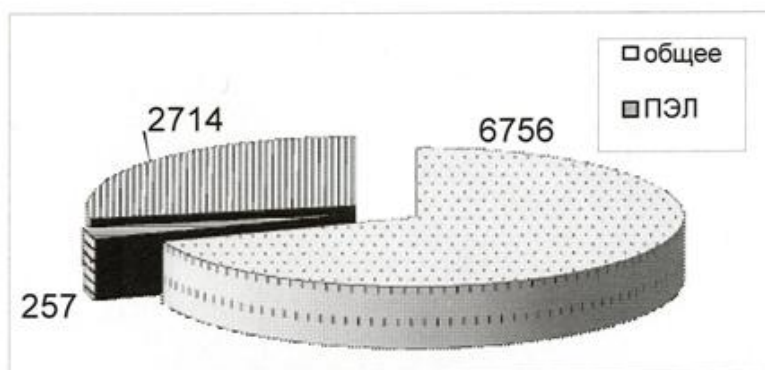
Фиг.3

Частота встречаемости эмбриональных леталей в линии дикого типа «Север», подвергнутой гамма облучению 3000 Р на стадии ранней куколки



Фиг.4

Частота встречаемости эмбриональных леталей в линии дикого типа «Екатеринбург», выращенной на среде с формальдегидом (концентрация 0,025%)



Фиг.5

ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **06.06.2013**

Дата публикации: [10.05.2014](#)