

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ З ОТРИМАННЯ ООЦИТІВ ТА  
ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ КРОЛІВ В УМОВАХ *IN VITRO***

Чубинське – 2018

Авторський колектив:

*А. Б. Зюзюн*, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії біотехнології відтворення;

*В. В. Дзіцюк*, доктор с.-г. наук, завідувач лабораторії генетики;

*П. А. Троцький*, кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник лабораторії біотехнології відтворення.

*Методичні рекомендації розглянуто і схвалено вченою радою Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (протокол № 11 від 23 жовтня 2018 р.)*

Рецензенти:

*К. В. Копилова*, доктор с.-г. наук, заступник директора з наукової та інноваційної роботи Інституту продовольчих ресурсів НААН;

*О. В. Щербак*, кандидат с.-г. наук, завідувач лабораторії біотехнології відтворення Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН.

**Зюзюн А. Б.**

3 98 Методичні рекомендації з отримання ооцитів та формування ембріонів кролів в умовах *in vitro* / А. Б. Зюзюн, В. В. Дзіцюк, П. А. Троцький. – Чубинське, 2018. – 20 с.

В рекомендаціях узагальнено методичні підходи щодо отримання ооцит-кумулюсних комплексів та епідидимальних сперматозоїдів кролів. Розглянуті підходи щодо отримання повноцінних дозрілих поза організмом яйцеклітин кролів. Викладені принципові моменти формування ембріонів кролів в умовах *in vitro*. Розглянуті цитогенетичні особливості гамет та ембріонів кролів в процесі ембріогенезу *in vitro*.

Рекомендації розраховані на спеціалістів біотехнологічних лабораторій, науковців, викладачів і студентів вищих навчальних закладів біологічного, медичного й аграрного профілю.

## ЗМІСТ

Вступ.....	4
1. Основні вимоги до приміщення та обладнання для отримання та культивування ембріонів кролів в умовах <i>in vitro</i> .....	5
2. Отримання популяцій ооцитів із яєчників кролиць.....	7
3. Оцінка ооцит-кумулюсних комплексів кролів та їх культивування в умовах <i>in vitro</i> .....	8
4. Підготовка сперматозоїдів до запліднення поза організмом.....	10
5. Культивування ембріонів кролів в умовах <i>in vitro</i> .....	13
6. Приготування цитогенетичних препаратів ооцитів та ембріонів.....	15
7. Перелік необхідного обладнання інструментів и реактивів.....	16
Рекомендована література.....	17

## ВСТУП

Сучасні репродуктивні технології вимагають застосування не лише нових методичних підходів до репродуктивної біотехнології, а і збільшення кількості видів тварин, генетичний матеріал яких можна ефективно використовувати у програмах запліднення *in vitro*, трансгенезу та клонування [11]. Надійним засобом використання потенційного запасу репродуктивних клітин тварин є культивування незрілих ооцитів, вилучених із яєчників тварин, їх запліднення поза організмом і отримання повноцінних ембріонів на доімплантаційних стадіях. Важливою умовою для позитивного результату таких робіт є поглиблене вивчення особливостей раннього ембріогенезу ссавців *in vitro*, що потребує застосування нових методів біотехнології, генетики, клітинної біології та ембріології [1, 2].

Проведення робіт з клонування та генетичної інженерії можуть бути здійснені лише за наявності великої кількості клітин і зигот.

Сформовані поза організмом доімплантаційні ембріони є джерелом дешевого біоматеріалу для експериментальних робіт. Крім того, методи отримання *in vitro* ембріонів ссавців дають змогу вивчати морфологічні, цитогенетичні та молекулярно-генетичні особливості раннього ембріогенезу.

Наразі існує необхідність в поглибленому вивченні та вдосконаленні отримання дозрілих ооцитів із яєчників кролиць, оскільки використання генетичного потенціалу яєчників кролів та вивчення закономірностей проходження мейотичного дозрівання гамет самок в умовах *in vitro* є основою успіхів при клонуванні та створенні трансгенних тварин, що продукують біологічно активні речовини [8, 10]. В наш час як клітини-реципієнти при клонуванні кролів зазвичай використовують дозрілі *in vivo* яйцеклітини після гормональної обробки самиць, проте синхронізація овуляції гамет ускладнюється часовими параметрами від 10,5 до 14 год. після ін'єкцій лютеїнізуючого гормону (ЛГ). Тому існує необхідність одержання достатньої кількості повноцінних дозрілих в умовах *in vitro* яйцеклітин кролів [6, 7].

Культивування та запліднення ооцитів тварин поза організмом це послідовність дуже складних фізіологічних процесів, що відбуваються *in vivo*, повинна проходити у культуральному середовищі у відносно простих і статичних умовах [5, 7].

Отримання ембріонів в умовах *in vitro* можна розділити на три основні етапи:

– ооцити, виділені із фолікулів яєчника самки, мають пройти стадію дозрівання. В цей період відбувається відновлення мейозу, здійснення першого мейотичного поділу та цитоплазматичне дозрівання ооцитів;

– сперматозоїди плідника мають пройти *in vitro* стадії капацитації. В період спільного культивування дозрілих *in vitro* ооцитів і капацитованих сперматозоїдів відбувається запліднення ооцитів;

– створення системи культивування ембріонів тварин *in vitro*, що забезпечить їх розвиток від зиготи до бластоцисти, з метою отримання життєздатних ембріонів.

Успіх культивування ооцитів з метою їх дозрівання та запліднення в лабораторних умовах залежить від багатьох чинників, з яких найважливішим є створення штучної системи культивування, яка забезпечує повноцінне дозрівання ооцитів, здатних до запліднення та подальшого розвитку в ембріони.

### **1. Основні вимоги до приміщення та обладнання для отримання та культивування ембріонів кролів в умовах *in vitro***

Всі експериментальні дослідження пов'язані з одержанням та культивуванням ооцитів, сперматозоїдів і ембріонів *in vitro* проводять у стерильних умовах боксу. Бокс повинен бути обладнаний ультрафіолетовими лампами. Загальна площа боксу з передбоксником повинна бути не менше 20–25 м<sup>2</sup>. Для освітлення використовують лампи денного світла. Бажано також використовувати ламінарні шафи. У передбокснику встановлюють наступне обладнання: мийку, лабораторний стіл, сушильну шафу, шафу для посуду, шафу для реактивів, холодильник для зберігання поживних середовищ та препаратів, центрифугу, лабораторні та аналітичні ваги, рН-метр, осмометр, пристрій для фільтрування рідин, балони з газом (вуглекислим, киснем) або суміш (5% CO<sub>2</sub>), які обладнані редуктором, змішувачем та дозиметром.

Для ефективної роботи в боксі необхідно мати наступне обладнання в розрахунку на одного дослідника: CO<sub>2</sub>-інкубатор або хоча б біологічний термостат з ексикатором, світловий мікроскоп (МБС-9 або МБС-10), інверсійний мікроскоп, аналітичні ваги,

центрифуга, шафа для стерильного посуду. Стерильність у боксі та передбокснику підтримується за рахунок бактерицидних ламп і обов'язкового використання персоналом спеціального стерильного змінного одягу та взуття. До і після маніпуляцій з гаметами і ембріонами проводять ретельне вологе прибирання приміщень з застосуванням дезінфікуючих засобів. Всі поверхні столів, обладнання і приладів протирають 70% розчином етилового спирту. Для підтримки стерильності повітря у боксі можна використовувати спеціальні протибактеріальні фільтри.

Для виділення ооцит-кумулясних комплексів із яєчників необхідно мати скальпель зі змінними лезами. Всі наступні маніпуляції з клітинами краще всього здійснювати за допомогою піпетки (діаметр кінчика 150–250 мкм). Для приготування культуральних середовищ необхідні стерильні флакони, або колби об'ємом 10–50 мл та автоматичні мікропіпетки. Культивування ооцит-кумулясних комплексів та ембріонів найкраще проводиться в стерильному одноразовому посуді. Ретельне оброблення посуду є необхідною умовою при роботі з гаметами та ембріонами тварин. Посуд використовують із нейтрального скла та пластику.

Інструмент для роботи з гаметами та ембріонами повинен бути стерильним (чашки Петрі, піпетки, дозатори з насадками, флакони, центрифужні пробірки та ін.) і бажано одноразовим.

Скляний посуд перед стерилізацією ретельно миють, ополіскують у проточній воді і тричі у дистильованій воді, сушать і стерилізують. Стерилізацію кип'ятінням проводять тільки для скляних і гумових інструментів. Час кип'ятіння – 30–45 хв. Потім посуд підсушують у сушильній шафі вниз горловиною, щільно накладають алюмінієву фольгу та ставлять на стерилізацію сухим жаром за температури +180 – +200°C упродовж 1,5–2 год.

Металевий інструмент миють під проточною водою, потім спеціальним миючим засобом (типу 7X або 10X), споліскують дистильованою водою, висушують і стерилізують сухим жаром за температури +150 – +200°C. Інструменти промивають із миючим засобом, споліскують водопровідною та дистильованою водою, висушують і для стерилізації вміщують на 20–30 хв. у 70%-вий розчин етилового спирту.

Стерильний посуд зберігають у чистих приміщеннях боксу або передбоксника.

## 2. Отримання популяцій ооцитів із яєчників кролиць

Для одержання ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК) відбирають яєчники від забитих клінічно здорових тварин. Після забою тварини обережно вилучають яєчники. Щоб зберегти ооцити, які містяться в фолікулах яєчників життєздатними, яєчники поміщають в підготовлений термос. В термос наливають підігріту до  $+38^{\circ}\text{C}$  дистильовану воду чи фізіологічний розчин (0,9% водний розчин хлориду натрію (NaCl)). Перед початком відбору яєчників нагріту дистильовану воду або фізіологічний розчин виливають і яєчники поміщають в теплий термос. Яєчники транспортуються в лабораторію в термосі за температури  $+30 - +33^{\circ}\text{C}$  впродовж 1,5–6 годин. Після доставки в лабораторію яєчники промивають 4 рази у теплому ( $+37 - +38^{\circ}\text{C}$ ) стерильному фосфатно-сольовому розчині Дюльбеко (PBS, Sigma, D 8662) із 0,075 мг/мл канаміцин сульфату.

Як донорів ооцитів можна використовувати кролиць різного віку на різних стадіях статевого циклу. Але встановлено, що найбільшу кількість ооцитів придатних до подальшого розвитку поза організмом, можна одержати із яєчників на фазі фолікулярного росту (рис. 1). Тому, що в ооцит-кумулюсних комплексах кролиць, вилучених із яєчників на фолікулярній фазі, найбільша частина гамет перебуває на стадії диплотени (84,5%) тобто є придатними для культивування *in vitro*, а клітин з дегенерованим хроматином виявлено найменше лише 10%. Найбільший відсоток ооцитів з дегенерованим хроматином спостерігався в пулі ооцитів із яєчників кролиць на лютеальній фазі (утворення жовтого тіла) (рис. 2) (25,5%). Це пояснюється тим, що жовте тіло продукує гормон прогестерон, який пригнічує ріст фолікулів і розвиток ооцитів у них. В яєчниках на стадії овуляції (рис. 3) у 20% ооцитів виявлено з дегенерований хроматин [3].



Рис. 1. Яєчники кролиці на фазі фолікулярного росту



Рис. 2. Яєчники кролиці на лютеїновій фазі



Рис. 3. Яєчники кролиці з ознаками овуляції

Для біотехнологічних досліджень в якості донорів ооцитів найбільш ефективним є використання молодих кролиць в період статевого дозрівання, в яких ще не розпочався статевий цикл, оскільки їх яєчники на фазі фолікулярного росту коли можна вилучити більшу кількість повноцінних ооцит-кумулясних комплексів, придатних до культивування поза організмом, що забезпечить значно більший відсоток дозрівання в умовах *in vitro* [3, 4, 12].

Вилучення ооцитів та постановку на дозрівання, запліднення та подальше культивування здійснюють у стерильних умовах боксу. Температура в боксі повинна підтримуватися на рівні +22–+25°C. Вилучення ОКК із антральних фолікулів яєчників здійснюється шляхом розсічення фолікулів скальпелем із змінним лезом в середовищі PBS із 0,075 мг/мл канаміцину сульфату.

### **3. Оцінка ооцит-кумулясних комплексів кролів та їх культивування в умовах *in vitro***

Пошук ОКК та їх оцінку здійснюють під світловим мікроскопом МБС-9 при збільшенні в 12–24 рази. Вилучені ОКК 6-разово відмивають в середовищі 199, яке містить 25 мМ буфера Нерес (Sigma, М 2520), 10% сироватки крові великої рогатої худоби і одноразово промивали в середовищі для дозрівання.

Відбір та відмивання ОКК здійснюють на нагрівальному столику за температури +37°C. Сортування ооцит-кумулясних комплексів проводять на основі морфологічної оцінки за станом кумулюсу, оскільки встановлено важливу роль в дозріванні ооцитів клітин кумулюсу, які їх оточують. Вони відповідають за зв'язок ооцитів з навколишнім середовищем, виступаючи посередником гормональної та метаболічної регуляції. Тому вилучені із антральних фолікулів яєчників кролиць ооцити, залежно від стану кумулюса та ооплазми, розподіляють на чотири групи [2, 13]:

I група – ооцити, оточені щільним багат шаровим кумулюсом, із однорідною невакуолізованою ооплазмою (рис. 4) – найкращі для культивування поза організмом;

II група – ооцити, оточені розпушеним шаром кумулюса та однорідною невакуолізованою ооплазмою (рис. 5) – придатні до культивування поза організмом;



III група – ооцити, які частково втратили кумулюс, але з невакуолізованою однорідною ооплазмою (рис. 6) – умовно придатні до культивування поза організмом;

IV група – атретичні, денудовані, з вакуолізованою ооплазмою, тобто ооцити, які непридатні до подальшого розвитку (рис. 7) – не придатні до культивування в умовах *in vitro*.



Рис. 4. Ооцит кролиці I-ї групи  
Зб. об.10х, ок.10х.



Рис. 5. Ооцити кролиці II-ї групи.  
Зб. об.10х, ок.10х.

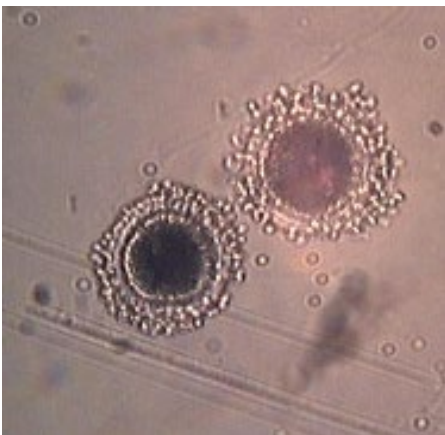


Рис. 6. Ооцити кролиці III-ї групи.  
Зб. об.10х, ок.10х.

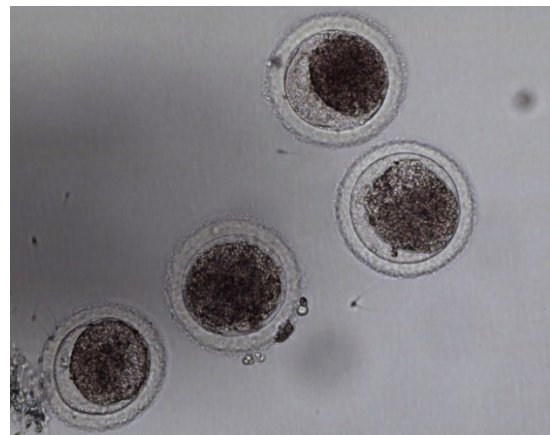


Рис. 7. Ооцити кролиці IV-ї групи.  
Зб. об.10х, ок.10х

Культивування відібраних ооцитів кролів в умовах *in vitro* проводили впродовж 24 годин в пластикових чашках Петрі (по 25–30 ООК у 1 мл) у середовищі для дозрівання – 199 на розчині Ерла (Sigma, M 5017), яке доповнювали 20% інактивованою нагріванням (56°C, 30 хвилин) еструсної сироватки корів, 0,068 мг/мл канаміцин сульфату, 0,11 мг/мл пірувату натрію і 0,1 мг/мл глютаміну. До середовища для культивування обов'язково необхідно додавати

клітини гранульози у кількості  $3-5 \times 10^6$  на 1 мл, які вилучають із антральних фолікулів без ознак атрезії.

Критерієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільца (рис. 8).



Рис. 8. Ооцит кролиці після культивування *in vitro* Ідентифіковано перше полярне тіло (стрілка). Зб. об. 900х, ок. 10х.

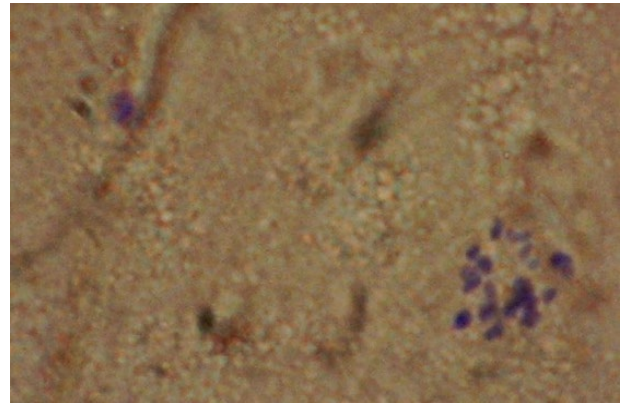


Рис. 9. Цитогенетичний препарат ооциту кролиці стадії метафази II мейозу ( $n$  хромосом = 22). Зб. об. 900х, ок. 10х.

Для виявлення хромосомних порушень впродовж дозрівання ооцитів *in vitro* частину гамет використовують для приготування сухоповітряних препаратів за допомогою модифікованого методу Тарковського [13].

#### 4. Підготовка сперматозоїдів до запліднення *in vitro*

Для запліднення поза організмом ооцитів кролів використовували свіжоотримані епідидимальні сперматозоїди кролів, які вилучали із придатків сім'яників (епідидимісів) у забитих статевозрілих самців (рис. 11, 12). В лабораторію епідидиміси доставляли разом із сім'яниками впродовж 2–6 годин за температури  $+18 - +25^{\circ}\text{C}$ . Сперматозоїди одержували шляхом надрізання епідидимісів лезом безпечної бритви.

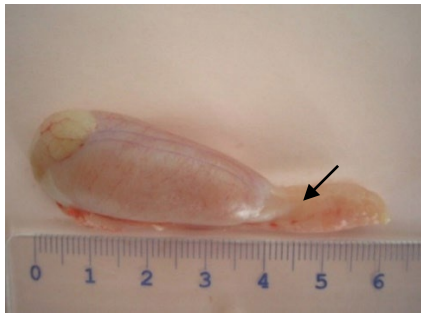


Рис. 10. Сім'яник кроля  
(епідидиміс стрілка)



Рис. 11. Придаток сім'яника  
(епідидиміс) кроля

Для розрідження та дослідження рухливості свіжовилучених епідидимальних сперматозоїдів кролів використовують середовища: «TL MiniTub» (TL Sperm capacitation medium for swin-up, MiniTub – 1990/0020) та «TALP  $\text{Ca}^{2+}$  free». Зберігаються розріджені епідидимальні сперматозоїди кролів за температури  $+38,5^{\circ}\text{C}$  у продовж 18 годин (рис. 12).

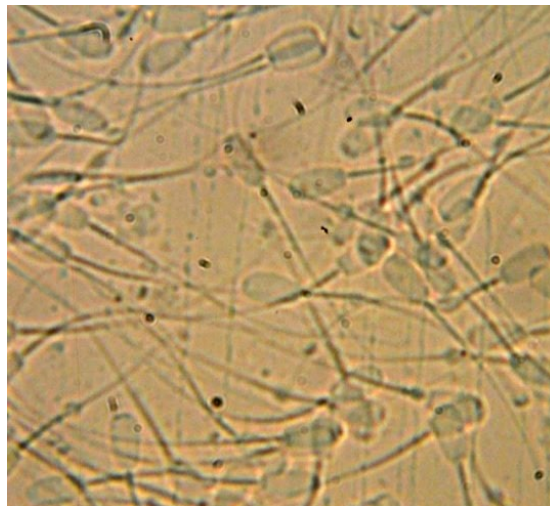


Рис. 12. Свіжоотримані епідидимальні сперматозоїди кроля  
Зб. об.25x, ок.10x.

Відбір сперматозоїдів здійснюється методом спливання (*swim-up*). Використання методу «*swim-up*» та одноразового центрифугування дає змогу не тільки очистити сперматозоїди, а і відібрати найбільш життєздатні. При цьому застосовується одноразове 15-хвилинне спливання найбільш рухливих сперматозоїдів у флаконах, розміщених під кутом  $45^{\circ}$ . На дно похилених флаконів (4–6 шт.) під 1 мл модифікованого середовища Тіроде (TALP) без іонів  $\text{Ca}^{2+}$  (табл.) розміщували 0,2 мл суспензії сперматозоїдів. Потім обережно відбирали поверхневий шар середовища. Відібрану суспензію з рухливими сперматозоїдами

центрифугували при 3100 об/сек. (900 g) протягом 5 хвилин, відбирали рідину до осаду і розбавляли осад свіжим середовищем TALP без іонів  $\text{Ca}^{2+}$  до концентрації  $1-5 \times 10^7$  сперматозоїдів/мл [13].

**Склад середовищ для проведення  
запліднення яйцеклітин поза організмом**

Компоненти фірми Sigma (номер за каталогом)	мг на 20 мл води		
	TALP без іонів $\text{Ca}^{2+}$	TALP для відмивання	TALP- IVF
1. Хлорид натрію, NaCl (S 5886)	130,9	133,2	133,2
2. Хлорид калію, KCl (S 5405)	4,0	4,76	4,76
3. Гідросульфат натрію, $\text{NaHCO}_3$ (S 5761)	42,0	3,36	41,8
4. Дигідрофосфат натрію, $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (S 5011)	0,94	0,94	0,94
5. Лактат натрію, 60 % сироп (L 7900)	11,2	11,2	11,2
6. Хлорид магнію, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (M 2393)	2,0	2,0	2,0
7. Хлорид кальцію, $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (C 7902)	–	4,4	4,4
8. Нерес (H 9136)	24,0	48,0	48,0
9. Феноловий червоний (P 3532)	0,15	0,2	0,2
10. Канаміцин сульфату (P 5530)	1,5	1,5	1,5
11. Піруват натрію (P 5280)	2,2	1,1	1,1
12. БСА (A 6003)	120,0	60,0	60,0
13. Глюкоза (G 7021)	50,0	20,0	–

Визначення концентрації сперматозоїдів здійснювали за допомогою камери Горяєва. Підрахунок сперматозоїдів проводили на столику мікроскопа за допомогою камери Горяєва при збільшенні у 200–400 раз. Сперматозоїди підраховували по діагоналі в 5 великих квадратах сітки (80 маленьких). Кількість клітин в 5 великих квадратах додавали. Враховували лише ті сперматозоїди, головки яких знаходились в межах квадрата. Кількість сперматозоїдів визначали за формулою:

$$X = (N \times P \times 4000 \times 1000) / 80$$

де X – кількість сперматозоїдів у 1 мл, млрд.;

N – кількість сперматозоїдів, нарахованих у 5 великих квадратах;

P – розведення сперми;

4000 – коефіцієнт переведення в кубічні міліметри;

1000 – коефіцієнт переведення в мілілітри;

80 – кількість маленьких квадратів.

Ооцити кролів після дозрівання *in vitro* перед співкультивуванням із сперматозоїдами частково звільняли від клітин кумулюсу піпетуванням. Піпетування і 5–6-разове відмивання ооцитів після дозрівання виконували в середовищі TALP для відмивання. Сперматозоїди та ооцити спільно інкубували в середовищі TALP-IVF (табл.) з додаванням суміші ПГЕ (20 мкМ пеніциламіну (Sigma, P 4875), 10 мкМ гіпотаурину (Sigma, H 1384) та 1 мкМ епінефрину (Sigma, E 4250) впродовж 18 годин при концентрації рухливих сперматозоїдів  $1,5\text{--}2,0 \times 10^6$  сперматозоїдів/мл та температурі  $38,5^\circ\text{C}$  і 5%  $\text{CO}_2$  в атмосфері повітря і рН 7,8.

### **5. Культивування ембріонів кролів в умовах *in vitro***

Останнім етапом отримання ембріонів в умовах *in vitro* є їх культивування в поживному середовищі до розвитку із зиготи до стадії морули або бластоцисти. Цей процес включає в себе ядерні та цитоплазматичні модифікації та їх взаємодії, зміни в обміні речовин ембріона, ембріональні активації геному, експресію генів, формування морули, ущільнення бластомерів та формування з характерної структури бластоцисти [9].

Після сумісного з сперматозоїдами культивування яйцеклітини промивали у середовищі TALP для відмивання 3–5 раз та 2 рази в середовищі для культивування ембріонів.

Для подальшого культивування зиготи кролів розміщують в середовищі 199 на розчині Ерла з 10% фетальної сироватки теляти (ФСТ) і 0,068 мг/мл канаміцин сульфату при 5%  $\text{CO}_2$  в атмосфері повітря.

Культивувати зиготи кролів краще у присутності моношару епітеліальних клітин яйцепроводів корів (ЕКЯК). Відбір та постановку на культивування ЕКЯК проводять разом із відбором ОКК з яйцепроводу, який оточував яєчник з ознаками овуляції. Після звільнення від оточуючих тканин яйцепроводи промивають в PBS, який містив 0,075 мг/мл канаміцин сульфату. Одержання ЕКЯК здійснюють з допомогою піпетки Пастера і виконували їх 4-разове промивання в середовищі 199, яке містить 25 мМ буфера HEPES з додаванням 10% ФСТ і канаміцин сульфату. Кожне промивання розпочинали після осідання клітин у мірній пробірці та відбору

середовища (3,5–4 мл) до їх осаду. Після останнього осідання залишали суміш клітин об'ємом близько 1 мл, додавали 4 мл середовища для культивування ЕКЯК (199 на розчині Ерла з 10% еструсної сироватки крові корів і канаміцин сульфату), розпіпетовували та переносили в 4-лунковий пластиковий планшет по 0,5 мл в кожну лунку.

Протягом 48 годин культивування спостерігалася вйчаства активність ЕКЯК та початок формування моношару прикріплених до дна планшета ЕКЯК. Після відбору неприкріплених епітеліальних клітин яйцепроводів та заміни середовища культивування ЕКЯК на середовище для культивування ембріонів (199 на розчині Ерла з 10% ФСТ) зиготи культивували *in vitro* впродовж 4–8 днів.

Стадії розвитку ембріонів ідентифікували за допомогою морфологічної оцінки та за результатами аналізу цитогенетичних препаратів.

Сформовані 2-х клітинні ембріони за морфологічною оцінкою та аналізом цитогенетичних препаратів повноцінні та придатні до подальшого розвитку представлені на рис. 13, 14.

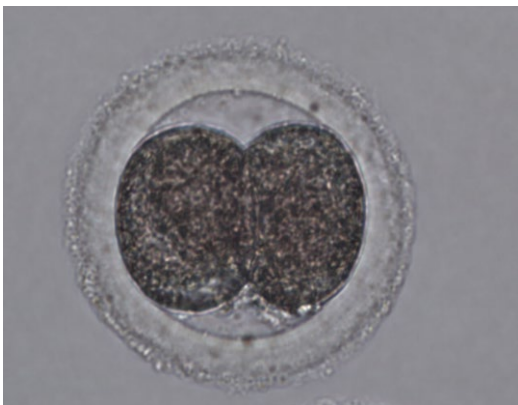


Рис. 13. Зажиттєве фото двоклітинного ембріона кроля, сформованого *in vitro*. Зб. об. 10х, ок. 10х

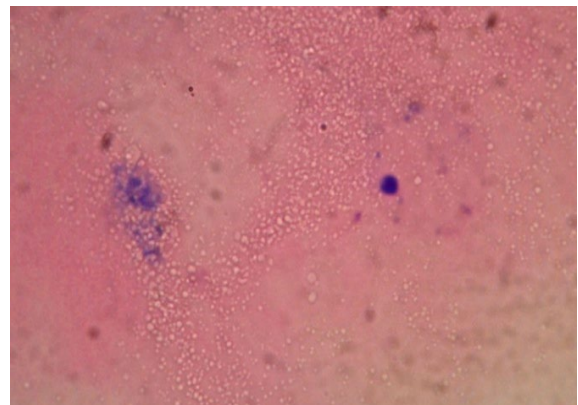


Рис. 14. Цитогенетичний препарат двоклітинного ембріона кроля, отриманого *in vitro* (стрілками вказані ядра). Зб. об.100х, ок. 10х.

Аналіз цитогенетичних препаратів отриманих ембріонів кролів підтверджує повноцінність ядер із ядерцями тих ембріонів, які і за візуальною морфологічною оцінкою були нормальними (рис. 15, 16).

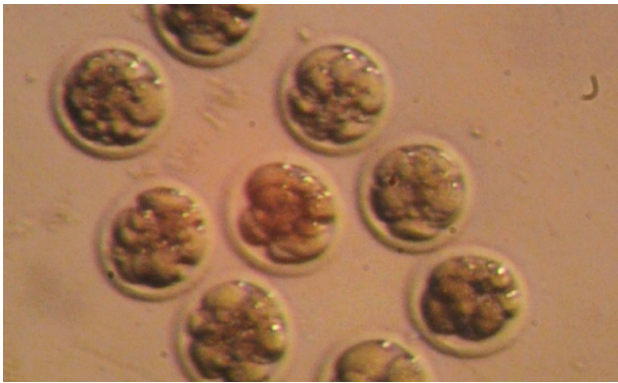


Рис. 15. Зажиттєве фото ембріонів кролів, сформованих *in vitro*.  
Зб. об.10х, ок. 10х.

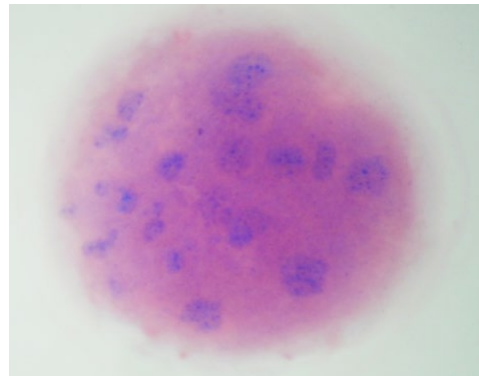


Рис. 16. Цитогенетичний препарат морули кроля, сформованої *in vitro* з морфологічно нормальними ядрами (n ядер = 19).  
Зб. об.100х, ок. 10х.

## **6. Приготування та аналіз цитогенетичних препаратів ооцитів та ембріонів**

Для дослідження хроматину частину гамет використовували для приготування сухоповітряних препаратів за допомогою модифікованого методу Тарковського [14]. Препарати дозволяють оцінити стадії мейотичного дозрівання ооцитів поза організмом та виявити хромосомні порушення у гамет і ембріонів (рис. 17).

Перед виготовленням препаратів предметні скельця обезжирюють 96%-етиловим спиртом.

Ооцити кролів переносили в 0,9% гіпотонічний розчин 3-заміщеного цитрату натрію на 10–15 хвилин, механічно звільняли їх від клітин кумулюсу та фіксували на сухому знежиреному склі сумішшю метанол-оцтової кислоти (3:1).

Всі робочі розчини готують безпосередньо перед використанням. Але перед використанням гіпотонічний розчин поміщають в холодильник, а фіксуючий розчин у морозильну камеру на 20–25 хвилин.

Ембріони кролів для приготування препаратів розміщували на 1–2 хвилини в 0,9% гіпотонічному розчині цитрату натрію і фіксували на сухому знежиреному склі сумішшю метанол-оцтової кислоти (2:1). Препарати фарбували 2% розчином барвника Гімза та аналізували під світловим мікроскопом.

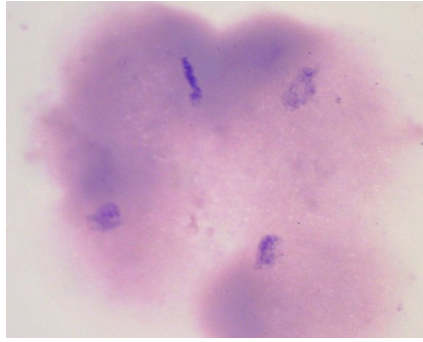


Рис. 17. Цитогенетичний препарат 4-х клітинного ембріона кроля, одержаного *in vitro*. Зб. об.100х, ок. 10х.

## 7. Перелік необхідного обладнання інструментів і реактивів

1. Мікроскоп МБС-9
2. Мікроскоп «Jenaval» (об. 10х, 90х м. ім., 100х м. ім., ок. 10х).
3. CO<sub>2</sub> – Інкубатор.
4. Центрифуга.
5. Аналітичні ваги.
6. Сушильна шафа.
7. Термостат.
8. Холодильник-морозильник.
9. Лабораторні столи.
10. Предметні і покривні скельця.
11. Хімічний посуд (стакани, колби, циліндри різного об'єму).
12. Мікродозатори на 1–10 мкл и 10–100 мкл.
13. Пробірки «Епіндорф» об'ємом 1,5–2,0 мл.
14. Чашки «Петрі» d = 90 и d = 40 мм.
15. Чашки культуральні 4-ти луночні.
16. Фільтри та фільтрувальні мембрани.
17. Хірургічні інструменти (ножиці, скальпелі, зажими, пінцети).
20. Шприци одноразові (1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл и 20 мл).
21. Спиртівки.
22. Вата хірургічна.
23. Маркери.
24. Спирт.



## Рекомендована література

1. Буркат В. П. Нанобиотехнологические методы для сохранения генофонда / В. П. Буркат, С. И. Ковтун, Н. П. Галаган // Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных : материалы междунар. науч.-практ. конф. – Дубровицы ; Быково. – 2007. – С. 450–452.
2. Дослідження ефективності формування ембріонів кролів *in vitro* / С. І. Ковтун, А. Б. Зюзюн, О. В. Щербак [та ін.] // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. – К. : Логос. – 2010. – Т. 9. – С. 152–156.
3. Зюзюн А. Б. Цитоморфологічні дослідження оцитів кролиць в процесі ембріогенезу *in vitro* / А. Б. Зюзюн // Розведення і генетика тварин : міжвід. темат. наук. зб. – К., 2016. – Вип. 52. – С. 181–186.
4. Зюзюн А. Б. Цитоморфологічні дослідження оцит-кумулюсних комплексів кролиць, одержаних із яєчників на різних фазах естрального циклу / А. Б. Зюзюн // Розведення і генетика тварин : міжвід. темат. наук. зб. – К., 2017. – Вип. 53. – С. 279–283.
5. Селекційні, генетичні та біотехнологічні методи удосконалення і збереження генофонду порід сільськогосподарських тварин / М. В. Гладій, М. І. Башенко, Ю. П. Полупан [та ін.] ; за ред. М. В. Гладія і Ю. П. Полупана ; ІРГТ ім. М.В.Зубця НААН – Полтава, Техсервіс, 2018. – С. 700–783.
6. Cervera, R. P. Oocyte and nuclear donor cell type affect the technical efficiency of somatic cloning in rabbits / R. P. Cervera, F. Garcia-Ximenez // *Zygote*. – 2003. – V. 11. – P. 151–158.
7. Cervera, R. P. Effects of the time interval between fusion and activation on *in vitro* rabbit nuclear transfer efficiency when nuclear donor cells are derived from older adults / R. P. Cervera, F. Garcia-Ximenez // *Zygote*. – 2004. – V. 12. – P. 133–141.
8. Kitajima, S. E. Rabbit Biotechnology rabbit genomics, transgenesis, cloning and models / S. E. Kitajima, J. Liu // *World Rabbit Science*. – 2009. – V. 5, № 6. – P. 37–48.
9. Miyano, T. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence / T. Miyano, N. Manabe // *Society for Reproduction and Fertility*. – 2007. – V. 63. – P. 531–538.

10. Notarianni, E. Reinterpretation of evidence advanced for neo-oogenesis in mammals, in terms of a finite oocyte reserve / E. Notarianni // *J. Ovarian Research*. – 2011. – V. 4. – P. 1–20.
11. Shiomi, M. A. Rabbit as a model for the study of human diseases / M. A. Shiomi // *World Rabbit Science*. – 2009. – V. 7, № 1. – P. 49–53.
12. Svensson, E. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation / E. Svensson, E. Markstom, R. Shao // *Reproduction*. – 2002. – V. 123 (1). – P. 23–30.
13. Tao, Y. Effects of cumulus cells on rabbit oocyte in vitro maturation / Y. Tao, C. Cao, M. Zhang // *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. – 2008. – V. 92, № 4. – P. 438–447.
14. Tarkowski, A. K. An air – drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A. K. Tarkowski // *Cytogenetics*. – 1966. – Vol. 5, № 3. – P. 394–400.

# ДЛЯ НОТАТОК

# **НАУКОВО–МЕТОДИЧНЕ ВИДАННЯ**

Зюзюн Аза Богданівна

Дзіцюк Валентина Валентинівна

Троцький Петро Анатолійович

## **МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ З ОТРИМАННЯ ООЦИТІВ ТА ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ КРОЛІВ В УМОВАХ *IN VITRO***

Комп'ютерна верстка та макетування П. А. Троцький

Підписано до друку 23.10.2018 р.

Формат 60 × 84 1/16

Ум. друк. арк. 1,2

Наклад 100 прим.