

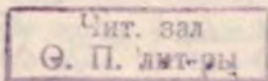
Министерство сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь
Белорусский научно-исследовательский
институт животноводства

НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНОВОДСТВА
В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

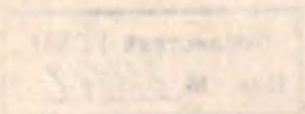
Межведомственный сборник

Выпуск 23

Начало



Минск 1992



гормона роста человека.

2. Установлена разница в живой массе трансгенного животного и однопометных животных.

УДК 636.2.082.26

В.И.Леткевич, С.В.Аbrasова, А.Н.Шевцов, Т.В.Расквезенок,

Белорусский научно-исследовательский институт животноводства

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ИМЪЕДИОННЫХ ХИМЕРНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Генетические химеры — продукт объединения нескольких эмбрионов разных животных, поэтому они обладают сложным комбинированным генотипом. Генетические химеры могут образовываться и на самых ранних стадиях эмбриогенеза вследствие патологии оплодотворения или спонтанного слияния эмбрионов, сбросивших зону пеллюцида. Для всех химер естественного происхождения характерен химеризм лишь в пределах одного-двух видов тканей, тогда как у искусственно созданных химер все ткани или большинство их содержат смешанные клетки.

Изучение химер важно для решения фундаментальных проблем биологии развития, выяснения судьбы отдельных клеток и тканей, их взаимодействия в процессе развития и экспрессии генов. Большой интерес представляют работы по определению биохимического обмена между клетками различного генотипа, соединенными в единую особь.

В задачи наших исследований входило: совершенствование методов гормональной стимуляции суперовуляции у овец, коз; вымывание эмбрионов на стадии морулы и бластоцисты; конструирование химер "овца-коза", техники пересадки их реципиентам.

В экспериментах использовали овец романовской породы и преркос, коз местной породы. Для получения достаточного количества эмбрионов на разных стадиях развития овец и коз доноров обраба-

ывали гипофизарным фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ-В). День прихода овец и коз в охоту считался "0" днем цикла. ФСГ вводили внутримышечно через 12 ч (утром и вечером) по 5-дневной и 4-дневной схемам (табл. 1, 2). При вызывании суперовуляции у овец и коз общая доза ФСГ-В при обработках составляла 1000-1100 ИЕ на животное. На 14-й день эстрального цикла опытных животных осеменяли баранами-производителями. На 19-20-й день эмбрионы вымывали хирургическим путем.

В качестве доноров использовали две овцы породы прекос и романовской, одну козу. Реципиентов готовили синхронно по отношению к донорам с учетом эстрального цикла. В качестве реципиентов использовали овец романовской породы и прекос.

Таблица 1. Гормональная обработка овец и коз ФСГ-В по 5-дневной схеме

День эстрального цикла	Препараты	Дни и время введения	
		8 ч	20 ч
1-й	Витамин А, ИЕ	75000	-
" "	Витамин Е, мг	50	-
2-й	Витамин А, ИЕ	35000	-
" "	Витамин Е, мг	25	-
9-й	ФСГ, мг	2,5	2,5
10-й	ФСГ, мг	2,5	2,5
11-й	ФСГ, мг	2,5	2,5
12-й	ФСГ, мг	2,5	2,5
" "	ФСГ, мг	2,5	2,5
" "	Простагландин, мкг	250	-
13-й	ФСГ, мкг	2,5	2,5

Таблица 2. Гормональная обработка животных ФСГ-В по 4-дневной схеме

День эстрального цикла	Препараты	Дни и время введения	
		8 ч	1 20 ч
I-я	Витамин А, ИЕ	75000	-
-"	Витамин Е, мг	50	-
2-я	Витамин А, ИЕ	35000	-
-"	Витамин Е, мг	25	-
10-я	ФСГ, ИЕ	200	200
11-я	ФСГ, ИЕ	150	150
12-я	ФСГ, ИЕ	100	100
	Простагландин, мкг	250	-
13-я	ФСГ, ИЕ	75	75

Хирургическое извлечение эмбрионов у доноров и пересадку реципиентам осуществляли по следующей схеме.

Животных фиксировали на операционном столе. За 5 мин до операции вводили 5-7 мл наркотического вещества (калипсовет). Затем операционное поле тщательно выбривали, вымывали и обрабатывали спиртовым раствором йода. Место операции изолировали от окружающих тканей стерильной марлевой салфеткой. Разрез делали по белой линии живота в области тазобедренной впадины. Извлекали рога матки, яйцеводы и яичники. При визуальном подсчете учитывали количество овулировавших фолликулов на левом и правом яичниках.

Яйцеводы промывали специально изготовленной канюлей с расширенным наконечником. Эмбрионы на более поздних стадиях развития /для получения морул и blastocyst/ вымывали от места бифуркации рогов матки до воронки яйцевода.

Конструирование химерных организмов "овца-коза" осуществляли следующим образом. Вымытые козы эмбриональные клетки помещали на предметное стекло с лункой со средой ФЭС + 20% инактивированной сыворотки. Подводили к капле микроприсоску и инъекционную иглу. С ее помощью разрывали зону *pellucidi*, засасывали отдельные бластомеры козьих морул, после чего микроприсоской фиксировали бластоцисту овцы и быстро вводили в нее бластомеры козы. Все операции выполнены с помощью микроскопа "Cassia" /x140/ и микроманипулятора КМ 2. Строго следили за тем, чтобы бластомеры не вышли обратно через прокол. Химерные эмбрионы помещали в среду ФЭС + 20% инактивированной сыворотки для временного культивирования (I-I,5 ч). После морфологической оценки качества эмбрионов трансплантировали их овце-реципиенту в рог матки. Применение гипофизарного гормона ФСГ в последующих пяти экспериментах проводили по схеме 2, т.е. вводили понижающие дозы. В среднем было получено 12 овулировавших фолликулов на овцу-донора и 16 - на козу-донора.

Из вымытых зигот было сконструировано восемь химерных эмбрионов, которые трансплантировали в рога матки трем овцам-реципиентам. Получено два ягненка. Один пал в первые часы жизни. У второго ягненка взяты образцы крови на генетическую экспертизу происхождения потомков по группам крови. Образцы также взяты от отца, матери романовской породы и козы.

Выводы

1. Применение гипофизарного гормона ФСГ-Б для вызывания суперовуляции у овец, коз на 10-13-й, 9-13-й дни эстрального цикла дало схожие результаты. Однако 4-дневная схема гормональной обработки предпочтительнее при понижающих дозах фолликуло-стимулирующего гормона.

2. Наилучшим временем для получения морул и бластоцист овец и коз является 5-7-й день со дня покрытия.

3. Приживляемость сконструированных эмбрионов зависит от следующих факторов: качества эмбрионов перед микроинъекцией; синхронной подготовки доноров и реципиентов по эстральному циклу; качества эмбрионов после микроинъекции.