

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Факультет ТВПШТСБ**  
**Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології**

## **Основи біотехнології тварин**

**Методичні рекомендації для лабораторних та практичних занять**  
**для здобувачів ступеня вищої освіти «бакалавр» спеціальності**  
**162 «Біотехнологія та біоінженерія»**  
**денної форми навчання**

**Миколаїв**

**2016**

УДК 606 : 636

ББК 45.33

О-75

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВПШТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 26.11.2016 р., протокол № 3.

Укладач:

С І. Луговий – канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету.

Рецензенти:

В. М. Іовенко – д-р с.-г. наук, професор, завідувач відділу генетики та біотехнології Інституту тваринництва степових районів імені М. Ф. Іванова «Асканія-Нова» – Національного наукового селекційно-генетичного центру з вівчарства;

В. О. Мельник – кандидат біол. наук, доцент, доцент кафедри зоогієни та ветеринарії Миколаївського НАУ.

**ЗМІСТ**

Вступ	4
Обладнання лабораторії біотехнології тварин	5
Лабораторний інвентар	11
Правила роботи з лабораторним інвентарем	17
Методи вилучення ембріонів	26
Полімеразна ланцюгова реакція	30
Рекомендована література	36

## **ВСТУП**

На сьогодні все більш очевидним стає факт, що традиційні методи селекції в тваринництві не можуть обійтися без біотехнологічних прийомів і методів.

Основою методів біотехнології тварин стали теоретичні розробки стосовно штучного запліднення, гормонального регулювання репродуктивної функції, трансплантації ембріонів у тварин. Перспективи використання методів біотехнології в практиці розведення тварин настільки грандіозні, що вже сьогодні в ряді країн ці дослідження поставлені на комерційну основу.

Засвоївши всі методи поводження з лабораторним інвентарем, вивчивши технічне оснащення і організацію роботи лабораторії, студент зможе, в майбутньому, вільно орієнтуватися в різних роботах, пов'язаних з лабораторними дослідженнями з біотехнології в тваринництві.

## ОБЛАДНАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТВАРИН

**Мета заняття:** ознайомитися із обладнанням лабораторії біотехнології тварин

Обладнання та прилади, наявні в лабораторії біотехнології тварин, залежно від мети призначення, поділяють на два класи: загальні та спеціальні. Перші є у всіх лабораторіях, другі – строго спеціалізовані.

До приладів загального призначення відносять:

1. **Дистилятор** – прилад, що дозволяє отримувати дистильовану воду. Ця вода майже не містить неорганічних і органічних речовин. Її отримують шляхом перегонки водопровідної води. Воду перетворюють на пар і конденсують. Таку воду застосовують для приготування розчинів, ополіскування посуду після миття і т. ін.



*Рис. 1. Дистилятор*

2. **Термостат** – прилад, що дозволяє підтримувати температуру на одному рівні. Термостати бувають рідинні і повітряні. Для перших теплоносієм є вода, для других – повітря (рис. 2, 3). Для біотехнологічних робіт застосовують повітряні термостати з електричним обігрівом, забезпечені терморегулятором і термометром.



*Рис 2. Термостат сухоповітряний  
ТВЛ-К120*



*Рис 3. Термостат рідинний  
циркуляційний LOIP LT-105a*

3. Електрична сушильна шафа – прилад, що дозволяє сушити посуд гарячим повітрям. Живлення нагрівальних елементів здійснюється від електромережі. Максимальна температура, яка може бути досягнута всередині шафи, становить близько 125-250°C. Час розігрівання – 30-60 хв. (рис. 4).



*Рис 4. Шафа сушильна ШС-0,25-20-М*

4. **Автоклав** – прилад, в якому проводиться стерилізація парою під тиском. Автоклав – це металевий казан з подвійними стінками. Простір між

зовнішньою і внутрішньою стінкою під кришкою автоклава сполучається з простором усередині котла.



*Рис. 5. Автоклав*

Через воронку водомірного скла між стінками автоклава заливається вода до рівня, який зазначається на водомірному склі. Всередину автоклава укладають бікси, наповнені предметами, що стерилізуються, кришку автоклава щільно закривають і пригвинчують гвинтами. При кипінні вода випаровується, пар заповнює весь простір в автоклаві. Оскільки виходу для пара немає, в автоклаві починає підвищуватися тиск і температура. Вони швидко досягають рівня, при якому життя мікробів неможливе. Тиск і температура всередині автоклава визначаються за манометром, встановленим на бічній стінці автоклава.

**5. Баня водяна електрична** – прилад, який використовується для нагріву. Водяні бані застосовують тільки в тих випадках, коли потрібно нагрівання не вище 100°C. Бані закриваються зверху рядом концентричних кілець, що налягають одне на інше.



*Рис. 6. Водяна баня LOIP LB-140*

Нагрівання на водяній бані можна проводити двома способами:

- посуд, що обігрівається занурюють в киплячу воду – в цьому випадку температура нагріву досягає 100°C;
- посуд, що обігрівається не торкається води і нагрівається лише водяною парою, температура нагріву на кілька градусів нижче 100°C.

В баню наливають воду так, щоб до країв залишалося 2-3 см. Посуд, що нагрівається поміщають на кільце такого діаметру, щоб своєю нижньою частиною він перебував на 1,5-2 см всередині бані.

6. **Холодильник** – використовують для зберігання медикаментів, розчинів і поживних середовищ.

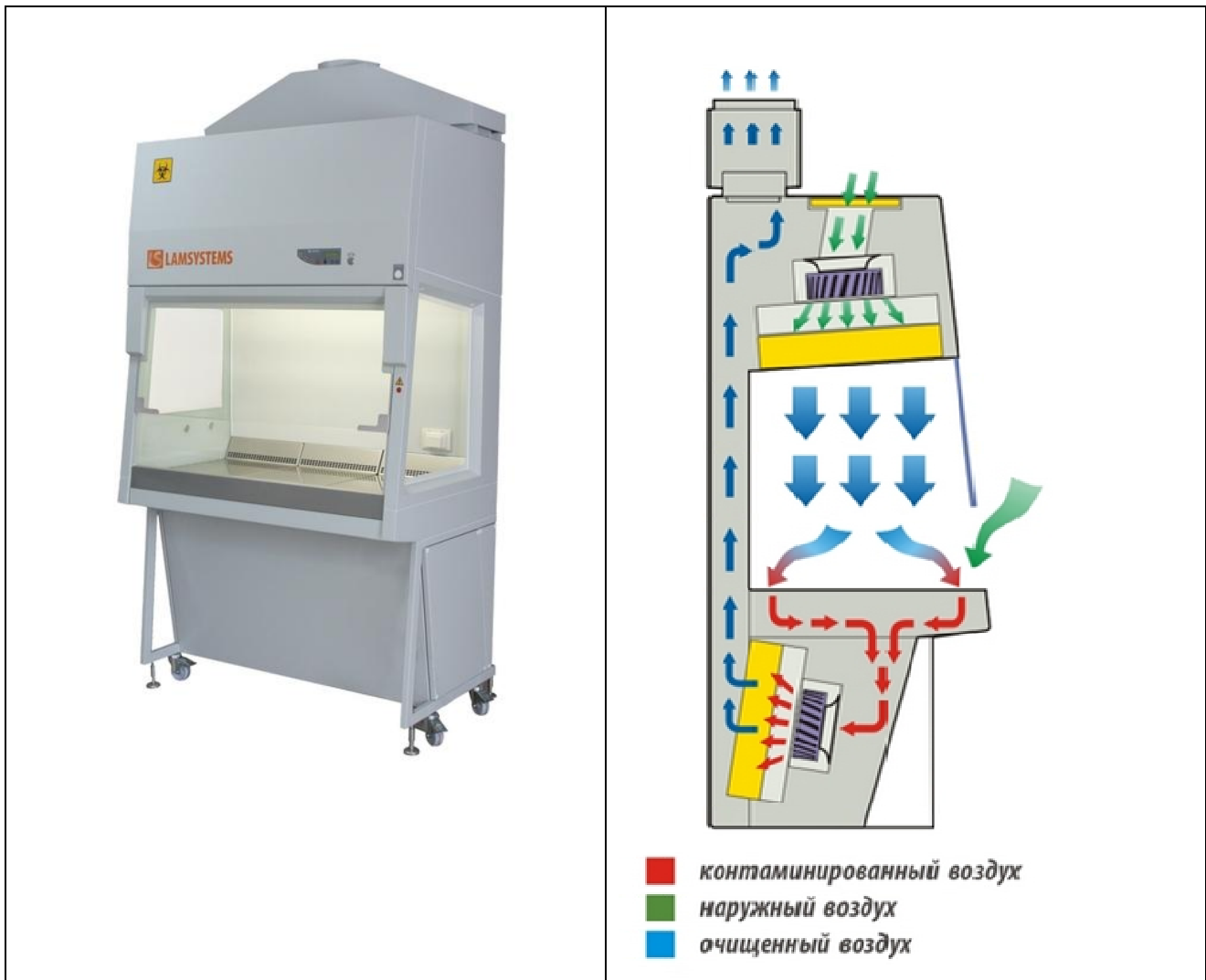
**Спеціальним обладнанням** лабораторії є: мікроскопи – інвертований і бінокулярний стереоскопічний (серії МБС); термостат-інкубатор; заморожувач пристрій і посудина Дьюара, мікроманіпулятор з мікрокузнею і багато іншого:

7. **Ламінарний бокс** – це пристрій, завдяки якому забезпечується повна ізоляція і стерильність при роботі з гаметами і ембріонами.

Конструкція ламінарного боксу заснована на тому, що поверхня столу ізольована скляним «ковпаком», а всередині зосереджені необхідні прилади. Обов'язковим внутрішнім атрибутом даного столу є інвертований мікроскоп і



мікроманіпулятор, за допомогою яких виконують різні мікроклітинні маніпуляції з ембріонами або гаметами тварин (рис. 7).



*Рис. 7. Ламінарний бокс та схема повітряних потоків у ньому*

У ембріокультуральних дослідженнях застосовують також ламінарні бокси, призначені для приготування поживних середовищ. При цьому ламінарний бокс першого типу не повинен перебувати в одному приміщенні з ламінарним боксом другого типу.

8. **Мікрокузня** – це прилад, призначений для виготовлення мікроінструментів. Мікроінструменти виготовляються зі скляних гачків, голок і капілярів із застосуванням спиртового пальника (спиртівки).



*Рис. 8. Мікрокузня*

9. **Термостат-інкубатор** – прилад, призначений для культивування гамет і ембріонів і створення гаметам умов для успішного запліднення. Даний інкубатор розрахований на  $37,0-37,5^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) і містить  $5\% \text{CO}_2$  в повітрі. Система контролю концентрації  $\text{CO}_2$  зазвичай входить в конструкцію інкубатора.

Завдяки такому термостату в умовах *in vitro* ембріони і гамети отримують все необхідне для повноцінного розвитку в «культурі».

10. **Мікроскоп серії МБС** – прилад, призначений для ембріокультуральних досліджень (оцінка, селекція і відбір ембріонів).

11. **Мікроманіпуляційна система** – обладнання, призначене для клітинних технологій.

## ЛАБОРАТОРНИЙ ІНВЕНТАР

**Мета заняття:** ознайомитися із інвентарем лабораторії біотехнології тварин

В лабораторії біотехнології тварин до лабораторного інвентарю можна віднести скляний посуд, гінекологічні інструменти, хірургічні інструменти і хірургічну білизну. Сучасний лабораторний інвентар (посуд, інструменти, білизна) дуже різноманітний. У цьому розділі розглядається тільки той інвентар, який найбільш часто застосовується в навчальному процесі при постановці біотехнологічних досліджень на тваринах.

### 1. Лабораторний скляний посуд.

Скляний посуд, що застосовується в лабораторії, залежно від призначення, ділять на: 1) загальний, 2) спеціальний і 3) мірний.

До групи **загального призначення** відносяться ті предмети, які завжди повинні бути в лабораторії і без яких не можна провести більшість робіт.

До них відносять:

1. **Пробірки** – це вузькі циліндричної форми посудини з заокругленим дном; вони бувають різної величини і діаметра. Їх використовують в різних маніпуляціях при ембріокультуральних дослідженнях. Зберігаються в штативах.

2. **Чашки Петрі** – це круглі плоскодонні чашки, використовуються для збору ембріонів, фолікулів і сперматозоїдів. Це необхідний атрибут при культивуванні і екстракорпоральному заплідненні.

3. **Лабораторні склянки і конічні колби** – тонкостінні циліндри різної ємності, широко застосовуються в роботах, пов'язаних з приготуванням середовищ.

4. **Предметні і покривні скла** – плоскі прямокутної форми скляні предмети, необхідні для проведення робіт з клітинної селекції.

До групи **спеціального призначення** відносяться ті предмети які вживаються для однієї якої-небудь мети. До них відносять:

5. **Спермоприймач** – це скляний двостінний дзвоноподібний з циліндричної колбою на кінці посуд, який використовується для отримання сперми.

6. **Скляні гачки, голки, капіляри, які мають мікроскопічні розміри і виготовляються на спеціальних пристроях – «мікрокузнях».** Широко застосовуються в різних мікрохірургічних маніпуляціях для здійснення механічного впливу на клітини.

7. **Скляні піпетки,** необхідні для перенесення ембріонів при ембріокультуральних дослідженнях.

**Мірний посуд,** необхідний для вимірювання об'єму рідини. До нього відносять:

8. **Мірні циліндри і мензурки** – це скляні посудини циліндричної або конічної форми, на стінці яких є шкала розподілу. Вони необхідні при роботах, пов'язаних з ембріокультуральними дослідженнями, штучним осіменінням та трансплантацією ембріонів.

9. **Піпетки і мікропіпетки** – використовують для відмірювання малої кількості рідин, ємністю 1, 2, 3, 4 і 5 мл.

2. **Гінекологічний інструментарій** необхідний при роботах пов'язаних з біотехнологією відтворення сільськогосподарських тварин.

До найбільш часто використовуваних відносять:

1) **півхове дзеркало,** призначене для дослідження півхи і півхової частини шийки матки (рис. 9.);



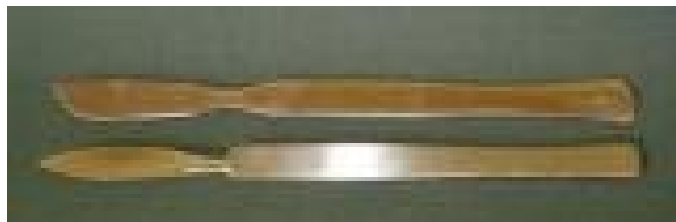
*Рис. 9. Піхвове дзеркало*

2) катетери різних конструкцій, які використовуються при штучному заплідненні і трансплантації ембріонів.

### 3. Хірургічний інструментарій.

До інструментів, що найбільш часто використовуються при трансплантації ембріонів хірургічним способом відносять:

1) черевцевий скальпель, який призначений для поверхневого неглибокого розрізу;



*Рис. 10. Скальпелі*

2) ножиці прямі загострені і ножиці Купера – застосовують для роз'єднання тканин;



*Рис. 11. Хірургічні ножиці*

3) затискач Кохера, затискач «москіт» – це кровоспинні затискачі;



Зажим кровоспинний типу «Москіт», вигнутий по ребру



Кровоспинний затискач Кохера має зубці на кінці. При змиканні один зуб входить в проміжок між двома зубцями, забезпечуючи міцну фіксацію на кінці судини.

Зажим Кохера прямий кровоспинний

4) пінцет хірургічний і анатомічний застосовують для захоплення тканин, утримання їх у зручному для зшивання або розділення положенні;



5) цапка для білизни, необхідна для фіксації простирадла (або серветки) з отвором на операційному полі тіла тварини;



6) гачок чотирьохзубчатий гострий і тупий, ранорозширювач Микулича – з їх допомогою здійснюють розширення ран і утримання їх в потрібному стані;



7) вигнута або напівкругла хірургічна голка необхідна для закриття операційних ран шкіри з метою відновлення їх цілості і створення умов для сприятливого перебігу процесу загоєння; завдяки голці шовний матеріал (кетгут) проводять через тканини;



8) шприци місткістю 5, 10 мл застосовують для введення рідких форм лікарських речовин або біологічних препаратів в товщу тканин або порожнини організму;

9) шприци об'ємом 20 мл застосовують для промивання геніталій з метою вимивання ембріонів;

10) голки ін'єкційні різної довжини і діаметра до шприців.

4. Хірургічна білизна. При використанні хірургічного методу трансплантації ембріонів необхідна також наявність хірургічної білизни, це:

1) простирадла розміром 50×50 з отвором посередині, призначені для покриття операційного поля (розмір простирадла залежить від розміру тварин);

2) тампони (використовують при хірургічних маніпуляціях);

3) рушники, халат, ковпак;

4) гумові хірургічні рукавички.



## **ПРАВИЛА РОБОТИ З ЛАБОРАТОРНИМ ІНВЕНТАРЕМ**

**Мета заняття:** ознайомитися з правилами зберігання, миття, сушіння та стерилізації лабораторного інвентаря лабораторії біотехнології тварин

Успіх будь-якого наукового експерименту вимагає дотримання чистоти і стерильності. Працюючи з лабораторним інвентарем необхідно забезпечити його безвідмовну і тривалу службу, що можливо при зберіганні та використанні лабораторного інвентаря в сприятливих умовах. Тому, працюючи в лабораторних умовах, необхідно володіти основними правилами щодо догляду, зберігання і використання лабораторного інвентаря. Засвоївши всі методи миття, сушіння та стерилізації лабораторного інвентаря, вивчивши технічне оснащення і організацію роботи лабораторії, студент зможе, в майбутньому, вільно орієнтуватися в різних роботах, пов'язаних з лабораторними дослідженнями з біотехнології в тваринництві.

### **Зберігання лабораторного інвентаря.**

Утримання лабораторного інвентаря в сприятливих умовах, ретельний догляд за ними забезпечують безвідмовність у роботі і тривалу його службу.

Від правильного догляду і зберігання залежить довговічність лабораторного інвентаря. Тому необхідно дотримуватися таких правил при роботі з лабораторним інвентарем:

1) інвентар, що був у вжитку повинен бути негайно вимитий теплою водою з милом, причому дуже ретельно щіткою промиваються нерівні поверхні і місця з'єднань частин інструменту;

2) вимиті інструменти і посуд ретельно висушуються в сушильній шафі, замки на інструментах змащуються вазеліном і потім інструменти розкладаються або розвішуються в інструментальних шафах, а посуд – в лабораторних шафах;

3) не можна допускати появи іржі на інструментах, яка дуже швидко з'являється при зберіганні у вологих умовах або недостатньому видаленні вологи з замків;

4) всі ріжучі інструменти повинні бути гострими;

5) ін'єкційні голки після промивання зберігають зі вставленими в них мандренами в закритій посудині, наповненій спиртом навпіл з ефіром;

6) шприци зберігають у розібраному вигляді;

7) кетгут зберігають в 4%-вому водному розчині формаліну;

8) гумові предмети поміщають окремо від металевих інструментів.

Догляд за рукавичками – це один з найважливіших моментів асептики. Після роботи рукавички ретельно миють, одночасно перевіряють їх цілість. Для цього рукавички надувають, найкраще закручуванням, і занурюють у воду.

Дефект в рукавичці легко визначається за повітряними бульбашкам, що з'являються.

З усього вищевикладеного випливає, що після використання посуду і інструментарію необхідно провести наступні етапи робіт: очищення, миття, сушіння і перед вживанням – стерилізація.

### **Миття лабораторного інвентаря.**

Уміння мити лабораторний скляний посуд, хірургічний і гінекологічний інструментарій є тією частиною лабораторної техніки, знання якої обов'язкове для кожного працівника лабораторії.

Лабораторний посуд і інструментарій повинні бути абсолютно чистими, без виконання цієї умови працювати не можна. Тому слід навчитися мити посуд і інструменти до повної впевненості в їх чистоті. Способи миття посуду та інструментів різні й залежать від типу забруднення. Видалити забруднення зі стінок посуду можна різними методами: механічними, фізичними, хімічними, фізико-хімічними або комбінуючи їх.

Щоб вибрати спосіб миття посуду та інструментів в кожному окремому випадку необхідно наступне:

1. Знати властивості забруднюючих посуд речовин.

2. Для миття можуть бути використані всі речовини, що володіють поверхнево-активними властивостями (мило, синтетичні миючі речовини, миючі глини і ін.).

3. Якщо осад, що забруднює посуд і інструментарій є хімічно стійким, для його видалення можна застосувати механічну очищення (за допомогою йоржів і ін.).

4. Хірургічні та гінекологічні інструменти ретельно миються щіткою особливо в місцях, що мають нерівні поверхні і місця з'єднання частин інструменту.

5. Потрібно завжди пам'ятати про техніку безпеки та імовірність нещасних випадків при митті посуду. Кожен новий працівник лабораторії повинен бути ознайомлений з правилами техніки безпеки.

#### Миття водою

Скляний посуд вважається чистим, якщо на його стінках не утворюється окремих крапель і вода залишає рівномірну тонку плівку.

Правила миття скляного посуду:

1. Якщо на стінках посуду є наліт або осад, посуд очищають (попередньо змочивши водою) щіткою або йоржем і вже потім остаточно миють водою. Посуд миють у теплій воді.

2. При роботі з йоржем потрібно стежити, щоб нижній кінець його не вдаряти ні об дно, ні об стінки посуду, оскільки цим кінцем можна вибити дно або проломити стінку. Щоб запобігти можливості розбивання посуду металевим кінцем йоржа, на його кінчик потрібно надіти шматочок гумової трубки відповідного розміру.

3. Добре вимитий в теплій воді посуд обов'язково споліскують дистильованою водою для видалення солей, що містяться у водопровідній воді.

4. У раковину не можна викидати біологічні препарати (геніталії), перев'язувальні матеріали, що одержують при роботі.

#### Миття парою.

Посуд не завжди може бути відмитий однією водою, наприклад, таким шляхом не можна відмити забруднення жировими речовинами. У цих випадках кращих результатів можна досягти, якщо мити посуд струменем гарячої водяної пари.

Миття іншими миючими засобами.

Для миття посуду можна застосовувати і інші речовини, наприклад, мило або спеціальні миючі синтетичні речовини.

При митті водою з миючими засобами корисно помістити в колбу кусочки чистого фільтрувального або будь-якої іншого м'якого паперу. При струшуванні колби папір механічно видаляє зі стінок забруднення, що до них пристало.

Абсолютно неприпустимо застосовувати для очищення посуду пісок, оскільки він дряпає скло. Посуд, що має подряпини, при нагріванні руйнується.

### **Сушіння лабораторного інвентаря.**

Іноді вимитий посуд повинен бути добре висушений. Розрізняють методи холодного сушіння (без нагрівання) і гарячого (при нагріванні). Якщо роботу проводять з водними розчинами, то, як правило, сушіння посуду нераціональне.

Сушіння на кілочках.

Це найпоширеніший спосіб сушіння посуду. У лабораторії повинна бути спеціальна дошка з кілочками, яку зазвичай поміщають над раковиною для миття посуду. Вимитий посуд надягають на ці кілочки і залишають на них до тих пір, поки він не висохне.

Потрібно стежити за чистотою кілочків і протирати їх, оскільки на вологих кілочках легко утримується пил і випадкові забруднення. Щоб уникнути забруднення посуду від кілочків, їх можна обгортати чистим фільтрувальним папером і вже потім надягати на них посуд.

Сушіння повітрям.

Вимитий посуд можна висушити струменем повітря. Для цієї мети слід застосовувати гумові груші. Сушити можна як холодним, так і нагрітим

повітрям. Через висушуваний посуд продувають повітря до повного видалення слідів вологи.

#### Сушіння спиртом і ефіром.

Обтерши посудину зовні чистим рушником, споліскують його спочатку чистим етиловим спиртом, а потім чистим діетиловим (сірчанним) ефіром. Пари ефіру видаляють продуванням холодного повітря.

#### Сушіння в сушильній шафі.

Швидко висушити посуд можна також в сушильній шафі. Звичайно в сушильну шафу посуд ставлять після того як він деякий час постояв перевернутим (на кілочках) для видалення води. Сушкування проводять при температурі 80-100°C протягом 30-60 хв. Перед сушінням на полицю шафи слід покласти шматок чистого фільтрувального паперу.

Посуд при висушуванні в сушильній шафі не слід ставити догори дном, так як це уповільнює випаровування парів води. Після сушіння в сушильній шафі посуд відразу застосовувати не можна, йому потрібно спочатку дати охолонути.

Таким чином, при митті і сушінні лабораторного посуду та інструментів необхідно пам'ятати наступне:

1. Посуд завжди повинен бути чисто вимитим і обполіснутим дистильованою водою;
2. При роботі з йоржем потрібно стежити, щоб нижнім його кінцем не проткнути дно або не пробити стінку посуду;
3. При сушінні посуду треба стежити, щоб він не забруднився;
4. Вибираючи спосіб миття, перш за все, потрібно враховувати, якою речовиною забруднено даний посуд;
5. При митті посуду слід дотримуватися правил техніки безпеки та санітарії. Мити посуд бажано в гумових рукавичках;
6. Для відмивання забруднень слід застосовувати найбільш дешеві матеріали;

7. Хірургічні та гінекологічні інструменти після миття обов'язково потрібно висушити. Неприпустимо інструменти зберігати у вологих умовах. Тому їх висушують в сушильних шафах. Сушіння інструментів проводять при температурі 100-120°C протягом 40-80 хвилин. До наступного застосування інструменти зберігають в інструментальних шафах А перед повторним застосуванням – стерилізують.

### **Стерилізація лабораторного інвентаря.**

Знищення мікробів і їх спор на хірургічній білизні, інструментарії і лабораторному посуді називають *стерилізацією*. Способи стерилізації різні й залежать від виду матеріалу, що стерилізується.

Правила стерилізації лабораторного інвентаря:

1. **Всі металеві інструменти, скляний посуд** стерилізують кип'ятінням. Перед кип'ятінням інструменти очищають від мастила, що їх покриває, ін'єкційні голки звільняють від мандренів, гострі частини інструментів, а також скляний посуд загортають в марлю. Шприци стерилізують в розібраному вигляді, попередньо загорнувши в серветку.

У стерилізатори наливають воду, кип'ятять протягом приблизно 15 хв, потім додають луг (1%-ний натрій карбонат, 0,1%-вий гідроксид натрію), які підвищують ефект стерилізації і кип'ятять ще приблизно 3 хв і тільки після цього на знімну решітку за допомогою пінцета обережно укладають інструменти; решітку опускають спеціальними гачками в воду, закривають кришку і кип'ятять протягом 15 хв. з  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  або 10 хв. з  $\text{NaOH}$ .

Після кип'ятіння решітку з інструментами витягують зі стерилізатора і перекладають на операційний інструментальний столик.

2. **Кетгут** виготовляють з підслизового шару кишечника дрібної рогатої худоби. Кетгут має властивість розсмоктуватися в тканинах тваринного організму в терміни від 7 до 30 днів. Випускають кетгут в стерильних ампулах або в мотках, що вимагають стерилізації. Найбільш простий і швидкий спосіб

стерилізації – це спосіб Покотило, коли кетгут поміщають на 72 години в 4%-ний водний розчин формаліну.

**3. Стерилізація перев'язувального матеріалу, білизни і предметів хірургічного ужитку.** Для стерилізації операційної білизни, перев'язувального матеріалу і рукавичок, а також інструментарію використовуються спеціальні металеві посудини – так звані бікси (рис. 12). Бікси служать для зручності заповнення автоклава, для перенесення стерильної білизни в операційну і зберігання стерильної білизни.

Бікс є металевою нікельованою коробкою з кришкою, що щільно закривається і застібається. Бокова стінка подвійна, причому зовнішня стінка зміщується і має кілька великих прорізів, внутрішня – нерухома і в ній є дрібні отвори, що займають площу, рівну прорізам на зовнішній стінці.



*Рис. 12. Бікси*

Коли бікси нестерильні, отвори на внутрішній стінці встановлюються проти прорізів на зовнішній стінці (решітка відкрита). Після стерилізації решітка закривається. Це досягається зміщенням зовнішньої стінки.

Бікси перед заповненням матеріалом, призначеним для стерилізації протирають і обов'язково відкривають решітки. Заповнюють бікси матеріалом не туго, тому що в протилежному випадку може не відбутися стерилізації білизни, що знаходиться всередині.

Зазвичай бікси заряджають однорідним матеріалом, наприклад в один бікс укладають халати, простирадла і рушники, в іншій – марлеві серветки, кульки, бинти, дерев'яні палички з накрученою на них ватою, в третій – рукавички, гумові дренажі. До ручки кришки прив'язують клейончатий ярлик із зазначенням виду матеріалу, кількості, дати стерилізації.

При відсутності спеціальних біксів операційну білизну, перев'язувальний матеріал можна стерилізувати в мішках з щільної тканини.

При температурі 120-134°C і тиску не вище 2 атм. через 30-45 хвилин досягається повна стерильність всіх предметів. Однак не можна у всіх випадках проводити стерилізацію при 2 атм. Деякі предмети можуть псуватися при даній температурі. Так, рукавички і вироби з деяких пластмас треба стерилізувати при 1 атм. протягом 45-60 хвилин.

Автоклавування проводять в наступному порядку:

- в автоклав заливають воду до мітки, встановленої на водомірному склі (при надмірній кількості води можливо закидання її всередину автоклава);
- в автоклав закладають предмети, що будуть стерилізуватися (бікси з відкритими решітками, мішки) і кришку автоклава міцно загвинчують;
- закривають всі крани, крім крана, що сполучається з внутрішньою частиною автоклава і призначений для видалення повітря;
- вмикають підігрів, і через деякий час з відкритого крана починає надходити пар. Після того як пар почне виходити сильним струменем, кран закривають;
- коли на манометрі стрілка піднімається до 1 атм., кран знову відкривають. Цим повністю видаляють атмосферне повітря, надлишок вологи, що осідає на холодних предметах, що знаходяться всередині автоклава;
- з моменту, коли стрілка манометра знову встановиться на цифрі «1», починають відлік часу стерилізації. Зміною ступеня нагріву або видаленням частини пару через запобіжний клапан підтримують необхідну температуру і тиск.



- через 30-45 хвилин від початку стерилізації вимикають нагрівальний прилад і через крани випускають пару з автоклава. Кришку автоклава відгвинчують тоді, коли на манометрі стрілка вкаже «0».

Простерилізована білизна має бути завжди сухою, в іншому випадку стерильність її сумнівна.

Операційний білизна при стерилізації може стати мокрою, якщо:

- 1) автоклав переповнений водою, яка при кип'ятінні закидається всередину автоклава;
- 2) не видалити частину пару перед початком відліку часу стерилізації;
- 3) залишити охолоджуватися бікси в автоклаві;
- 4) гарячі стерильні бікси винести на холод або в вологе приміщення.

**4. Стерилізація рукавичок.** Стерилізація рукавичок може бути здійснена в автоклаві, кип'ятінням і зануренням в антисептичні розчини. Перед стерилізацією в автоклаві рукавички необхідно після висушування покрити шаром тальку як всередині, так і зовні. Крім того, для попередити склеювання, кожену рукавичку окремо обгортають шаром марлі. У біксах рукавички не повинні стикатися з його стінками, для чого на дно вкладають рушник або шар серветок.

Стерилізація шляхом кип'ятіння здійснюється в дистильованій воді протягом 20-35 хвилин. Холодна обробка полягає в зануренні рукавичок в 2%-ний розчин хлораміну на 15-30 хвилин або в розчин сулеми 0,1% (1:1000) на 1,0-1,5 години з наступним промиванням стерильним фізіологічним розчином або дистильованою водою, висушуванням, обробкою тальком і зберіганням в стерильних біксах.

Перед операцією рукавички, одягнуті на руки, незалежно від способу стерилізації протягом 2 хвилин обробляють спиртом.

## МЕТОДИ ВИЛУЧЕННЯ ЕМБРІОНІВ

**Мета заняття:** ознайомитися з існуючими методами видобування ембріонів ВРХ та дати їх порівняльну оцінку

**Хірургічне видобування ембріонів з рогів матки шляхом лапаротомії по білій лінії.** Витримують тварину два дні на голодній дієті, вводять їй внутрішньом'язово для заспокоєння ромпун чи комбелен. Фіксують на операційному столі в спинному положенні і проводять операцію під загальним наркозом. Підготувавши операційне поле, розрізають черевну стінку по білій лінії довжиною 15-20 см спереду молочної залози, виводять назовні один ріг матки з яйцепроводом і яєчником і підраховують в ньому кількість жовтих тіл. Фіксують тіло матки в раневому отворі, проколюють стінку рога матки біля біфуркації гострим гемостатичним пінцетом і вводять через утворений отвір стерильний катетер Фолея з надувною кулькою, нагнітають в неї повітря і приступають до вимивання ембріонів матковим чи матково-трубним методом. В першому випадку проколюють верхівку рога матки тупою голкою з оливою для введення промивної рідини і вводять у просвіт рога порційно 120-140 мл рідини Дюльбекко.

Збирають промивну рідину через катетер Фолея в стерильну посудину. Аналогічно чинять з другим рогом матки.

При матково-трубному промиванні (застосовується на 3–5-й день після осіменіння) тупу голку з еластичним шлангом вводять в ампульну частину яйцепроводу і промивають так же.

Закінчивши промивання, опускають матку на своє місце, перевіряють правильність розміщення її рогів, зрошують черевну порожнину фізіологічним розчином, впорскують у неї 1 млн ОД пеніциліну та стрептоміцину, розчинених в 20 мл новокаїну. Накладають кетгутні шви на очеревину, м'язи разом з підшкірною клітковиною, припудрюють поверхню рани порошком трициліну, накладають шовковий шов на шкіру, обробляють її 10%-ним розчином йоду і обробляють клейовим аерозолем.

**Хірургічне видобування ембріонів з рогу матки через лапаротомію в області голодної ямки (справа чи зліва).** Даний метод значно простіший, менш трудомісткий і може проводитися під місцевою анестезією. Премедикація у даному випадку включає внутрішньом'язове введення ромпуна, епідуральну ін'єкцію новокаїну, паральомбальну та інфільтраційну анестезію 20%-ним розчином новокаїну по лінії розрізу.

Фіксують тварину в станку, готують операційне поле і роблять вертикальний розріз шкіри, підшкірної клітковини та м'язового шару довжиною 15 см на віддалі 8 см спереду лінії колінного суглоба між зовнішнім горбом клубової кістки і заднім краєм ребра, на 10 см нижче поперечно-реберних відростків поперекових хребців. Підтягують гемостатичним пінцетом очеревину, розрізають її ножицями, розширюють розріз пальцями і вводять руку в черевну порожнину. Захоплюють великим та вказівним пальцями один ріг матки, підтягують його у просвіт розрізу, підраховують кількість жовтих тіл та проводять вимивання ембріонів спочатку з одного, а тоді з другого рога матки, як описано вище. Завершують операції так же, як при лапаротомії по білій лінії живота.

Кращих результатів досягають при вимиванні ембріонів з рогу матки з боку розрізу, оскільки до протилежного рогу важко добратися.

Після операції залишають тварину під наглядом протягом двох тижнів, після чого знімають шви.

**Хірургічний метод видобування ембріонів через розріз верхнього склепіння піхви (трансвагінальний метод).** Фіксують тварину в станку і підраховують (ректально) кількість жовтих тіл у кожному яєчнику, наводять туалет перинеальної області, проводять епідуральну анестезію, забинтовують корінь хвоста, відводять його набік і зрошують внутрішню поверхню піхви 2%-ним розчином діюциду.

Старанно миють і обробляють руки, беруть скальпель, затискають його між складеними конусом пальцями і вводять руку в піхву. Роблять з одного боку шийки матки дорзоназальний розріз склепіння піхви довжиною 2-3 см.

Виймають з піхви скальпель, вводять через розріз в черевну порожнину спочатку два пальці, потім решту і тоді цілу руку, спеціально підготованою тупою голкою (діаметром 1-2 мм) проколюють біля біфуркації іпсілатеральний ріг матки (що з'єднаний з яєчником, в якому виявлені жовті тіла) і вводять через утворений отвір кінець катетера з надувною кулькою для вимивання ембріонів. Нагнітають в кульку 7-10 см<sup>3</sup> повітря і за допомогою шприца вливають в ріг матки теплу (37°C) промивну рідину і відсмоктують її назад.

Вимивання ембріонів з геніталій вбитих тварин виявляється ефективним, якщо після забою пройшло не більше 2-2,5 годин.

### **Нехірургічне добування ембріонів.**

Робота виконується групою з трьох чоловік: оператор і два помічники. Заводять корову в манеж, фіксують її в станку, звільняють пряму кишку від калових мас, визначають стан статевих органів та кількість жовтих тіл у кожному яєчнику. Правда, яєчники важко пальпуються і точно встановити кількість жовтих тіл, без відповідного досвіду, не легко.

Наводять туалет перинеальної області і роблять епідуральну анестезію, вводячи 5 мл 2%-го розчину новокаїну, ксилокаїну чи медокаїну або 8-10 мл 2%-го розчину прокаїну. Для зняття напруження кишки можна ввести внутрішньом'язово 0,5-0,7 мл ромпуна чи 0,7-1,0 мл комбелену.

Беруть чистий стерильний катетер, вставляють у його простір металевій стилет і вводять його в піхву в напрямку шийки матки. Ліву руку вводять у пряму кишку, промацують нею катетер, скеровують його кінець в устя шийки матки, захоплюють її рукою і натягують обережно на катетер. Після цього просовують катетер на всю глибину в іпсілатеральний ріг матки, виймаючи обережно стилет. Помічник нагнітає в кульку 10-15 см<sup>3</sup> повітря і, з'єднавши зовнішній кінець катетера з наповненим промивною рідиною 50-мілілітровим шприцом, вводить його вміст у порожнину рога матки і відсмоктує назад. Оператор при цьому легко масажує ріг матки і дещо підіймає його верхівку. Зливши обережно промивну рідину по стінці в стерильний циліндр чи мензурку

і, накривши її стерильною фольгою, помічник знову набирає свіжу порцію розчину в шприц і промиває ним ріг матки і т. д.

На один ріг матки витрачають до 500 мл рідини. При цьому слід уникати зворотного введення відсмоктаної рідини та попадання в неї крові. Введена кількість рідини повинна відповідати кількості відсмоктаної. Якщо промивна рідина втрачається і проходить мимо кульки, то збільшують в ній тиск повітря, проте при надмірному тиску повітря можуть виникати розриви слизової оболонки.

Закінчивши промивання одного рога матки, випускають з кульки повітря і вводять в ріг суміш антибіотиків, розчинених у 20 мл 0,5%-го розчину новокаїну. Після цього беруть інший стерильний катетер, вводять його в такій же послідовності в другий ріг матки і промивають його.

Збирають промивну рідину в стерильний мірний циліндр чи ділильну лійку і накривають фольгою.

У наведеній таблиці зроблено порівняння хірургічного і нехірургічного методів вимивання ембріонів (за А. Брендом).

*Таблиця*

### Порівняльна оцінка методів вимивання ембріонів

Хірургічні методи	Нехірургічні методи
<b>Переваги</b>	
Донор нерухомий	Донор відносно нерухомий
Забезпечення стерильності	Можливість пересаджування в умовах ферми
Безпосереднє маніпулювання з маткою	Не потрібне голодне витримування
Точна оцінка стану яєчників	Менші затрати часу
Потрібна невелика кількість промивної рідини	Немає хірургічного ризику
<b>Недоліки</b>	
Утворення спайок	Необхідна висока техніка

	маніпулювання з рогами матки
Ризиковане застосування загального наркозу	Потрібно біля 500 мл промивної рідини на один ріг
Складності застосування методу у лактуючих тварин	Важко забезпечити стерильність
Необхідне складне хірургічне обладнання	Іноді неможливо пройти цервікальний канал
Потрібне голодне витримування тварин	

## ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ

**Мета заняття:** зрозуміти принципи, що лежать в основі ПЛР, навчитися проводити ПЛР і користуватися ампліфікатором.

### Матеріали та обладнання:

Наступні матеріали необхідні для кожного студента або пари студентів

Матеріали	Обладнання
1. ДНК-матриця	1. Ампліфікатор
2. 2 праймери	2. Стерильні пробірки.
3. ПЛР Буфер	3. Стерильні наконечники
4. MgCl <sub>2</sub>	
5. дНТФ-и	
6. Taq полімераза	
7. Стерильна вода.	

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) дозволяє за невеликий час збільшити кількість ДНК відомої послідовності в геометричній прогресії (*in vitro*). ПЛР була винайдена в 1983 році американським біохіміком Кері Мюллісом. Перша публікація по методу ПЛР з'явилася в листопаді 1985 року в

журналі Science. Через 8 років після цього, тобто в 1993 році, за винахід методу ПЛР, К. Мюлліса отримав Нобелівську премію.

Для протікання цієї реакції необхідні чотири ключові компоненти.

По-перше, служить матрицею молекула ДНК, що містить досліджуваний фрагмент.

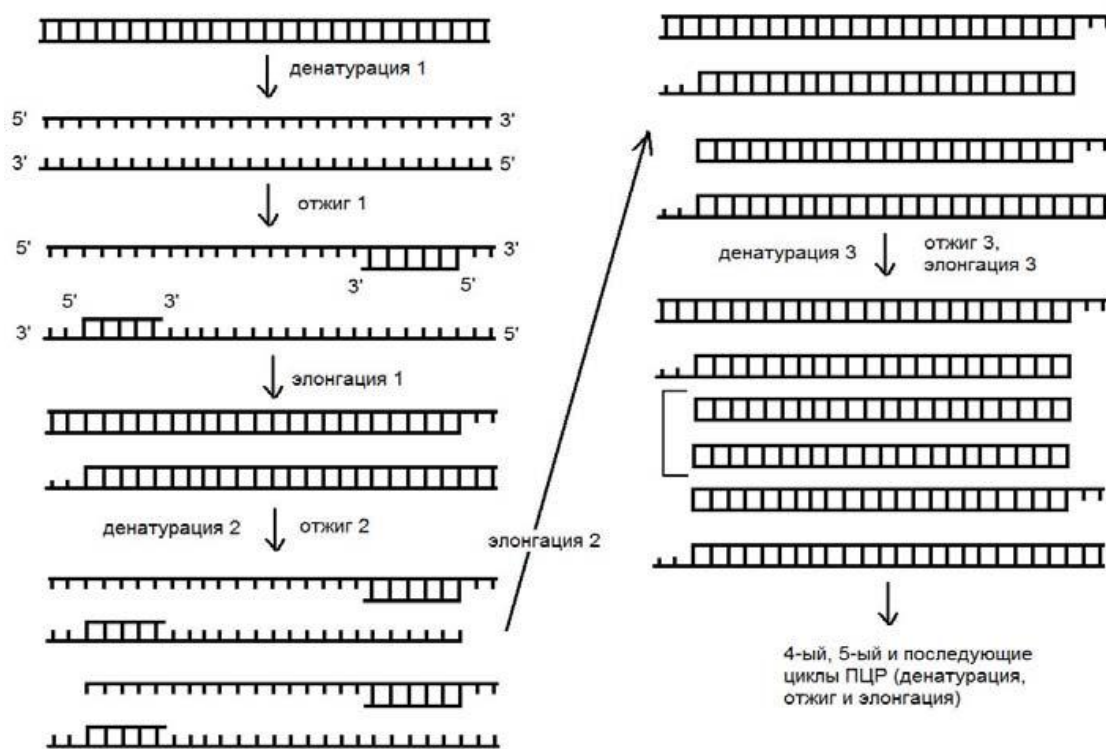
По-друге, ДНК полімераза (фермент для виробництва копій ДНК).

По-третє – динуклеотидтрифосфати (ДНТФ), що використовуються ДНК-полімеразою для синтезу ДНК.

І, по-четверте, два праймера – два коротких сегмента одониткової нуклеїнової кислоти, комплементарних початку досліджуваного фрагмента ДНК (зазвичай це послідовності з 15-20 основ). Приєднуючись до ДНК матриці, праймери дозволяють запустити синтез ДНК, оскільки ДНК-полімераза здатна тільки додавати ланки (рис. 15). Праймери можна замовити в біохімічній компанії або синтезувати за допомогою автоматизованого апарату, задавши програму необхідної послідовності нуклеотидів.

Можна сказати, що метод ПЛР імітує в пробірці природну реплікацію ДНК, повторювану багато разів – стільки, скільки це необхідно для дослідження. Метод включає кілька етапів. Спочатку відбувається розплітання подвійної спіралі ДНК, розходження ниток ДНК і подальше комплементарне доповнення (добудова) обох ниток за допомогою спеціального ферменту. Реплікація ДНК може початися не в будь-якій точці, а тільки в певних «стартових блоках» – коротких двониткових ділянках. Для проведення такого процесу використовують дві генетичні проби – праймери, які виступають в якості затравки для синтезу другого ланцюга на одонитковій ДНК. Праймери – це штучно синтезовані короткі нуклеотидні послідовності (15-30 нуклеотидів), комплементарні кінцям ділянок ниток ДНК, що розмножуються (ампліфікуються). Щоб мати потрібні праймери, необхідно знати нуклеотидну послідовність тієї ділянки ДНК, яку потрібно розмножити. Спочатку двониткову ДНК нагрівають до температури близько 90-95°C. ДНК денатурує і комплементарні нитки ДНК розходяться. Далі до обох ниток ДНК за

принципом комплементарності приєднують (відпалюють) праймери, в результаті чого утворюються короткі двониткові – «стартові блоки». Праймери приєднуються в напрямку з 3'-кінця ланцюжка ДНК, по одному на кожен ланцюг, тому добудовування нового ланцюга ДНК в наступних циклах відбувається в обмеженій праймерами ділянці ДНК (рис. 16).



*Рис. 13. Схеми проходження циклів полімеразної ланцюгової реакції*

Наступна стадія полягає в подовженні нового ланцюжка ДНК за допомогою приєднання наявних у реакційній суміші дезоксирибонуклеотидтрифосфатів.

Процес подовження (елонгації) починається від праймерів і здійснюється за допомогою ферменту – ДНК-полімерази при температурі 72°C. Полімераза здійснює синтез других ланцюгів ДНК на кожному з двох денатурованих ланцюгів після нового прогріву.

Знову синтезовані фрагменти ДНК виступають в якості матриці для синтезу нових ниток в наступному циклі ампліфікації. Процедура ПЛР містить



кілька високотемпературних етапів, тому використовуються термостабільні ДНК-полімерази, наприклад, специфічний бактеріальний фермент – *Taq*-полімераза, стійку до високих температур.

В ході реакції послідовно змінюють температуру: при температурі 90-95°C відбувається розділення ланцюгів ДНК, при температурі 40-60°C – приєднання праймера (відпал), при температурі 72°C – синтез ланцюгів ДНК. Термостабільні ДНК-полімерази виділяються з термостійких бактерій, що живуть в гарячих джерелах при температурах до 90°C. Найчастіше це *Taq*-полімераза бактерій *Thermus aquanticus*, *Tth*-полімераза (*Thermus thermophilus*), *Pwo*-полімераза (*Pyrococcus woesei*). В даний час в ПЛР часто використовуються суміші полімераз з різними властивостями, включаючи штучно отримані модифікації природних ферментів.

Процес ПЛР вимагає постійної зміни циклів з декількома різними температурами, тому сучасні апарати для ПЛР – термоциклери (ампліфікатори) (рис. 17) – працюють в режимі швидкої зміни температури реакційної суміші за заданою програмою і здатні ампліфікувати фрагмент ДНК довжиною від 100 до 3000 пар основ протягом декількох годин, починаючи з пікограмових кількостей ДНК (що оптимально для проходження реакції).



**Рис. 14. Ампліфікатори – прилади, що забезпечують періодичне охолодження і нагрівання пробірок, необхідні для проведення ПЛР**

В крайньому випадку, можна використовувати в якості вихідного матеріалу ДНК з однієї клітини, наприклад – з клітини сперми, і отримати більш 100 млрд. копій досліджуваного фрагмента.

Склад ПЛР-буфера може бути різним залежно від компанії виробника. Багато виробників готують суміші, що містять ПЛР-буфер, хлорид магнію і дНТФ-и.

### Методика приготування типової ПЛР реакції

Компоненти	Концентрація	Об'єм в реакції (на 100 мкл)
ПЛР Буфер	10 ×	10 мкл
MgCl <sub>2</sub>	25 мМ	10 мкл
дНТФ-и	10 мМ	2 мкл
Праймери	10 мкМ	по 1 мкл
Тақ полімераза	5 од / мкл	1 мкл
ДНК-матриця	~10 пг	
H <sub>2</sub> O		до 100 мкл

Всі перераховані компоненти реакції змішайте в пробірці Еппендорф на 0,2 або 0,5 мл, використовуючи для кожного компонента новий стерильний наконечник. Обсяг реакції може бути від 20 до 100 мкл. Врахуйте при змішуванні компонентів, що вода повинна бути стерильна.

### Параметри типової ПЛР.

Встановіть потрібну температуру і кількість циклів на ампліфікаторі. Скористайтеся запропонованими типовими параметрами. Врахуйте тільки, що температура відпалу X (annealing) залежить від послідовності праймерів, а тривалість етапу елонгації Y і кількість циклів залежить від розміру ДНК матриці.

Після закінчення ампліфікації дістаньте пробірки з приладу і отримані продукти реакції разом з ДНК-маркером (стандартом) нанесіть на агарозний гель.

Стадія	Параметри ( $t^{\circ}$ , тривалість)
I.	$T_{\text{den}} = 95^{\circ}\text{C}$ , 1'
II (25-30 циклів)	$T_{\text{den}} = 94^{\circ}\text{C}$ , 10"
	$T_{\text{ann}} = X$ , 30"
	$T_{\text{elon}} = 72^{\circ}\text{C}$ , Y
III.	$T = 72^{\circ}\text{C}$ , 45'
IV.	$T = 4^{\circ}\text{C}$

Після проведення електрофорезу зразки перегляньте під ультрафіолетовим світлом. Якщо дані результати необхідні для подальшої роботи, тоді гель з розділеними на ньому ДНК зразками потрібно сфотографувати.

**РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА**

1. Джамалова Г. А. Биотехнология животных / Г. А. Джамалова. – Алматы : Агентство «Маматай», 2004. – 154 с.
2. Катмаков П. С. Биотехнология в животноводстве / П. С. Катмаков, А. В. Бушов, В. П. Гавриленко. – Ульяновск : УГСХА, 2008. – 154 с.
3. Рекомендації щодо відбору та підготовки телиць-реципієнтів до трансплантації ембріонів / [Г. О. Богданов, В. І. Шеремета, В. П. Поліщук та ін.]. – К. : Міжнародна фінансова агенція, 1997. – 12 с.
4. Технологія отримання ембріонів і яйцеклітин від корів та телиць / [О. Д. Бугров, М. Д. Безуглий, С. Б. Данилов та ін.]. – Харків, 1998. – 9 с. - (Біотехнологія: методичні рекомендації для науково-практичних і організаційних питань трансплантації ембріонів сільськогосподарських тварин ; ХЗВІ).
5. Юлевич О. І. Біотехнологія: навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль ; за ред. М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2012. – 476 с.





Навчальне видання

## **ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТВАРИН**

**Методичні рекомендації**

**Укладач: Луговий Сергій Іванович**

Формат 60×84.1/16. Ум. друк. арк. 0,9

Тираж \_\_\_ прим. Зам № \_\_\_\_\_

Надруковано у видавничому відділі  
Миколаївського національного аграрного університету.  
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013

