



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103090** (13) **C2**

(51) МПК (2013.01)

**G01N 33/18** (2006.01)

**G01N 21/00**

**G01N 33/48** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2011 14501</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>07.12.2011</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.09.2013</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: <b>25.09.2012, Бюл.№ 18</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.09.2013, Бюл.№ 17</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Шевцова Наталія Леонідівна (UA), Гудков Дмитро Ігоревич (UA), Сазонов Володимир Вікторович (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ІНСТИТУТ ГІДРОБІОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,</b> проспект Героїв Сталінграда, буд. 12, м. Київ, 04210 (UA)</p> <p>(74) Представник: <b>Сазонов Володимир Вікторович, реєстр. №183</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Aceto-orcein staining. Wheat Genetics Resource Center. Kansas State University. April 26, 2007. Знайдено в Інтернет 15.05.2013: <a href="http://www.k-state.edu/wgrc/Protocols/Cytogenetics/acetoorcein.html">http://www.k-state.edu/wgrc/Protocols/Cytogenetics/acetoorcein.html</a>. B. S. Ahloowalia. A root tip squash technique for screening chromosome number in Lolium. Euphytica, June 1965, Volume 14, Issue 2, pp 170-172. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. - ?, «Колос», 1974. - С.І 18-126, 176-181. Гидова Э.М.. Большой практикум. Методические указания. Для специальности 020201 - биология. Нальчик - 2008. - 39 с. Самигулина Н.С., И. Б. Кирина И.Б. Практикум по генетике. Мичуринск- наукоград РФ. - 2008 - С. 22-23. Гидова Э.М. Цитогенетика. Методические указания к лабораторным работам. Для специальности 010900 - биология. Нальчик - 2003. - 26 с. Калаев В.Н., Буторина А.К., Шелухина О.Ю. Оценка антропогенного загрязнения районов г. Старый Оскол по цитогенетическим показателям семейного потомства березы повислой. Экологическая генетика. - Т. IV. - №2. - 2006 - С. 9-21.</p>
--	---

**(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ДАВЛЕНИХ ПРЕПАРАТІВ З КОРЕНІВ ВИЩИХ ВОДЯНИХ РОСЛИН**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу виготовлення цитогенетичних давлених препаратів з коренів вищих водяних рослин, де апікальні частини коренів вищих водяних рослин фіксують, витримують у фіксаторі, проводять дві послідовні витримки протягом 60-90 хвилин у 96 %-ному етанолі, порушують цілісність дерматогенного шару клітин апексу кореня за допомогою препарувальної голки під час другої витримки та фарбують ядерним фарбником ацетоорсеїном

UA 103090 C2

при температурі в діапазоні 60-118 °С, витримують у фарбнику 30-48 годин при кімнатній температурі та розчавлюють за допомогою покривного скельця на предметному склі.

Винахід належить до галузі генетики рослин і екології водних екосистем і призначений для застосування в гідробіологічній практиці при визначенні мутагенності водного середовища за допомогою цитогенетичних показників вищих водяних рослин

5 Поширюване з кожним роком антропогенне забруднення навколишнього середовища нагально потребує жорсткого контролю. Одночасно з токсичними речовинами у навколишнє середовище все частіше потрапляють речовини (важкі метали, радіонукліди тощо), що впливають на спадковий апарат біоти, викликаючи його суттєві порушення. Це призводить до підвищення рівня генетичних порушень в організмах які реалізуються в змінах репродуктивної здатності, виникнення нежиттєздатного чи спотвореного потомства. Найбільш поширеним методом контролю мутагенної безпеки навколишнього середовища є дослідження рівня та спектра хромосомних аберацій. Достовірний облік хромосомних аберацій та ідентифікація їх типів також безумовно потрібне в більшості цитогенетичних робіт - при дослідженні структури хромосом, індукованого та спонтанного мутагенезу, при вивченні ролі хромосомних мутацій в етіології різних патологічних процесів, при визначенні змін репродуктивності. В екологічній практиці все більше поширення набувають роботи, де оцінка хромосомних порушень 15 використовується як біомаркер мутагенного потенціалу навколишнього середовища.

Відомий спосіб визначення рівня та спектра хромосомних аберацій за допомогою анафазного методу давлених препаратів (Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. - М., «Колос», 1974. - С.118-126, 176-181 (1); Методические указания по цитологическим и цитозембриологической технике (для исследования культурных растений)/ Под ред. Л.И. Орел. - Ленинград, 1982. С. 4-14 (2); Руководство к лабораторно-практическим занятиям по цитологии и цитогенетике растений - М.: Изд-во МСХА, 2004. - 86-94 с. (3)). 20

Розробка методів анафазного обліку хромосомних порушень в клітинах коренів рослин за допомогою методу давлених препаратів веде свій початок ще з 60-х років попереднього століття. Але майже кожен новий об'єкт дослідження для якісного фарбування клітини потребує розробки індивідуально підібраної методики, що пов'язано з біохімічними особливостями будови як самих коренів, так і клітин меристемних тканин. При проведенні екологічної експертизи чи при розробці прогнозів з мутагенної безпеки навколишнього середовища, окрім якості цитогенетичних препаратів, важливе значення мають і строки проведення цитогенетичного аналізу. Роботи, пов'язані з екологічною безпекою потребують отримання 25 результатів як у найшвидші строки.

Найбільш близьким аналогом (прототипом) винаходу по технічній сукупності й ефектові, що досягається, є способи отримання давлених препаратів з коренів культурних злакових рослин родини Poaceae та гречкоцвітів родини Polygonaceae до яких належать і деякі вищі водяні рослини. Існуючі методики фарбування ядерного матеріалу коренів злакових індивідуальні для кожного виду. Найближчим аналогом є спосіб отримання давлених препаратів з коренів гречки звичайної (1). Спосіб полягає у фіксації коренів в оцтовому алкоголі, відмиванні у двох змінах 35 96-% етанолу, витримки у 70 % етанолі при температурі 3-4 °С протягом декількох діб. Потім матеріал переносять у 3 %-ний перекис водню на 30 хвилин, після чого додають ядерний фарбник - ацетоорсеїн з соляною кислотою та витримують 6-8 діб при температурі 3-4 °С. 40 Пофарбовані кінчики коренів з зоною поділу відрізають та розчавлюють на предметному склі у свіжій краплі ацетоорсеїну. Цей спосіб дуже довготривалий, потребує значної кількості реактивів та досить трудомісткий, а отримані препарати ядерного матеріалу клітин коренів вищих водяних рослин неякісні - погано профарбовані та з нечітко окресленими межами хромосом.

45 Задачею винаходу є спрощення, прискорення і підвищення якості способу фарбування ядерного матеріалу клітин коренів вищих водяних рослин.

Суть способу полягає у тому, що відібрані апікальні частини коренів вищих водяних рослин фіксують, витримують у фіксаторі, проходять дві послідовні витримки загальною тривалістю до 60-90 хвилин у 96 %-ному етанолі з обов'язковим порушенням цілісності дерматогенного шару 50 клітин апексу кореня за допомогою препарувальної голки та фарбуються ядерним фарбником ацетоорсеїном при температурі в діапазоні 60-118°C, витримують у фарбнику 30-48 годин при кімнатній температурі та розчавлюють за допомогою покривного скельця на предметному склі.

Приклади реалізації способу.

Приклад 1

55 У 2011 р. у водоймах Зони відчуження Чорнобильської АЕС озерах Глибокому, Далекому-1, Азбучину а також у Янівському затоні р. Припять, водоймі-охолоджувачі ЧАЕС відбирали проби коренів вищих водяних рослин. Відібрані корені очерета звичайного Phragmites australis Trin Ex Steud довжиною 5-10 мм на місці фіксували оцтовим альдегідом у співвідношенні об'ємів фіксованого матеріалу до фіксатора 1:10. Зафіксований матеріал витримували в темному 60 прохолодному місці. Оптимальний час витримки матеріалу 96 годин. Зафіксовані корені очерету

були проведені через дві послідовні витримки у 96 %-ному етанолі, кожна по 45 хвилин. Під час другої витримки проколювали дерматогенний шар клітин апексу кореня за допомогою препарувальної голки. Відмиті та обезводнені корені переносили до флакону з 15 мл ядерного фарбника - ацетоорсеїну. Далі флакони з дослідним матеріалом та ядерним фарбником підігрівали на відкритому вогні спиртівки до початку появи крупних бульбашок у фарбнику (температура кипіння ацетоорсеїна 118 °С). Пофарбовані корені витримували при кімнатній температурі у розчині фарбника протягом 48 годин. В подальшому апікальну частину кореня розміщували на предметному склі та розчавлювали за допомогою покривного скельця, краї покривного скельця фіксували лаком для перешкодження передчасного висихання препарату. Отриманий якісний давлений препарат кореня очерету звичайного - добре профарбований та з чітко окресленими межами хромосом, всього за шість діб з використанням лише трьох реактивів: спирту етанолу, оцтової кислоти та ацетоорсеїну. Далі отриманий цитогенетичних давлений препарат аналізується під мікроскопом при 1000-кратному збільшенні з масляною імерсією з метою обліку числа та типу хромосомних аберацій.

#### 15 Приклад 2

У 2011 р. у водоймах зони відчуження Чорнобильської АЕС озерах Глибокому та Азбучині, р. Прип'ять біля м. Чорнобиль, Київському водосховищі в районі Московського мосту м. Київ відбирали проби коренів стрілолиста стрілолистого *Sagittaria saggitifolia* L. Підготовчи до фарбування операції проводили аналогічно викладеним у прикладі 1. Зафіксовані корені стрілолисту проходили дві послідовні витримки у 96%-ному етанолі по 30 та 45 хвилин відповідно, під час другої витримки проводиться проколювання коренів препарувальною голкою. Час витримки у етанолі зменшено для запобігання виникнення ламкості дослідного матеріалу. Температурний режим підігріву дослідного матеріалу цього виду рослини теж дещо інший. Флакони з дослідним матеріалом та ядерним фарбником підігрівалися на відкритому вогні спиртівки не більше ніж до 60°C, що необхідно для запобігання розпаду тканин кореня стрілолиста під дією високих температур. Пофарбовані корені витримували при кімнатній температурі у розчині фарбника протягом 30 годин. Подальші операції проводяться згідно з прикладом 1.

#### 30 Приклад 3

У 2011 р. у Київському водосховищі в районі с. Страхолисса, в районі Московського мосту м. Києва, та у водоймах Зони відчуження Чорнобильської АЕС оз. Глибокому, Далекому, Азбучні, Янівському затоні р. Прип'ять та самої р. Прип'ять біля м. Чорнобиль відбирали проби коренів лепешняка великого *Gluceria maxima* (C. Gartm.). Підготовчи до фарбування операції проводили аналогічно викладеним у прикладі 1. Зафіксовані корені лепешняка проходили дві послідовні витримки у 96 %-ному етанолі по 30 хвилин кожна, в другій проводиться проколювання препарувальною голкою. Час витримки в етанолі є оптимальним для цього виду рослини. Температурний режим підігріву дослідного матеріалу цього виду рослини також індивідуальний. Флакони з дослідним матеріалом та ядерним фарбником підігрівали на відкритому вогні спиртівки не більше ніж до 75 °С температури ядерного фарбника для запобігання розпаду тканин кореня та для покращення проникнення ядерного фарбника у клітину. Пофарбовані корені витримуються при кімнатній температурі у розчині фарбника протягом 36 годин. Подальші операції проводяться згідно з прикладом 1.

Використання способу, який заявляється, дозволяє прискорити отримання вихідних давлених препаратів коренів вищих водяних рослин для цитогенетичних дослідів, значно спрощується процес зневоднення клітини за рахунок зменшення кількості проводок у батареї спиртів, також підвищує якість фарбування ядерного матеріалу за рахунок оптимально підібраної температури фарбника та часу витримки. Розроблена методика застосовується при проведенні радіоекологічного моніторингу водойм. Зони відчуження ЧАЕС та екологічній оцінці наслідків хронічного низькофонового опромінення водної біоти в водоймах, що зазнали радіонуклідного забруднення.

### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб отримання цитогенетичних давлених препаратів з коренів вищих водяних рослин, який включає фіксацію, обезводнення, фарбування ядерним фарбником ацетоорсеїном, який **відрізняється** тим, що обезводнення проводять дворазово протягом 60-90 хвилин 96 %-ним етанолом, порушують цілісність дерматогенного шару клітин апексу кореня за допомогою препарувальної голки під час другої витримки, фарбують при температурах 60-118 °С та витримують у ядерному фарбнику протягом 30-48 годин.

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601