

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «БАЛТИЙСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ИММАНУИЛА КАНТА»

(ФГАОУ ВО БФУ им. И. Канта)

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта»

д. фил. н., профессор

\_\_\_\_\_ А.А. Федоров

«    » \_\_\_\_\_ 2023 г.

**Очищение потомств обыкновенного карпа (*Cyprinus carpio L.*) от груза  
слабовредных мутаций с помощью жесткого отсекающего отбора**

(Лабораторный технологический регламент)

Выполнен в рамках реализации Федеральной научно-технической программы  
по направлению генетические технологии для развития сельского хозяйства,  
соглашение о предоставлении гранта в форме субсидии №2-365/21 от 26 ноября 2021 г.

Руководитель:

\_\_\_\_\_ Попадьин К. Ю.

директор Центра геномных исследований

подпись, 15.12.2023

БФУ им. Канта, к.б.н.

Калининград 2023

### **Сведения о методике**

РАЗРАБОТАНА Федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта.

### **Сведения об авторах**

Кузьмин Александр Владимирович, м.н.с., (ЦП) Центр геномных исследований ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта»

Константин Юрьевич Попадьян, канд.биол.наук, с.н.с, (ЦП). Центр геномных исследований ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта»

Балашов Д.А., канд.биол.наук, в.н.с. лаборатории генетики и селекции рыб ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)

Виноградов Е.В., канд.биол.наук, в.н.с. лаборатории генетики и селекции рыб ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b>	<b>3</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>4</b>
<b>1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ</b>	<b>4</b>
<b>2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ</b>	<b>4</b>
<b>3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЯ, ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ, МАТЕРИАЛЫ</b>	<b>5</b>
3.1 Для отбора икры и спермы рыб применяют следующие оборудование, материалы, реактивы и посуду:	5
3.2 Допускается применение другого оборудования с техническими характеристиками, а также материалов и реактивов, по качеству не ниже вышеуказанных	6
<b>4. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ</b>	<b>6</b>
4.1 Общие требования биологической безопасности по ГОСТ 12.1.008.	6
4.2 Требования безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.	6
4.3 Требования к обучению персонала безопасности труда по ГОСТ 120 004.	6
4.4 Средства защиты работающих по ГОСТ 12.4.011, воздух рабочей зоны должен соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.005	6
<b>5. ИЗЛОЖЕНИЕ ЛАБОРАТОРНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА</b>	<b>6</b>
5.1 Оплодотворение икры	6
5.2 Инкубация	6
5.3 Подготовка емкости для шокирования	7
5.4 Применение температурного шокирования	7
5.5 Анализ результатов	7

## ВВЕДЕНИЕ

Основная цель методики заключается в подборе таких условий теплового шока, при которых будет активироваться пороговый эффект, влияющий на уровень экспрессии ключевых белков теплового шока (то есть когда выживаемость личинок будет определяться в большей мере грузом слабо-вредных вариантов, а не уровнем экспрессии белков теплового шока). Создание такой модели позволит в будущем внедрить подобные “переключатели” в геномы культивируемых рыб и обеспечивать периодическое очищение генофонда от особей с большим мутационным грузом. Такой очищающий отбор должен приводить к улучшению генома рыб, что остановит долгосрочную деградацию геномов, свойственную всем одомашненным видам, и положительно отразится на общем состоянии здоровья рыб (например на устойчивость к паразитам и неблагоприятным факторам среды).

Целью работы являлось проведение генетической селекции посредством оценки потомств от индивидуальных и смешанных скрещиваний по их устойчивости к стрессу (температурному шоку) на ранней стадии развития эмбриогенеза - пигментации глаз.

*Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0-2015 "Межгосударственная система стандартизации. Основные положения" и ГОСТ 1.2-2015 "Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены".*

## 1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Лабораторный технологический регламент нацелен на формализацию методики проведения жесткого отсекающего отбора для оплодотворенной икры и предназначена для специалистов рыбного хозяйства, научных работников, специализирующихся по генетике и селекции рыб, селекционеров-рыбоводов, преподавателей и студентов высших и средних специальных учебных заведений.

## 2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.0.004-2015 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.008-76 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.4.011-89 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация

ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия

ГОСТ 5556-81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 6709-72\* Вода дистиллированная. Технические условия

---

\* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 58144-2018.

### **3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЯ, ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ, МАТЕРИАЛЫ**

#### **3.1 Для отбора икры и спермы рыб применяют следующие оборудование, материалы, реактивы и посуду:**

- весы лабораторные\* с наибольшим пределом взвешивания 220 г, обеспечивающие точность взвешивания с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более  $\pm 0,75$  мг.
- чашки Петри
- мензурки и колбы мерные (посуда лабораторная) по ГОСТ 1770
- спирт ректификованный по ГОСТ 5964, раствор 70%
- полотенца одноразовые бумажные
- одноразовые пластиковые наконечники для дозаторов объемом до 200мкл, до 1000мкл
- дозаторы автоматические переменного объема
- Пипетки градуированные по ГОСТ 29227 2-го класса точности или пипетки с одной отметкой по ГОСТ 29169 2-го класса точности.
- пипетки Пастера пластиковые, стерильные, одноразовые
- рН-метр любого типа
- Колбы мерные по ГОСТ 1770 2-го класса точности
- пластиковая мерная посуда (стаканы)
- Термометры жидкостные стеклянные ГОСТ 28498-90
- Термостаты суховоздушные, охлаждающие типа ТСО-1/80 СПУ или любой модели, обеспечивающие поддержание и регулировку температуры от +5 до +50°C.

**3.2 Допускается применение другого оборудования с техническими характеристиками, а также материалов и реактивов, по качеству не ниже вышеуказанных**

---

\* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228-2008 "Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания".

## **4. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ**

**4.1 Общие требования биологической безопасности по ГОСТ 12.1.008.**

**4.2 Требования безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.**

**4.3 Требования к обучению персонала безопасности труда по ГОСТ 120 004.**

**4.4 Средства защиты работающих по ГОСТ 12.4.011, воздух рабочей зоны должен соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.005**

## **5. ИЗЛОЖЕНИЕ ЛАБОРАТОРНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА**

### **5.1 Оплодотворение икры**

Развивающихся эмбрионов производят в лабораторных условиях на пластиковых чашках Петри диаметром 100 мм. В чистую и сухую чашку вносится икра (50-100 икринок), рядом с икрой вносится капля спермы (10 мкл), затем в чашку наливается вода (20-40 мл). В ней половые продукты перемешиваются друг с другом. Перемешивание необходимо проводить птичьим пером. Оплодотворение длится 60 секунд, после этого икра активируется и приклеивается ко дну чашки Петри. Воду, в которой проводилось оплодотворение сливают и наливают свежую (50-60 мл). Скрещивания на чашках Петри проводят в не менее, чем пятикратных повторностях.

### **5.2 Инкубация**

Инкубацию оплодотворенной икры проводят при температуре 20°C до стадии пигментации глаз. На следующий день после оплодотворения отбирают мертвую неоплодотворенную икру и считают процент оплодотворения. Необходимо дважды в день подменивать воду в чашках на свежую. Инкубацию следует проводить в темноте или в затененном месте, исключая попадание прямых солнечных лучей;

### **5.3 Подготовка емкости для шокирования**

Для реализации шоков необходима термостатируемая ванна (объемом около 20 л) достаточная для свободного погружения одновременно 30 чашек Петри. Ванна должна быть оборудована обогревателями, термометром и терморегулятором. Для поддержания оптимальных условий прохождения шока необходимо обеспечить перемешивание воды с помощью помпы и аэрацию;

#### 5.4 Применение температурного шокирования

Температурный шок проводится на стадии пигментации глаз при температуре 38°C 40 минут. Следует опускать чашки в нагреваемую емкость одновременно. Также следует подготовить емкость с аэрируемой водой 20°C, куда по истечению 40 минут необходимо погрузить чашки, остановив процесс температурного воздействия. После шоковых воздействий икра на чашках Петри инкубируется в затененном месте при 20°C с заменой воды дважды в день и отбора мертвой икры до выклева личинок и перехода их на активное питание;

#### 5.5 Анализ результатов

По результатам шоковых воздействий и дальнейшей инкубации составляется Таблица 1. Учитывают выход зародышей после температурного воздействия, вылупление личинок и переход личинок на активное питание, рыб с уродствами не учитывают.

Таблица 1 – Выживаемость зародышей и личинок карпа после тепловых воздействий (38°C, 40 минут)

t (°C)	Продолжительность теплового воздействия (мин.)		
	40		
	количество зародышей после температурного воздействия, %	выклев личинок, %	количество личинок, перешедших на активное питание, %
38			

Успех отбора оценивают по двум параметрам:

1. Если выход после воздействия будет выше 50 %, то считают, что геномы данной группы потомств не загружена слабовредными мутациями.
2. Если выход ниже 50 %, то выживших особей в конкретном потомстве можно считать очищенными от неблагоприятного груза мутаций. И в дальнейшем вести с ними общепринятые селекционные работы.