

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 522

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/075 (2010.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35595**
(22) Přihlášeno: **11.07.2018**
(47) Zapsáno: **30.01.2019**

- (73) Majitel:
Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i., Praha 10,
Uhřetěves, CZ
- (72) Původce:
Ing. Kristýna Hošková, Ph.D., Praha 5, Smíchov,
CZ
Ing. Tereza Žalmanová, Ph.D., Praha 6, Hradčany,
CZ
Ing. Tomáš Kott, Ph.D., Poleň, CZ
prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc., Praha 10, Uhřetěves,
CZ
- (74) Zástupce:
Patentová kancelář VYNALEZY.cz, Mgr. Hana
Jirkalová, Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4,
Michle

- (54) Název užitého vzoru:
**Kultivační medium pro eliminaci defektů
zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátem**

CZ 32522 U1

Kultivační medium pro eliminaci defektů zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátemOblast techniky

5

Řešení se týká zvýšení vývojové schopnosti savčích oocytů získaných od zvířat, která byla vystavena nepříznivým účinkům herbicidu glyfosátu. Toto kultivační medium má velký význam zejména při asistované reprodukci hospodářských zvířat.

10

Dosavadní stav techniky

Narůstající znečištění životního prostředí má za následek poruchy plodnosti. K polutantům, které se na tom významně podílejí, patří i endokrinní disruptory, čili látky schopné narušit hormonální rovnováhu organismu. Mezi nimi zaujímají významné místo i herbicidy používané v zemědělství včetně glyfosátu. Tyto látky jsou v životním prostředí velmi rozšířené a jejich negativní efekt se projevuje už ve velmi nízkých koncentracích. Je proto krajně obtížné, ne-li nemožné, zajistit, aby lidé či zvířata nebyli účinku těchto látek vystaveni.

V současné době se pro asistovanou reprodukci savců, např. pro klonování, in vitro oplození, transgenozí, včetně hospodářsky významných druhů, využívají oocyty dozrálé v podmínkách in vitro. Ty mohou pocházet od zvířat, jež byla vystavena účinkům látek znečišťujících životní prostředí. Kvalita takových oocytů je snížena a jejich schopnost dozrát v podmínkách in vitro bývá narušena. Platí to i při expozici zvířat glyfosátem, který se vyskytuje v krmivech a je s to následně narušit zrání oocytů in vitro. Proto se vyvíjejí systémy kultivace, které by riziko narušení in vitro zrání u oocytů ze zvířat exponovaných glyfosátem eliminovaly. Pro tyto kultivační systémy se hledají látky, které by u oocytů kultivovaných in vitro zabránily významným vývojovým defektům.

Pokud by se podařilo zajistit plnohodnotné zrání i u oocytů ze zvířat, která byla předtím v důsledku znečištění životního prostředí vystavena působení glyfosátu, zvýšilo by se využití šlechtitelského potenciálu samic a zefektivnily by se i postupy asistované reprodukce.

Podstata technického řešení

Uvedené problémy odstraňuje kultivační medium pro eliminaci defektů zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátem, podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že 1 l tohoto media obsahuje

40

Chlorid vápenatý	0,139600 g/l
------------------	--------------

Dusičnan železitý • 9 H ₂ O	0,000720 g/l
--	--------------

45

Síran hořečnatý (bezvodý)	0,097670 g/l
---------------------------	--------------

Chlorid draselný	4,000000 g/l
------------------	--------------

Fosforečnan draselný	0,060000 g/l
----------------------	--------------

50

Octan sodný (bezvodý)	0,050000 g/l
-----------------------	--------------

Uhlícitan sodný	2,200000 g/l
-----------------	--------------

55

Chlorid sodný	8,000000 g/l
---------------	--------------

	Fosforečnan sodný (bezvodý)	0,047880 g/l
	L-alanin	0,025000 g/l
5	L-arginin • HCl	0,070000 g/l
	L-kyselina asparagová	0,030000 g/l
10	L-cystein • HCl • H ₂ O	0,000110 g/l
	L-cystin • 2 HCl	0,026000 g/l
	L-kyselina glutamová	0,066800 g/l
15	L-glutamin	0,100000 g/l
	Glycin	0,050000 g/l
20	L-histidin • HCl • H ₂ O	0,021880 g/l
	Hydroxy-L-prolin	0,010000 g/l
	L-isoleucin	0,020000 g/l
25	L-leucin	0,060000 g/l
	L-lysin • HCl	0,070000 g/l
30	L-methionin	0,015000 g/l
	L-fenylalanin	0,025000 g/l
	L-prolin	0,040000 g/l
35	L-serin	0,025000 g/l
	L-threonin	0,030000 g/l
40	L-tryptofan	0,010000 g/l
	L-tyrozin • 2 Na • 2 H ₂ O	0,057660 g/l
	L-valin	0,025000 g/l
45	Kyselina askorbová • Na	0,0000566 g/l
	D-Biotin	0,000010 g/l
50	Kalciferol	0,000100 g/l
	Cholin chlorid	0,000500 g/l
	Kyselina listová	0,000010 g/l
55		

	Menadion	0,000016 g/l
	Myo-inozitol	0,000050 g/l
5	Niacinamid	0,000025 g/l
	Kyselina nikotinová	0,000025 g/l
	Kyselina pantotenová	0,000050 g/l
10	Kyselina p-aminobenzoová	0,000010 g/l
	Pyridoxal • HCl	0,000025 g/l
15	Pyridoxin • HCl	0,000025 g/l
	Retinol acetát	0,000140 g/l
	Riboflavin	0,000010 g/l
20	DL- α -tokoferol fosfát • Na	0,000010 g/l
	Thiamin • HCl	0,000010 g/l
25	Adenin sulfát	0,010000 g/l
	Adenosin trifosfát • 2 Na	0,001000 g/l
	Adenosin monofosfát • Na	0,0002385 g/l
30	Cholesterol	0,0002000 g/l
	Deoxyribóza	0,0005000 g/l
35	Glukóza	1,0000000 g/l
	Glutathion (redukovaný)	0,0000500 g/l
	Guanin • HCl	0,0003000 g/l
40	Hypoxanthin	0,0003000 g/l
	Fenolová červeň • Na	0,0213000 g/l
45	Polyoxyethylensorbitanmonooleát	0,0200000 g/l
	Ribóza	0,0005000 g/l
	Thymin	0,0003000 g/l
50	Uracil	0,0003000 g/l
	Xantin • Na	0,0003440 g/l
55	Resveratrol	5 μ M

Cystathionin	5 μ M
Kyselina merkaptopyrohroznová	10 μ M
Xestosaprol C	50 mM.

Kultivační medium podle technického řešení je charakterizováno tím, že se oocyty s ukončenou růstovou fází kultivují in vitro s xestosaprolelem C po dobu, která je u daného druhu zvířat běžně nutná pro postup zrání oocytů do metafáze II. Kultivační medium podle technického řešení je dále charakterizováno tím, že se na oocyty s ukončeným růstem a úplně vyvinutou vývojovou schopností během jejich zrání in vitro působí v in vitro kultuře xestosaprolelem C v koncentracích od 10 do 100 nM, přičemž tato kultivace trvá po dobu, která odpovídá době nutné v podmínkách kultivace in vitro pro postup zrání oocytů do stádia metafáze II.

Kultivační medium podle technického řešení pro zvýšení ochrany oocytů proti efektům glyfosátu se konkrétně výhodně používá tak, že se nezralé savčí oocyty s ukončeným růstem a úplně vyvinutou vývojovou schopností in vitro kultivují v médiu s xestosaprolelem C v koncentraci 50 mM. Kultivace trvá dobu, která je u daného druhu potřebná pro dozrání oocytů s ukončenou růstovou fází a plnou vývojovou schopností v podmínkách in vitro, tj. u prasete asi 44 až 48 hodin, u skotu 22 až 24 hodin, u více než 85 % oocytů pro další použití.

Kultivačním médiem podle technického řešení jsou oocyty vystaveny působení xestosaprolelem C, což má pozitivní vliv na kvalitu zrání oocytů, především pak na integritu dělicího vřeténka a euploidní stav chromozomů dozralého oocytu. To se ukazuje jako velmi výhodné, protože experimenty původců prokázaly, že kultivace s xestosaprolelem C má příznivý efekt na zrání oocytů od zvířat, jež byla předtím vystavena účinku glyfosátu. Pokud není použito kultivační medium podle technického řešení, pak většina kultivovaných oocytů ze zvířat, jež byla předtím vystavena účinkům glyfosátu, má narušené dělicí vřeténko a při vydělení prvního pólového tělíska dochází k aneuploidii. Takové oocyty jsou pro většinu biotechnologií nepoužitelné. Způsobem podle technického řešení je dosaženo úplného zrání oocytů do metafáze II u více než 85 % oocytů. Tyto oocyty lze použít pro další reprodukční biotechnologie, protože jsou s to se vyvíjet v kvalitní embrya.

Působením kultivačního media podle technického řešení dojde k podstatnému zvýšení podílu oocytů, jež dokončí zrání a jsou využitelné pro další reprodukční biotechnologie. Ve srovnání s tradičními postupy kultivace je nárůst podílu dozralých oocytů zhruba dvoj- až trojnásobný, což má velký hospodářský význam. Způsob kultivace uvedeným kultivačním médiem in vitro oocytů od zvířat, jež byla předtím vystavena účinku glyfosátu, kultivačním médiem podle technického řešení lze využít zejména při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat, např. pro klonování či ICSI.

Kultivační medium podle technického řešení pro zvýšení vývojové schopnosti oocytů od zvířat vystavených před kultivací působení glyfosátu in vitro s xestosaprolelem C bylo původci úspěšně ověřeno v laboratořích a stájích u přihlašovatele, kterým je Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., v Praze, CZ.

Následující příklady kultivačního media podle technického řešení pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1

Kultivační medium podle technického řešení pro eliminaci defektů zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátem mělo v 1 l následující složení:

5	Chlorid vápenatý	0,139600 g/l
	Dusičnan železitý • 9 H ₂ O	0,000720 g/l
	Síran hořečnatý (bezvodý)	0,097670 g/l
10	Chlorid draselný	4,000000 g/l
	Fosforečnan draselný	0,060000 g/l
	Octan sodný (bezvodý)	0,050000 g/l
15	Uhlícitan sodný	2,200000 g/l
	Chlorid sodný	8,000000 g/l
20	Fosforečnan sodný (bezvodý)	0,047880 g/l
	L-alanin	0,025000 g/l
	L-arginin • HCl	0,070000 g/l
25	L-kyselina asparagová	0,030000 g/l
	L-cystein • HCl • H ₂ O	0,000110 g/l
30	L-cystin • 2 HCl	0,026000 g/l
	L-kyselina glutamová	0,066800 g/l
	L-glutamin	0,100000 g/l
35	Glycin	0,050000 g/l
	L-histidin • HCl • H ₂ O	0,021880 g/l
40	Hydroxy-L-prolin	0,010000 g/l
	L-isoleucin	0,020000 g/l
	L-leucin	0,060000 g/l
45	L-lysin • HCl	0,070000 g/l
	L-methionin	0,015000 g/l
50	L-fenylalanin	0,025000 g/l
	L-prolin	0,040000 g/l
55	L-serin	0,025000 g/l

	L-threonin	0,030000 g/l
	L-tryptofan	0,010000 g/l
5	L-tyrozin • 2 Na • 2 H ₂ O	0,057660 g/l
	L-valin	0,025000 g/l
	Kyselina askorbová • Na	0,0000566 g/l
10	D-Biotin	0,000010 g/l
	Kalciferol	0,000100 g/l
15	Cholin chlorid	0,000500 g/l
	Kyselina listová	0,000010 g/l
	Menadion	0,000016 g/l
20	Myo-inozitol	0,000050 g/l
	Niacinamid	0,000025 g/l
25	Kyselina nikotinová	0,000025 g/l
	Kyselina pantotenová	0,000050 g/l
	Kyselina p-aminobenzoová	0,000010 g/l
30	Pyridoxal • HCl	0,000025 g/l
	Pyridoxin • HCl	0,000025 g/l
35	Retinol acetát	0,000140 g/l
	Riboflavin	0,000010 g/l
	DL- α -tokoferol fosfát • Na	0,000010 g/l
40	Thiamin • HCl	0,000010 g/l
	Adenin sulfát	0,010000 g/l
45	Adenosin trifosfát • 2 Na	0,001000 g/l
	Adenosin monofosfát • Na	0,0002385 g/l
	Cholesterol	0,0002000 g/l
50	Deoxyribóza	0,0005000 g/l
	Glukóza	1,0000000 g/l
55	Glutathion (redukovaný)	0,0000500 g/l

	Guanin • HCl	0,0003000 g/l
	Hypoxanthin	0,0003000 g/l
5	Fenolová červeň • Na	0,0213000 g/l
	Polyoxyethylensorbitanmonooleát	0,0200000 g/l
10	Ribóza	0,0005000 g/l
	Thymin	0,0003000 g/l
	Uracil	0,0003000 g/l
15	Xantin • Na	0,0003440 g/l
	Resveratrol	5 µM
20	Cystathionin	5 µM
	Kyselina merkaptopyrohroznová	10 µM
25	Xestosaprol C	50 mM.

Při klasické kultivaci prasečích oocytů od prasnic, jež byly předtím vystaveny účinkům glyfosátu, dochází v podmínkách in vitro k dokončení zrání do stádia metafáze II u 38 % oocytů. Prasečí oocyty s ukončenou růstovou fází byly kultivovány 44 hodin v kultivačním médiu s přidavkem 50 mM xestosaprolu C. Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stádia metafáze II s četností přes 85 %. Takto získané oocyty lze podrobit standardní partenogenetické aktivaci a navodit u nich vývoj do stádia blastocysty. Takto získané savčí partenogenetické zárodky ve vývojovém stádiu blastocysty lze využít například pro tvorbu embryonálních kmenových buněk.

35

Příklad 2

Při tradiční kultivaci oocytů skotu s ukončeným růstem od krav, jež byly předtím vystaveny účinkům glyfosátu, dochází v podmínkách in vitro k dokončení zrání do stádia metafáze II u 41 % oocytů. Oocyty skotu s ukončenou růstovou fází od krav, jež byly předtím vystaveny účinku glyfosátu, byly kultivovány 24 hodin v kultivačním médiu s 50 mM xestosaprolu C. Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stádia metafáze II s četností přes 85 %. Takto získané oocyty lze podrobit standardnímu oplození in vitro. Úspěšně oplozené oocyty se dále vyvíjejí v embrya vhodná pro přenos náhradní matce.

45

Průmyslová využitelnost

Nové kultivační medium pro eliminaci defektů zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátem se týká zdokonaleného kultivačního postupu oocytů in vitro, jež využívá účinků xestosaprolu C, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat.

55

NÁROKY NA OCHRANU

1. Kultivační medium pro eliminaci defektů zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátem, vyznačující se tím, že 1 l tohoto media obsahuje

5	Chlorid vápenatý	0,139600 g/l
	Dusičnan železitý • 9 H ₂ O	0,000720 g/l
10	Síran hořečnatý (bezvodý)	0,097670 g/l
	Chlorid draselný	4,000000 g/l
	Fosforečnan draselný	0,060000 g/l
15	Octan sodný (bezvodý)	0,050000 g/l
	Uhličitan sodný	2,200000 g/l
20	Chlorid sodný	8,000000 g/l
	Fosforečnan sodný (bezvodý)	0,047880 g/l
	L-alanin	0,025000 g/l
25	L-arginin • HCl	0,070000 g/l
	L-kyselina asparagová	0,030000 g/l
30	L-cystein • HCl • H ₂ O	0,000110 g/l
	L-cystin • 2 HCl	0,026000 g/l
	L-kyselina glutamová	0,066800 g/l
35	L-glutamin	0,100000 g/l
	Glycin	0,050000 g/l
40	L-histidin • HCl • H ₂ O	0,021880 g/l
	Hydroxy-L-prolin	0,010000 g/l
	L-isoleucin	0,020000 g/l
45	L-leucin	0,060000 g/l
	L-lysin • HCl	0,070000 g/l
50	L-methionin	0,015000 g/l
	L-fenylalanin	0,025000 g/l
55	L-prolin	0,040000 g/l

	L-serin	0,025000 g/l
	L-threonin	0,030000 g/l
5	L-tryptofan	0,010000 g/l
	L-tyrozin • 2 Na • 2 H ₂ O	0,057660 g/l
	L-valin	0,025000 g/l
10	Kyselina askorbová • Na	0,0000566 g/l
	D-Biotin	0,000010 g/l
15	Kalciferol	0,000100 g/l
	Cholin chlorid	0,000500 g/l
	Kyselina listová	0,000010 g/l
20	Menadion	0,000016 g/l
	Myo-inozitol	0,000050 g/l
25	Niacinamid	0,000025 g/l
	Kyselina nikotinová	0,000025 g/l
	Kyselina pantotenová	0,000050 g/l
30	Kyselina p-aminobenzoová	0,000010 g/l
	Pyridoxal • HCl	0,000025 g/l
35	Pyridoxin • HCl	0,000025 g/l
	Retinol acetát	0,000140 g/l
	Riboflavin	0,000010 g/l
40	DL- α -tokoferol fosfát • Na	0,000010 g/l
	Thiamin • HCl	0,000010 g/l
45	Adenin sulfát	0,010000 g/l
	Adenosin trifosfát • 2 Na	0,001000 g/l
	Adenosin monofosfát • Na	0,0002385 g/l
50	Cholesterol	0,0002000 g/l
	Deoxyribóza	0,0005000 g/l
55	Glukóza	1,0000000 g/l

	Glutathion (redukovaný)	0,0000500 g/l
	Guanin • HCl	0,0003000 g/l
5	Hypoxanthin	0,0003000 g/l
	Fenolová červeň • Na	0,0213000 g/l
10	Polyoxyethylensorbitanmonooleát	0,0200000 g/l
	Ribóza	0,0005000 g/l
	Thymin	0,0003000 g/l
15	Uracil	0,0003000 g/l
	Xantin • Na	0,0003440 g/l
20	Resveratrol	5 µM
	Cystathionin	5 µM
	Kyselina merkaptopyrohroznová	10 µM
25	Xestosaprol C	50 mM.