



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118544** (13) **C2**  
(51) МПК

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**A01K 43/04** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2015 01615	(72) Винахідник(и):	Бруїнс Воутер Себастьян (NL), Стуттерхеім Віл Марійн (NL)
(22) Дата подання заявки:	30.07.2013	(73) Власник(и):	ІН ОВО Б.В., J.H. Oortweg 19, NL-2333 CH Leiden, The Netherlands (NL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.02.2019	(74) Представник:	Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	2009256, 61/677,227, 2009255	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 6365339 B1, 02.04.2002 WO 9814781 A1, 09.04.1998 Y. Feng et al, "Analysis of Metabolites in Allantoic Fluid of Chicken Embryo by 900 MHz NMR Spectroscopy", Applied Magnetic Resonance, 01.11.2007, vol. 32, no. 3, P. 257- 268 Roos Molenaar et al, "High Environmental Temperature Increases Glucose Requirement in the Developing Chicken Embryo", Plos One, 01.04.2013, vol. 8, no. 4, P. e59637
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	30.07.2012, 30.07.2012, 30.07.2012		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	NL, US, NL		
(41) Публікація відомостей про заявку:	12.05.2015, Бюл.№ 9		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.02.2019, Бюл.№ 3		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/NL2013/050569, 30.07.2013		

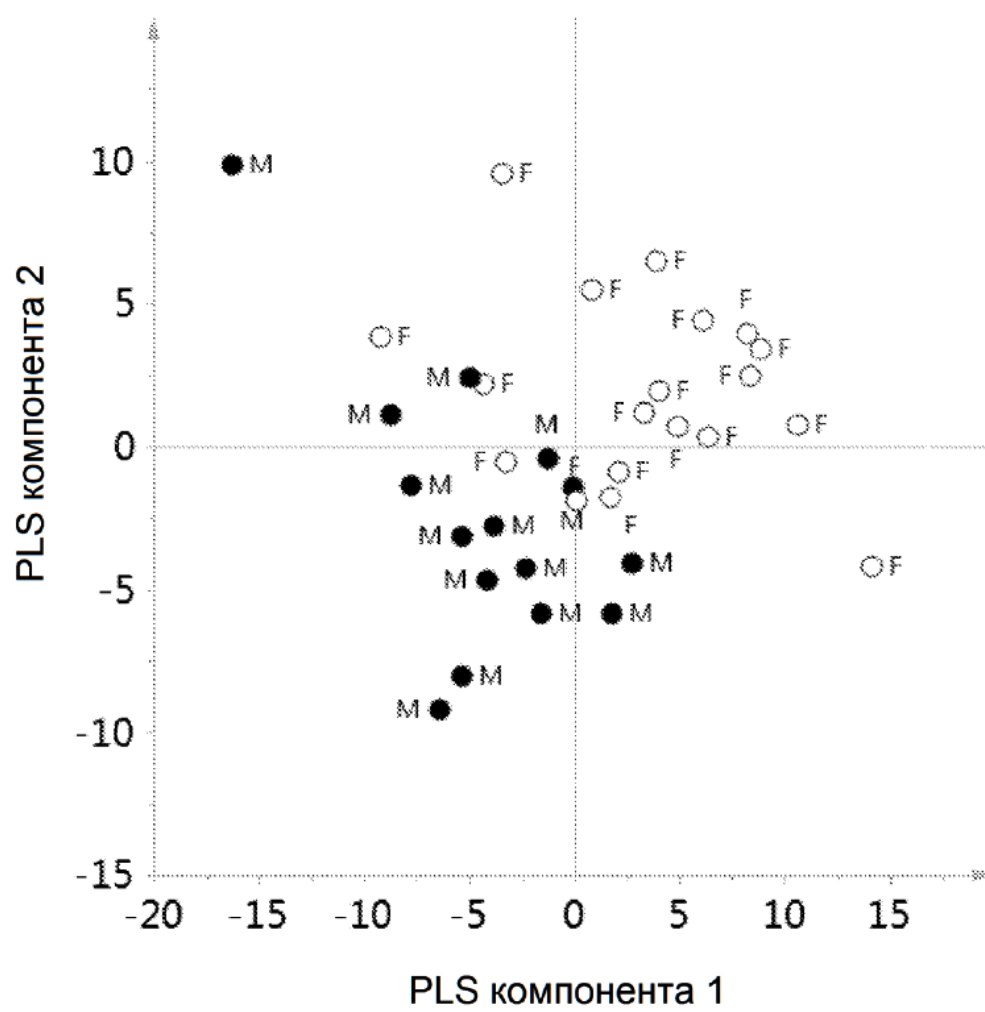
## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТАТІ, ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА/АБО СТАДІЇ РОЗВИТКУ ПТАШИНИХ ЕМБРІОНІВ У ЯЙЦІ

### (57) Реферат:

Винахід стосується способу відбору групи яєць однієї статі, стадії розвитку та/або життєздатності шляхом неруйнуючого визначення статі, стадії розвитку та/або життєздатності пташиного ембріона в кожному яйці, який включає: (а) визначення щонайменше першого маркера розвитку, вибраного з триметилгліцину, аспартату, арганіну, глутамату, глутаміну й проліну та/або першого маркера статі вибраного з глюкози, холіну та/або валіну в алантоїсній рідині у яйці протягом часу від початку інкубування яйця до його вилуплення; (b) вимірювання кількості щонайменше першого маркера розвитку та/або першого маркера статі, та (c) порівняння цієї кількості з базовим значенням для чоловічого та жіночого ембріона, стадії розвитку ембріона та/або живого, мертвого або нерозвиненого ембріона для того, щоб визначити, чи є даний ембріон життєздатним, чоловічим або жіночим і на якій стадії розвитку він знаходиться.

UA 118544 C2

Фиг.1



## Область винаходу

Даний винахід відноситься до способу визначення статі, стадій розвитку та/або життєздатності пташиного ембріона в яйці шляхом установлення присутності маркерів розвитку в яйці, більш конкретно в алантоїсній рідині. Крім того, даний спосіб відноситься до визначення

життєздатності пташиного ембріона, відбору чоловічих і жіночих яєць та одержанню з цих відібраних яєць вакцин і/або курчат.

## Передумови створення винаходу

Із запліднених яєць більшості птахів, зокрема тих, які розводять у промисловому масштабі, наприклад, домашніх курей (*Gallus gallus domesticus*), качок, гусей та індичок, зазвичай вилуплюються чоловічі та жіночі особини у приблизно рівному співвідношенні. У роботі інкубаторів може бути бажано розділяти птахів на основі різних характеристик, зокрема статі. Наприклад, це може бути потрібно для обробки чоловічих і жіночих особин птахів різними вакцинами або для поділу популяції з метою визначення ефективного годування, уніфікації обробки або зниження виробничих витрат, оскільки чоловічі та жіночі особини птахів відрізняються за швидкістю росту та потребою в їжі. До того ж при промисловому виробництві яєць інкубація та виведення чоловічих особин найвищою мірою небажані, тому що це призводить до щорічного вибракування мільйонів курчат чоловічої статі.

Крім того, деяка частка яєць уже на початку інкубаційного періоду виявляються незаплідненими або містять нежиттєздатний ембріон, що різко знижує продуктивність інкубаторів та інкубаторних цехів. Дотепер виявлення життєздатних, тобто живих ембріонів, зазвичай проводили із застосуванням методики, відомої як "міражування" (просвічування) яєць, як це розкрито, наприклад, в EP-A-2369336 і US 7950349.

У цьому випадку яйце перевіряють з використанням джерела світла, що випромінює світло такої довжини хвилі, яке щонайменше частково проходить через яйце.

Хоча цей спосіб може показати, чи містить яйце живий ембріон, однак для одержання надійного результату необхідно вирощувати яйце щонайменше до 11 дня або навіть до більш пізньої стадії розвитку. Крім того, хоча така методика дозволяє розрізнити живе та неживе яйце, вона не дозволяє впевнено визначити стать та інші характеристики птахів, що не вилупилися.

У результаті виявляється, що птахофабрикам необхідно мати щонайменше вдвічі більш високу виробничу потужність у порівнянні з тією, яка могла бути при наявності ранньої селекції за статтю, що дозволяє у першу чергу відбирати тільки жіночі ембріони курчат.

Відповідно було б дуже коштовно для навколишнього середовища у світлі економії енергії та інших ресурсів і також непродуктивного відбраковування чоловічих особин курчат, а також зменшення стресу птахів, що вилуплюються, якби існував спосіб визначення статі пташиних ембріонів ще до стадії інкубації, що різко підвищило б продуктивність інкубаційних цехів.

Спосіб, який дозволяє відрізнити яйця з живими ембріонами від незапліднених і/або інших нежиттєздатних яєць, міг би забезпечити додаткове збільшення ефективності інкубації.

Y. Feng et al. описали в Appl. Magn. Reson. (2007), 32, 257-268 спосіб аналізу метаболітів в алантоїсній рідині курячих яєць на 9 добу інкубації методом ЯМР спектроскопії високого дозволу при 900 МГц.

Gu D.-C. et al., Chinese Journal of Animal Science, Vol. 7, 23-25, описали спосіб визначення методом ВЕРХ концентрації вільної аспарагінової кислоти, глутамінової кислоти, аргініну та лейцину в алантоїсній і амніотичній рідинах під час інкубації яєць. Однак цей спосіб не виходить за рамки визначення базового рівня для порівняння яєць незазначеного строку зберігання, а просто встановлює базовий рівень для чотирьох амінокислот. Крім того, розкритий тут спосіб дослідження є руйнуючим, тому що після дослідження яйця з живими ембріонами не використовують для інкубації або застосовують для інших цілей, наприклад, для одержання вакцин.

В US-A-2003/0096319 і WO-A-2006124456 розкриті способи визначення статі пташиного ембріона в яйці шляхом визначення естрогенної стероїдної сполуки, яка присутня в зразку ембріональної рідини, такої як алантоїсна рідина або кров з яйця птаха. Хоча цей спосіб може бути використаний без руйнування яйця, кількості естрогенного стероїду мінімальні та тест може бути успішним тільки після розвитку гонад, отже, при порівняно пізньому розвитку ембріона. Крім того, спосіб у WO-A-2006124456, очевидно, вимагає модифікування флуоресцентних маркерів для кожної сполуки та її підгрупи або генетичного модифікування таких сполук.

Ohta Y. et al., Poultry Science, Vol. 80, Nr. 10, 1430-1346, розкриває вплив уведення в яйце амінокислот на концентрацію амінокислот в ембріоні та інший вміст бройлерних яєць. Однак цим способом не можна визначити стать, життєздатність та/або стадії розвитку яйця птаха.

## Сутність винаходу

Відповідно даний винахід відноситься до способу визначення статі, стадії розвитку та/або життєздатності пташиного ембріона в яйці, який включає (а) визначення щонайменше першої маркерної сполуки розвитку, вибраної з цукрів і/або амінокислот, їх прекурсорів і метаболітів у яйці протягом часу від початку інкубації яйця до виходу з яйця; (b) вимірювання кількості щонайменше першої виявленої маркерної сполуки розвитку та (c) порівняння цієї кількості з базовим значенням для чоловічої та жіночої статі, для стадії розвитку ембріона та/або живого й загиблого або нерозвиненого ембріона з метою з'ясування, чи є ембріон живим, має чоловічу і/або жіночу стать та/або знаходиться на відповідній стадії розвитку.

В іншому аспекті даний спосіб відноситься до способу визначення статі та/або життєздатності пташиного ембріона в яйці, який включає (а) визначення щонайменше першої маркерної сполуки розвитку, вибраної з цукрів і/або амінокислот, їх прекурсорів і метаболітів у яйці протягом часу від початку інкубації яйця до виходу з яйця; (b) вимірювання кількості щонайменше першої виявленої маркерної сполуки розвитку та (c) порівняння цієї кількості з базовим значенням для чоловічої та жіночої статі та/або живого й загиблого або нерозвиненого ембріона з метою з'ясування, чи є ембріон життєздатним, чоловічим і/або жіночим.

У наступному аспекті даний винахід відноситься до способу визначення стадії розвитку пташиного ембріона в яйці згідно з будь-яким із попередніх пунктів, який включає (а) визначення щонайменше першої маркерної сполуки розвитку, вибраної з цукрів і/або амінокислот, їх прекурсорів і метаболітів у яйці; (b) вимірювання кількості щонайменше першої виявленої маркерної сполуки розвитку та (c) порівняння цієї кількості з базовим значенням для даної стадії розвитку від закладки до інкубації з метою визначення стадії розвитку ембріона та можливого часу до початку вилуплення.

Короткий опис фігур.

Фігура 1 показує моделювання методом найменших квадратів незалежного багатоваріантного аналізу даних  $^1\text{H}$  ЯМР для групи зразків на основі всіх метаболітів, визначених методом  $^1\text{H}$  ЯМР, у серії лабораторних аналізів курячих яєць. F означає жіночий, M означає чоловічий.

Фігура 2 показує моделювання методом найменших квадратів незалежного багатоваріантного аналізу даних  $^1\text{H}$  ЯМР для групи зразків на основі всіх метаболітів, визначених методом  $^1\text{H}$  ЯМР, для більш широкого набору даних із промислового інкубатора курчат. F означає жіночий, M означає чоловічий.

Докладний опис винаходу

Далі даний винахід описаний більш докладно разом із супровідним малюнком, на якому показаний переважний варіант. Однак даний винахід можна представити в різних формах, і він не обмежується наведеними нижче варіантами; більше того, ці варіанти будуть розкриті ретельно та повно й для фахівців будуть повністю відповідати обсягу винаходу. Якщо не визначено інакше, усі використані тут технічні та наукові терміни мають той самий зміст, що й загальноприйнятій для фахівців у тій області, до якої відноситься даний винахід. Використана в описі винаходу термінологія служить тільки для розкриття конкретних варіантів і не призначена для обмеження даного винаходу.

Використаний тут термін "пернатий" і "птаха" включає самців або самок будь-яких пернатих, але у першу чергу домашнього птаха, якого виробляють у промисловому масштабі через яйця або м'ясо. Відповідно терміни "птаха" і "пернатий" особливо відносяться до курей, індичок, качок, гусаків, перепелів і фазанів. Використаний тут термін "інкубація" відноситься до способу, яким птахи вилуплюють свої яйця, і до розвитку ембріона в яйці після того, як воно залишає черево курки. Тут період інкубації відноситься до безперервного періоду часу, під час якого конкретне яйце знаходиться в умовах, що імітують висиджування яєць до дозрівання, тобто появи птахів, включаючи будь-які маніпуляції або переноси, наприклад, із інкубатора у приміщення для дозрівання, за умови, що розвиток птиці не припинявся.

Використаний тут термін "в яйці" ("in ovo") відноситься до ембріонів птаха, що містяться в яйці до дозрівання. Даний винахід можна застосовувати на практиці для будь-якого типу пташиних яєць, включаючи, але не обмежуючись цим, яйця (домашньої) курки, індички, качки, гусака, перепілки та фазана.

Використаний тут термін "інжекція" або "ін'єкція" включають способи введення пристрою (зазвичай пролонгованого пристрою) в яйце або ембріон, у тому числі способи вивільнення або вивантаження речовини яйця або ембріона, способи видалення речовини (тобто зразка) з яйця або ембріона, і/або способи введення детектора в яйце або ембріон.

Переважно проводити аналізи за даним винаходом без руйнування, тобто таким чином, щоб тестовані пташині ембріони росли, якщо потрібно, або піддавалися подальшим стадіям обробки типу одержання вакцини in ovo за умови, що ембріон залишається живим.

Використаний тут термін "алантоїсна рідина" включає алантоїсну рідину з іншими компонентами яйця або без них. Наприклад, термін алантоїсна рідина може включати суміш крові й алантоїсної рідини. Варіанти даного винаходу не обмежуються екстрактивним матеріалом з алантоїсної рідини або областей під верхньою поверхнею яйця. Описане тут

5 видалення матеріалу з алантоїсної рідини служить просто одним із прикладів можливих варіантів за даним винаходом. З яйця можна витягати різні матеріали, включаючи, але не обмежуючись цим: амніон, дейтоплазму, оболонку, білок, тканину, мембрану та/або кров, і аналізувати для ідентифікації одного або декількох маркерів розвитку, як показано нижче. З яєць можна витягати будь-який матеріал практично з будь-якою орієнтацією. Термін

10 "попередньо визначена локалізація" тут вказує на фіксовану позицію або глибину всередині яйця. Наприклад, можна ввести в яйце деякий пристрій на фіксовану глибину та/або у фіксоване положення в яйці. В альтернативних варіантах можна провести ін'єкцію на основі інформації, отриманої з яйця, наприклад, після розгляду положення ембріона або підзародкової порожнини в яйці.

15 Краще, коли використаний тут термін "порівняння кількості" включає моноваріантний або переважно багатоваріантний аналіз досліджуваних метаболітів і визначення зв'язку пташиного ембріона з певною популяцією. Стадія може включати встановлення присутності аналітів, тобто метаболітів, у пробах за допомогою багатоваріантного статистичного мас-спектрального, ЯМР або іншого аналізу або на підставі даних, отриманих іншими способами. Переважно, щоб

20 програма багатоваріантного статистичного аналізу включала програму аналізу основних компонентів і/або програму дробового регресійного аналізу за методом найменших квадратів. Таким чином, даний винахід відноситься до способу, апаратури та системи визначення статі, стадії розвитку та/або життєздатності пташиного ембріона в яйці, включаючи програму багатоваріантного статистичного аналізу, а також імплементованого в мікропроцесор методу їх визначення.

Способи й апаратуру за варіантами даного винаходу можна використовувати для ідентифікації однієї або декількох характеристик яйця у будь-який момент періоду ембріонального розвитку, також визначеного як період його інкубації. Варіанти за даним винаходом не обмежені конкретним днем під час періоду ембріонального розвитку.

30 Перевагою є те, що в даному способі маркери розвитку можна аналізувати інвазивно або неінвазивно.

При інвазивному проведенні аналізу зазвичай екстрагують пробу з матеріалу яйця. Пробу переважно відбирають з ембріональної рідини, переважно з алантоїсної рідини, тому що це мінімізує ймовірність псування ембріона. Зазвичай алантоїсна рідина є екскреторним середовищем для азотистих метаболітів пташиного ембріона. Алантоїсна рідина починає

35 формуватися приблизно на 3 добу інкубації, як показали Hamburger, V and Hamilton, HL (1951). "A series of normal stages in the development of the chick embryo". Journal of Morphology 88 (1): 49-92. Тут показано, що алантоїс помітний на 65 годину після інкубації у вигляді короткої товстостінної кишені; ще не везикулярної. Через 72 години алантоїс ставав везикулою різного розміру, у середньому розміру середнього мозку, і це вказує на те, що алантоїс й алантоїсна

40 рідина з'являються на 3 добу.

Вона досягає максимального об'єму приблизно на 13 добу інкубації та при продовженні інкубації зменшується в об'ємі через втрату вологи та ресорбції рідини, але на 18 добу інкубації все ще є присутня у вигляді значних об'ємів.

45 Алантоїсна рідина відділена від яєчної шкаралупи внутрішньою та зовнішньою оболонковими мембранами та хоріоалантоїсними мембранами. Хоча алантоїсна рідина охоплює всю периферію яйця з зародком, зазвичай алантоїсна рідина накопичується у вершині яйця безпосередньо під мембранами, що покривають повітряну порожнину.

Алантоїсна рідина накопичується зверху яйця завдяки силі тяжіння та завдяки витисненню щільним ембріоном і жовтковим мішком. Спроби акуратно відібрати пробу алантоїсної рідини

50 через вершину яйця, поставленого вертикально, можуть бути утруднені, тому що повітряний простір міняється від яйця до яйця. Для того, щоб зібрати алантоїсну рідину в локалізованому центрі, можна скористатися силою тяжіння. При обертанні яйця уздовж довгої осі алантоїсна рідина буде збиратися у вершині яйця прямо під шкаралупою. Укладання яєць за довгою віссю

55 призводить до того, що алантоїсна рідина сприяє екстракції проби.

Речовину типу алантоїсної рідини можна витягати з яйця різними способами, включаючи проникнення через шкаралупу яйця та введення канюлі через мембрани. Зразок рідини, що відбирається, можна потім повернути назад, якщо мембрану та/або шкаралупу швидко заліпити підходящою речовиною або дати закритися самостійно.

Підходящі способи й апаратура для проникнення в яйце та інвазивного добору проби розкриті, наприклад, в US-A-20070137577, WO-A-00/22921 або WO-A-99/34667. З відібраною в такий спосіб пробую далі маніпулюють для визначення маркерів розвитку й аналізу відносних і/або абсолютних кількостей присутніх маркерів розвитку.

Присутність маркера або маркерів розвитку в пробі можна аналізувати будь-яким методом визначення та кількісної оцінки. Переважно аналізувати методами магнітної резонансної томографії, включаючи методи ядерного магнітного резонансу; спектральними резонансними методами, у тому числі методом інфрачервоної спектроскопії та Раман-спектроскопії, і/або аналітичними методами типу ГРХ або ВЕРХ із відповідними детекторами, методами флуоресцентної спектроскопії та/або імуносорбентного аналізу з привитими ферментами, включаючи сухий і мокрий методи, такі як метод з індикаторними смужками. У той час як інвазивні способи дозволяють прямо відібрати пробу та проаналізувати відібрану рідину, переважно проводити аналіз неінвазивно завдяки ефективності такого аналізу при тому, що шкаралупа яйця та мембрани в ньому залишаються неушкодженими.

Для неінвазивного аналізу можна застосовувати будь-який підходящий спосіб. Зазвичай застосовують кількісні спектральні резонансні методи, включаючи інфрачервону або Раман-спектроскопію, переважно залучаючи вторинні спектри для виявлення абсолютних і/або відносних кількостей маркерів розвитку в яйці. Незважаючи на те, що використання неінвазивних способів було розкрито в деяких публікаціях, наприклад, в US-A-2011/144473 і US-A-7950349, ці публікації тільки в загальному описують сумарні емісійні спектри, що на практиці не дозволяє розрізнити стадію розвитку, життєздатність та/або стать ембріона. Даний спосіб відрізняється від розкритих способів зокрема тим, що встановлює присутність деяких компонентів у яйці за допомогою вторинних похідних спектрів, що дозволяють селективно визначати абсолютні та відносні кількості одного або декількох маркерів розвитку.

Зокрема для досягнення необхідної точності та відтворюваності можна використовувати диференціальну ІЧ-Фур'є та Раман-Фур'є спектроскопію або їх комбінацію, тоді як методи магнітного резонансу можна застосовувати для визначення природи маркерів розвитку та встановлення базового рівня для калібрування системи.

Даний спосіб дозволяє з успіхом визначити життєздатність та/або стать ембріона ембріон і/або переважно стадії розвитку від початку інкубації до вилуплення.

Переважно проводити вимірювання протягом 1-15 діб, більш переважно 2-14 діб, ще більш переважно 3-13 діб і навіть більш переважно 4-12 діб після початку інкубації та стадію а) переважно проводити протягом 6-12 діб після початку інкубації яйця.

Це дозволяє уникнути витрат на інкубування яєць або неживих або не тієї статі. Крім того можна визначити реальну стадію розвитку яйця. Для порід з більш короткими або довгими періодами інкубації, ніж в домашніх курей, можна вибрати інші періоди часу.

Маркери розвитку за даним винаходом переважно вибирати з цукрів, амінокислот і їх метаболітів і/або прекурсорів.

З них особливо важливі маркери розвитку включають глюкозу, холін і валін, кожний з яких робить статистично значимий вплив на визначення статі пташиного ембріона.

Не звертаючись до якої-небудь конкретної теорії, можна вважати, що холін і триметилглїцин і його амінокислотна похідна особливо застосовні для підтримки розвитку нервової системи плода. Було встановлено, що співвідношення холіну та триметилглїцину (бетаїну) сильно відрізняється у чоловічих і жіночих ембріонів, причому абсолютні кількості холіну вище в алантоїсній рідині жіночих ембріонів. У цілому холін і його метаболіти необхідні для досягнення трьох важливих фізіологічних цілей: структурна цілісність та сигнальні функції для клітинних мембран; холінергічна нейротрансмісія (синтез ацетилхоліну) та основне джерело метильних груп через його метаболіт триметилглїцин, який бере участь у синтезі S-аденозилметіоніну (SAME). З іншого боку, було встановлено, що валін і глюкоза також помітно варіюються у чоловічих і жіночих ембріонів.

У випадку птахів *Gallus gallus domesticus* переважно, щоб першим або наступним маркером розвитку в алантоїсній рідині була глюкоза в абсолютній кількості в інтервалі 30-70 мкмоль/мл для жіночих ембріонів і 1-30 мкмоль/мл для чоловічих ембріонів.

Іншим першим або наступним переважним маркером розвитку для ембріонів *Gallus gallus domesticus* є холін в алантоїсній рідині в абсолютній кількості для жіночих ембріонів в інтервалі від 110 мкмоль/мл до 130 мкмоль/мл і для чоловічих ембріонів від 90 мкмоль/мл, до, але не включно, 110 мкмоль/мл.

Ще одним першим або наступним маркером розвитку для ембріонів *Gallus gallus domesticus* переважно є валін в алантоїсній рідині в абсолютній кількості для жіночих ембріонів в інтервалі

від 110 мкмоль/мл до 130 мкмоль/мл і для чоловічих ембріонів від 90 мкмоль/мл до, але не включно, 110 мкмоль/мл.

Переважно, щоб у даному способі щонайменше другий маркер визначався на стадії (а), причому щонайменше перший і другий маркери аналізують та порівнюють з базовим значенням і встановлюють їх співвідношення.

Селективність визначення життєздатності та статі можна з успіхом удосконалити шляхом кореляції аналізу для двох або трьох маркерів. Відповідно переважно детектувати й аналізувати щонайменше перший і другий та/або наступний маркер розвитку, причому стать та/або життєздатність визначають за абсолютними кількостями та співвідношенням щонайменше першого й другого та/або наступних маркерів.

Даним способом також можна визначити, чи є ембріон живим і чоловічим або живим і жіночим, відокремити множину живих чоловічих яєць від множини живих жіночих яєць та одержати селекцію яєць на переважно чоловічі або жіночі.

Отримані в такий спосіб групи яєць з живих жіночих або чоловічих можна інкубувати та вилуплювати й одержати популяції переважно жіночих або чоловічих особин курей.

Переважним також є те, що даний спосіб дозволяє вводити вірус або вірусоподібний матеріал у кожне яйце, ідентифіковане як утримуюче живий чоловічий або жіночий ембріон, і після інкубації виділити з інкубованих яєць отриману вакцину.

Після ін'єкції посівного вірусу яйця, що містять живі ембріони, переносять в інкубатор на попередньо визначений час. Наприкінці цього періоду яйця переносять на станцію одержання вакцин, де з кожного яйця витягають, наприклад, амніотичну рідину.

Відповідно даний винахід включає також стадії вмертвіння ембріона в інфікованому яйці та збору амніотичної рідини з кожного мертвого яйця, причому амніотична рідина містить вакцину, і виділення вакцини з амніотичної рідини. Наприклад, вірус включає вірус грипу людини й, отже, зібрана амніотична рідина містить людську протигрипозну вакцину.

Маркери розвитку згідно з даним винаходом можна також використовувати для визначення віку ембріона або можна використовувати інші маркери.

Маркери розвитку, які застосовують для визначення віку ембріона, переважно вибирати з амінокислот і їх метаболітів і/або прекурсорів. Заявники встановили зокрема, що абсолютні та відносні кількості амінокислот, більш переважно триметилгліцину, аспартату й аспарагіну, глутамату та глутаміну й проліну, можуть прямо бути зв'язані зі стадією розвитку пташиного ембріона в яйці. Це досить суттєво, тому що ряд особливостей дозволяє визначати стадію розвитку або вік пташиного ембріона, у тому числі на ранніх стадіях розвитку.

Відповідно даний винахід також дозволяє виділити яйця на практично однаковій стадії розвитку або реального віку, з'єднати множину яєць практично одного віку та потім регулювати інкубацію. У результаті дозрівання повинно бути більш рівномірним, що призведе до більш однорідної популяції курей або їх підвищеній якості завдяки зменшенню стресу та зменшенню числа птахів, що рано вилупилися, які далі поміщають в умови тривалого штучного інкубування.

Отримана популяція птахів, що вилупилися, буде більш якісною, що призведе до більшого виходу та зниження наступних вимог до популяції курей, наприклад, зменшеної кількості обробок.

Аналогічне використання популяції яєць вибраного віку дозволить також більш ефективно готувати вакцини, тому що тут стадія розвитку пташиного ембріона визначає момент часу, коли введення вірусу буде найбільше ефективно.

Даний винахід також відноситься до селекції яєць та після вилуплення до популяції курей, яку одержують цим способом.

Наступні необмежуючі приклади наведені для ілюстрації винаходу.

Приклад 1

Методика визначення метаболічного профілю in ovo

Яйця курей *Gallus gallus domesticus* інкубували при 37.8 °C, перевертаючи щогодини, в інкубаторі моделі 50 від MS Broedmachines V.O.F.

Одну групу з 12 яєць інкубували протягом 9 діб, другу групу з 12 яєць інкубували протягом 10 діб і третю групу з 12 яєць інкубували протягом 11 діб.

Яйця витягали з інкубатора та поміщали у паперовий тримач під мікроскопом повітряною порожниною догори. Проколювали та розламували шкаралупу й мембрану навколо повітряної порожнини, залишаючи недоторканою мембрану. За допомогою підсвічування знаходили кровоносні судини над внутрішньою мембраною, робили маленький прокол, уникаючи влучення в кровоносні судини, через внутрішню та зовнішню мембрани в алантоїсну порожнину.

Яйце нахилили та за допомогою 1 мл піпетки вводили повітря в цю порожнину, після чого витягали піпеткою від 1.5 до 2 мл алантоїсної рідини. Цю рідину переносили в кріопробірку та негайно заморожували в рідкому азоті. Потім зразки витягали та зберігали при -80 °C.

Ембріон витягали з яйця, відрізаючи мембрани за допомогою маленької ложечки. Ембріон поміщали в охолоджувану льодом пробірку Falcon, наповнену 96 %-м етанолом, і зберігали на льоді в темряві при кімнатній температурі.

Алантоїсну рідину відбирали при -80 °C, розморожували та в скляну пробірку вносили 1 мл зразка.

До зразка скляною пастеровською піпеткою додавали 1 мл хлороформу та 1 мл суміші метанол-вода (1:1). Пробірки закривали кришкою та струшували 20 секунд, а потім охолоджували при 4 °C протягом 10 хвилин. Потім за допомогою пастеровської піпетки відбирали 1 мл верхнього шару з цієї суміші та поміщали в кріопробірку. У кришці кріопробірки проколювали отвір і проводили сублімаційне сушіння протягом ночі. Продукт сублімаційного сушіння використовували як зразок для зйомки ЯМР спектра.

#### 15 Приклад 2

Методика визначення метаболічного профілю in ovo

Яйця курей *Gallus gallus domesticus* інкубували при 37.8 °C, повертаючи щогодини, у промисловому інкубаторі від Petersime NV. Одну групу з 50 яєць інкубували протягом 8 діб, другу групу з 50 яєць інкубували протягом 9 діб і третю групу з 50 яєць інкубували протягом 10 діб.

Яйця витягали з інкубатора та поміщали у пластиковий тримач під мікроскопом повітряною порожниною догори.

Проколювали та розламували шкаралупу й мембрану навколо повітряної порожнини, залишаючи недоторканою мембрану. За допомогою підсвічування знаходили кровоносні судини над внутрішньою мембраною, робили маленький прокол, уникаючи влучення в кровоносні судини, через внутрішню та зовнішню мембрани в алантоїсну порожнину.

Яйце нахилили та за допомогою 1 мл піпетки вводили повітря в цю порожнину, після чого витягали піпеткою від 1.5 до 2 мл алантоїсної рідини. Цю рідину переносили в кріопробірку та негайно заморожували в рідкому азоті. Потім зразки витягали та зберігали при -80 °C.

Ембріон витягали з яйця, відрізаючи мембрани за допомогою маленької ложечки. Ембріон поміщали в охолоджувану льодом пробірку Falcon, наповнену 96 %-м етанолом, і зберігали на льоді в темряві при кімнатній температурі.

Алантоїсну рідину відбирали при -80 °C, розморожували та вносили 0.5 мл зразка в кріопробірку. У кришці кріопробірки проколювали отвір і проводили сублімаційне сушіння протягом ночі. Продукт сублімаційного сушіння використовували як зразок для зйомки ЯМР спектра.

Визначення статі - контроль:

Курячий ембріон витягали з етанолу, сушили 10 хвилин при кімнатній температурі. Відрізали маленький шматочок лівої ніжки, який використовували для виділення ДНК, за допомогою набору для виділення ДНК (Qiagen Dneasy kit), і потім визначали кількість ДНК за допомогою нанокпельного пристрою.

Для визначення статі ембріона використовували ПЛР аналізатор з праймерами 1272H і 1237L (Sigma). Використовували програму ПЛР, 95 °C протягом 5 хвилин, потім 36 разів 95 °C протягом 45 секунд, 56 °C протягом 45 секунд, 72 °C протягом 1 хвилини та потім один раз при 72 °C протягом 5 хвилин. Стать ембріона визначали за результатами ПЛР аналізу, ідентифікували з використанням 2 % агарового гелю.

Готування зразка для ЯМР

Зразок 50-100 мг матеріалу, одержаного як описано вище, вивчали методом двомірної (2D)-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-J-дозволеної ЯМР спектроскопії з використанням 3-(триметилсиліл)пропіонової-2,2,3,3-d4 кислоти (TSP) в якості внутрішнього стандарту, як описано в Nature Protocols, Vol.5, No.3, 2010, pages 536-549, і Phytochemistry 71, 2010, 773-784.

Отримані дані для Прикладу 1 наведені в Таблиці 1:



Таблиця 1

Отримані дані для чоловічих і жіночих ембріонів

Маркери розвитку	Жіночі (мкмоль/мл; у дужках стандартне відхилення)	Чоловічі (мкмоль/мл; у дужках стандартне відхилення)
Глюкоза	51 (17.7)	32.2 (10.5)
Холін	125.8 (21.4)	101.3 (21.1)
Валін	23.7 (4.09)	28.6 (3.63)

Багатопараметричний аналіз даних

5 При обробці даних  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопії для групи зразків використовували моделювання методом дробових найменших квадратів з багатопараметричним статистичним аналізом для визначення всіх метаболітів, виявлених методом  $^1\text{H}$  ЯМР. Найбільш важливою отриманою інформацією виявилася кореляція між двома наборами даних, а саме дані для вимірюваних  $^1\text{H}$  ЯМР сигналів (для метаболітів) і дані для класифікації зразків (групова інформація).

10 Такий аналіз дозволив визначити не тільки абсолютні кількості маркерів розвитку для чоловічих і жіночих ембріонів, але також і їх відносні кількості. При додаванні другого та третього маркерів селективність тестування зростала в ще більшому ступені. На Фігурах 1 і 2 показані відповідно результати багатопараметричного аналізу для Прикладів 1 і 2 і інформація з визначення статі ембріона.

Приклад 3. Визначення віку ембріона

15 Приклад 1 повторили, але при цьому аналізували ті маркери розвитку, для яких було встановлено, що вони важливі для визначення стадії розвитку або віку ембріонів.

Таблиця 2

Отримані дані для 9-11 діб

Маркер розвитку	9 діб (мкмоль/мл) (Стандартне відхилення в дужках)	10 діб (мкмоль/мл)	11 діб (мкмоль/мл)
Триметилглїцин	0.75 (0.27)	0.65 (0.2)	0.43 (0.13)
Аспартат і Аспарагін	9.35 (3.2)	7.72 (2.75)	5.34 (3.91)
Глутамат і Глутамін	41.5 (7.71)	37.1 (3.94)	31.7 (5.33)
Пролін	12.7 (2.69)	11 (1.58)	9.02(1.59)

20 Отримані дані чітко показують, що стадію розвитку ембріона можна визначити за допомогою одного або більше маркерів розвитку.

25 Для угруповання зразків за даними  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопії для всіх метаболітів, виявлених методом  $^1\text{H}$  ЯМР, використовували моделювання методом дробових найменших квадратів з багатопараметричним статистичним аналізом. Найбільш важливою отриманою інформацією виявилася кореляція між двома наборами даних, а саме даних для вимірюваних  $^1\text{H}$  ЯМР сигналів (для метаболітів) і даних для класифікації зразків (групова інформація).

30 Багатопараметрична модель дозволила виявити зв'язок між статтю, віком і/або життєздатністю ембріона та відносною кількістю присутніх метаболітів. Використання альтернативних аналітичних методів, таких як, наприклад, ГХ/МС, дає аналогічні результати, що узгоджуються з отриманими.

35 Проведений аналіз дозволив визначити не тільки абсолютні, але й відносні кількості маркерів розвитку. Додавання другого та третього маркерів підвищувало селективність тестування в ще більшому ступені.

Наведені вище приклади ясно показують переваги способу та матеріалів даного винаходу. Хоча наведений докладний опис містить конкретні варіанти даного винаходу, даний опис не має на меті обмежити винахід розкритими тут конкретними прикладами або варіантами, тому що вони дані лише для ілюстрації, а не для обмеження, що буде очевидно для фахівців у даній області.

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб відбору групи яєць однієї статі, стадії розвитку та/або життєздатності шляхом неруйнуючого визначення статі, стадії розвитку та/або життєздатності пташиного ембріона в кожному яйці, який включає:
  - (a) визначення щонайменше першого маркера розвитку, вибраного з триметилглїцину, аспартату, аргїніну, глутамату, глутамїну й проліну, та/або першого маркера статі, вибраного з глюкози, холїну та/або валїну в алантоїсній рїдинї у яйці протягом часу від початку інкубування яйця до його вилуплення;
  - (b) вимїрювання кількості щонайменше першого маркера розвитку та/або першого маркера статі, та
  - (c) порівняння цієї кількості з базовим значенням для чоловічого та жіночого ембріона, стадії розвитку ембріона та/або живого, мертвого або нерозвиненого ембріона для того, щоб визначити, чи є даний ембріон життєздатним, чоловічим або жіночим і на якій стадії розвитку він знаходиться.
2. Спосіб за п. 1, у якому щонайменше другий маркер визначають на стадії (a), в якій щонайменше перший і другий маркери аналізують та порівнюють з базовим значенням і для кожного з них установлюють співвідношення маркерів розвитку.
3. Спосіб за п. 1 або 2, у якому пташина особина є куркою домашньою *Gallus gallus domesticus* і в якому першим або наступним маркером розвитку є глюкоза при абсолютному вмісті в жіночому ембріоні від 30 мкмоль/мл до 70 мкмоль/мл і в чоловічому ембріоні від 1 мкмоль/мл до 30 мкмоль/мл.
4. Спосіб за п. 3, у якому першим або наступним маркером розвитку є холін при абсолютному вмісті в жіночому ембріоні від 110 мкмоль/мл до 130 мкмоль/мл і в чоловічому ембріоні від 90 мкмоль/мл аж до, але не включно, 110 мкмоль/мл.
5. Спосіб за п. 3 або 4, у якому першим або наступним маркером розвитку є валін при абсолютному вмісті в жіночому ембріоні від 110 мкмоль/мл до 130 мкмоль/мл і в чоловічому ембріоні від 90 мкмоль/мл аж до, але не включно, 110 мкмоль/мл.
6. Спосіб за будь-яким із пп. 3-5, у якому визначають й аналізують щонайменше перший і другий маркери розвитку та в якому використовують абсолютні кількості та співвідношення щонайменше першого та другого маркерів для визначення статі та/або життєздатності ембріона.
7. Спосіб за будь-яким із попередніх пп., який включає стадію інвазивного аналізу ембріональної рїдини.
8. Спосіб за п. 7, у якому аналіз проводять методами магнітно-резонансної томографії, включаючи ядерний магнітний резонанс; методами спектрального резонансу, включаючи інфрачервону або Раман-спектроскопію; і/або аналітичним методом, таким як ГРХ або ВЕРХ з відповідними детекторами, флуоресцентна спектроскопія та/або імуносорбентний аналіз із іммобілізованими ферментами.
9. Спосіб за будь-яким із попередніх пп., який включає з'ясування того, чи є ембріон в яйці життєздатним і чоловічим або життєздатним і жіночим, а також відділення групи життєздатних чоловічих яєць від групи життєздатних жіночих яєць з метою відбору переважно чоловічих або переважно жіночих яєць.
10. Спосіб за п. 9, який включає інкубування та дозрівання відібраних життєздатних жіночих яєць або життєздатних чоловічих яєць з метою одержання переважно жіночої або переважно чоловічої групи курчат.
11. Спосіб за будь-яким із попередніх пп., який включає визначення стадії розвитку ембріона та ймовірного часу його дозрівання, а також поділ яєць на групи з близькою або однаковою стадією розвитку.
12. Спосіб за будь-яким із попередніх пп., який включає визначення життєздатності ембріона та поділ яєць на групи життєздатних і нежиттєздатних яєць.
13. Спосіб за пп. 9-12, який надалі включає відбір життєздатних яєць для інкубування та дозрівання відповідно до очікуваного часу дозрівання, з метою одержання групи курчат переважно однієї й тієї самої стадії розвитку.
14. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який включає
  - (a) виявлення щонайменше першої маркерної сполуки розвитку, вибраної з триметилглїцину, аспартату, аргїніну, глутамату, глутамїну й проліну у яйці;
  - (b) визначення кількості щонайменше першої виявленої маркерної сполуки розвитку, та

(с) порівняння цієї кількості з базовим значенням, установленим для стадії розвитку від закладки до вилуплення, з метою визначення стадії розвитку ембріона та ймовірного часу його дозрівання.

5 15. Спосіб за п. 14, у якому на стадії (а) виявляють щонайменше другий маркер, аналізують щонайменше перший і другий маркери та порівнюють з базовим значенням і для кожного з них визначають співвідношення маркерів розвитку.

16. Спосіб за п. 14 або 15, у якому пташина особина являє собою домашню курку *Gallus gallus domesticus* і маркери розвитку вибирають з триметилглїцину, аспартату й/або аспарагіну; глутамату та/або глутаміну та/або проліну.

10 17. Спосіб за будь-яким із пп. 14-16, у якому виявляють й аналізують щонайменше перший і другий маркери розвитку та використовують абсолютні кількості та співвідношення щонайменше першого та другого маркерів для визначення стадії розвитку ембріона.

18. Спосіб за будь-яким із попередніх пп., у якому стадію аналізу ембріональної рідини проводять інвазивно.

15 19. Спосіб за п. 18, у якому аналіз проводять методом магнітно-резонансної томографії, включаючи методи ядерного магнітного резонансу; спектрально-резонансними методами, включаючи інфрачервону або Раман-спектроскопію, а також такими аналітичними методами, як ГРХ або ВЕРХ з відповідними детекторами, флуоресцентна спектроскопія та/або імуносорбентний аналіз із привитими ферментами.

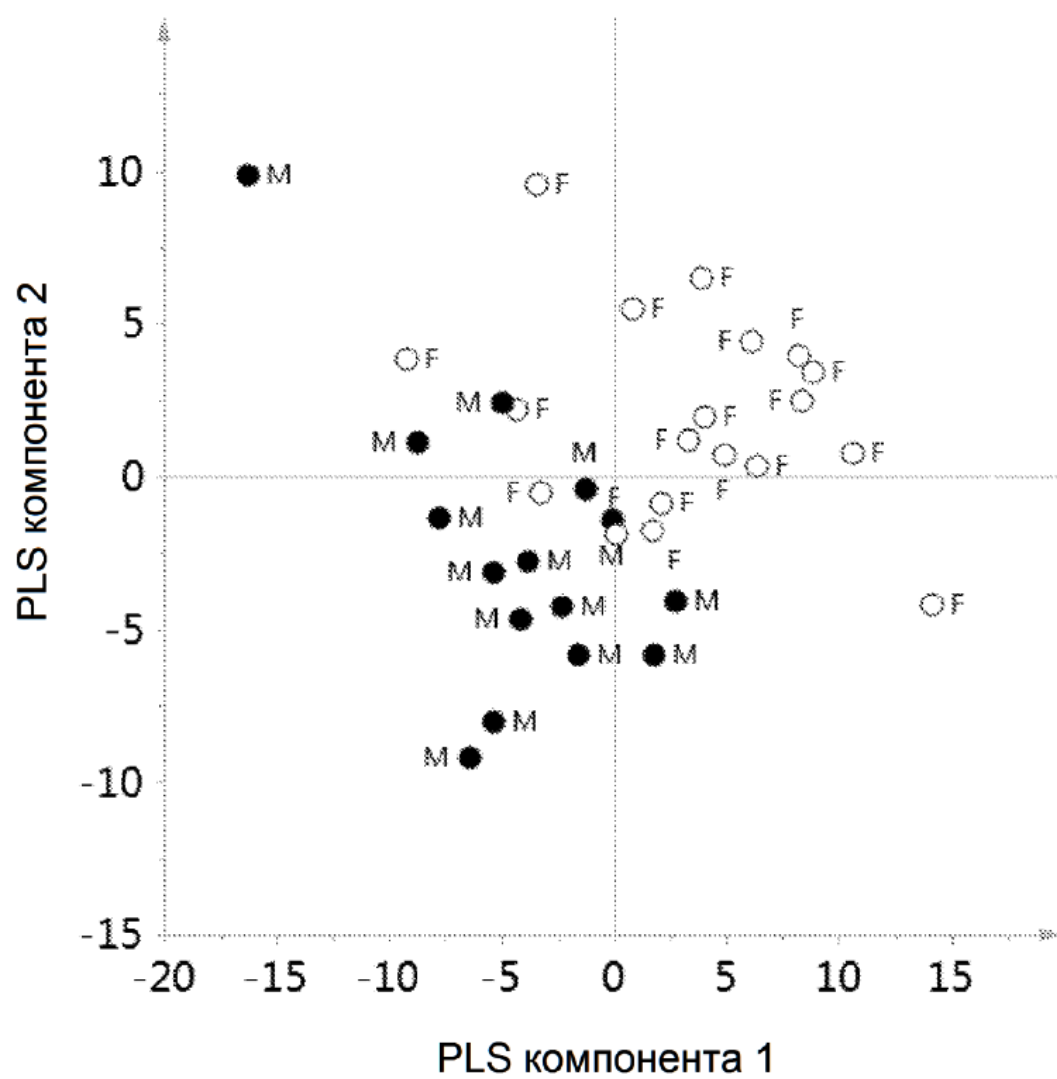
20 20. Спосіб за будь-яким із попередніх пп., який включає відбір яєць на фактично однаковій стадії розвитку.

21. Спосіб за п. 20, який включає відбір яєць на інкубування та дозрівання відповідно до їх стадії розвитку для одержання групи курчат фактично однакового віку.

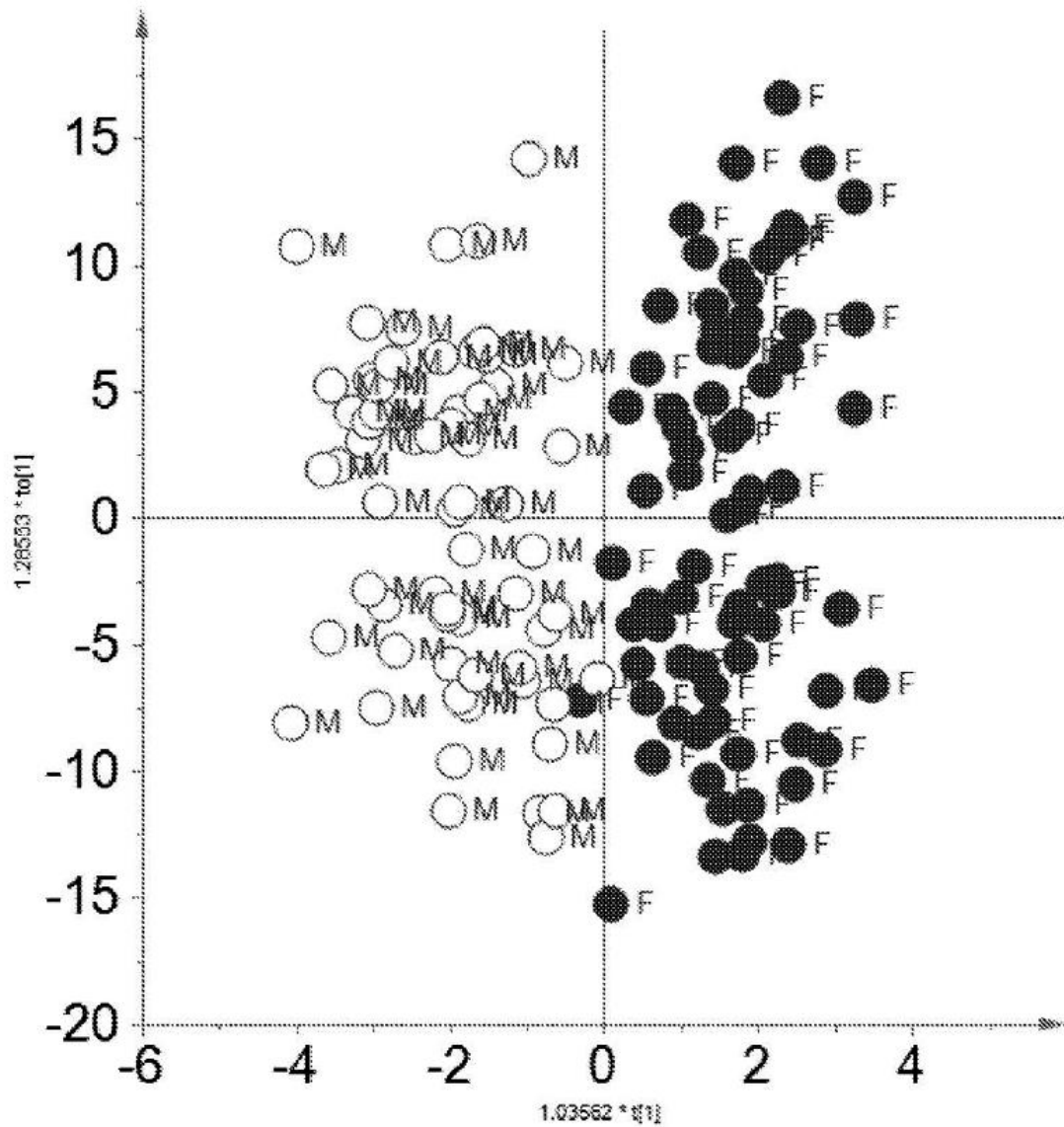
25 22. Спосіб за будь-яким із пп. 14-21, який включає визначення життєздатності яйця та відділення нежиттєздатних яєць до стадії вилуплення та/або введення вірусного або вірусоподібного матеріалу.

23. Спосіб за будь-яким із попередніх пп., який дозволяє з'ясувати, чи є ембріон чоловічим або жіночим, і відокремити групи чоловічих яєць від групи жіночих яєць з метою одержання переважно чоловічих або переважно жіночих яєць.

Фиг.1



**Фіг.2**



Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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