

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11

УТВЕРЖДАЮ

№ госрегистрации 115011660024

Инв. №



Директор ИФАВ РАН,

член-корреспондент РАН,

С.О. Бачурин С.О. Бачурин

«25» июня 2015 г.

**«МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БОЛЬШИХ КОЛИЧЕСТВ
РАННИХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ С ПОМОЩЬЮ ГОРМОНАЛЬНОЙ
СТИМУЛЯЦИИ СУПЕРОВУЛЯЦИИ И СИНХРОННОГО ВЫБРОСА»**

СТП-14.621.21.0008.02-2015

Ответственный исполнитель
Заведующий лабораторией,
к.б.н.

С.Г. Ключков

«25» июня 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

СОДЕРЖАНИЕ

1. Наименование методики измерений	3
2. Назначение методики измерений и область применения	3
3. Нормативные ссылки	3
4. Погрешность измерений.....	4
5. Требования к показателям точности измерений.....	4
6. Условия измерений	4
7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым при выполнении данной методики.....	4
7.1. Реактивы.....	4
7.2. Материалы	4
7.3. Оборудование	5
8. Операции при выполнении данной методики.....	5
8.1. Необходимые замечания	5
8.2. Проведение гормональной стимуляции одновременного развития фолликулов яичника.	5
9. Обработка и оформление результатов измерений.....	10
10. Требования безопасности, охраны окружающей среды	10
11. Требования к квалификации операторов.....	10

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.02-2015 устанавливает методику «Методика получения и культивирования больших количеств ранних эмбрионов мыши с помощью гормональной стимуляции суперовуляции и синхронного выброса»

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуру получения и культивирования больших количеств ранних эмбрионов мыши с помощью гормональной стимуляции суперовуляции и синхронного выброса.

Основными областями применения данной методики являются биологические науки (Разведение и поддержание популяции лабораторных животных)

3. Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты и документы:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

СТП – 1.42.02 – 2002 Стандарты предприятия. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию, обозначению и порядку введения

ГОСТ 1.5—2001 Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по

межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

4. Погрешность измерений

Не устанавливаются.

5. Требования к показателям точности измерений

Не устанавливаются.

6. Условия измерений

Не устанавливаются.

7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым при выполнении данной методики

7.1. Реактивы

- Гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) (MSD AnimalHealth, США)
- Среда M2 medium(SigmaAldrich, Германия)
- Фосфатный Солевой буфер (PBS): 77 mMгидрофосфат натрия, 23mMдигидрофосфат натрия, 1,5 Mхлорид натрия; pH=7,2
- Этиловый спирт 75%
- Человеческий хорионидный гонадотропин (ЧХГ)(SigmaAldrich, Германия)

7.2. Материалы

- Чашки для клеточных культур 35x10 мм, стерильные (Corning, США)
- Шприц объем 2 мл, набор игл (BD, США)
- Капилляры из боросиликатного стекла (IPC, США)

- Лабораторные пробирки, объем 1,5 мл (Eppendorf, Германия)
- Система для инфузий (BD, США)
- Фильтры, 0,45 мкм (Millipore, Ирландия)

7.3. Оборудование

- Ламинарный шкаф
- Бинокляр
- Хирургические инструменты (Dimeda, Германия): Хирургические ножницы (2 шт), пинцет с тупым наконечником (2 шт), пинцет с острым наконечником.
- CO₂инкубатор

8. Операции при выполнении данной методики

8.1. Необходимые замечания

При выполнении последующих действий строгое соблюдение указанного временного режима имеет критическое значение.

8.2. Проведение гормональной стимуляции одновременного развития фолликулов яичника.

1 День, 14.00: Ввести самкам-донорам в возрасте 23-25 дней (зависит от линии мышей) гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) в количестве 5 МЕ в 100мкл внутривентрально.

2 День: Пауза

3 День, 12.00: Ввести тем же самкам человеческий хорионический гонадотропин (ЧХГ) в количестве 5 МЕ в 100мкл внутривентрально. Через 10-12 часов у этих самок произойдет суперовуляция. Сразу после инъекции

ЧХГ необходимо провести бридинг, посадив каждую самку в клетку к самцу на ночь.

4 День, 8.00: Отобрать самок, имеющих вагинальный плаг. (Рисунок 1)

8.4 Выделение эмбрионов мыши на стадии ранней бластоцисты из полости рогов матки самок-доноров



Рисунок 1

Самкам-донорам, на 3.5 день после обнаружения вагинального плага, провести цервикальную дислокацию. С вентральной стороны тела животного сделать небольшой горизонтальный надрез, затем развести верхние и нижние края раны обнажив брюшную стенку (Рисунок 2).

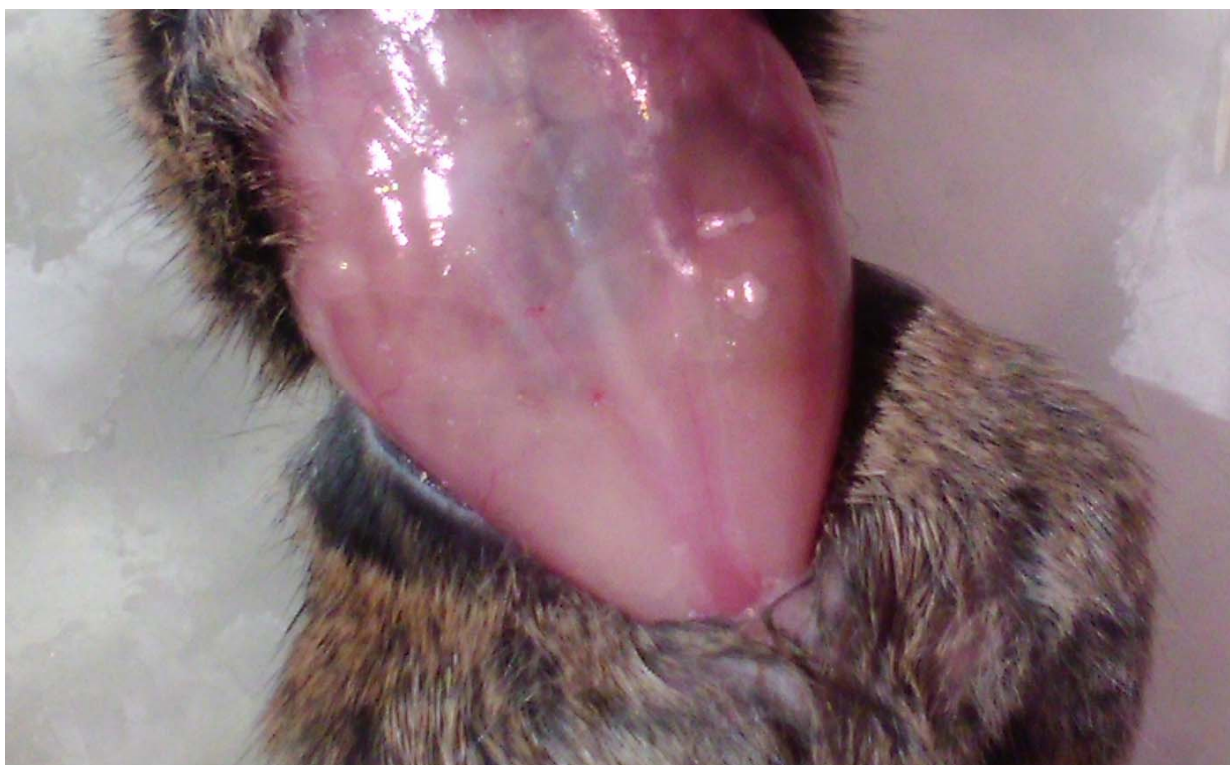


Рисунок 2

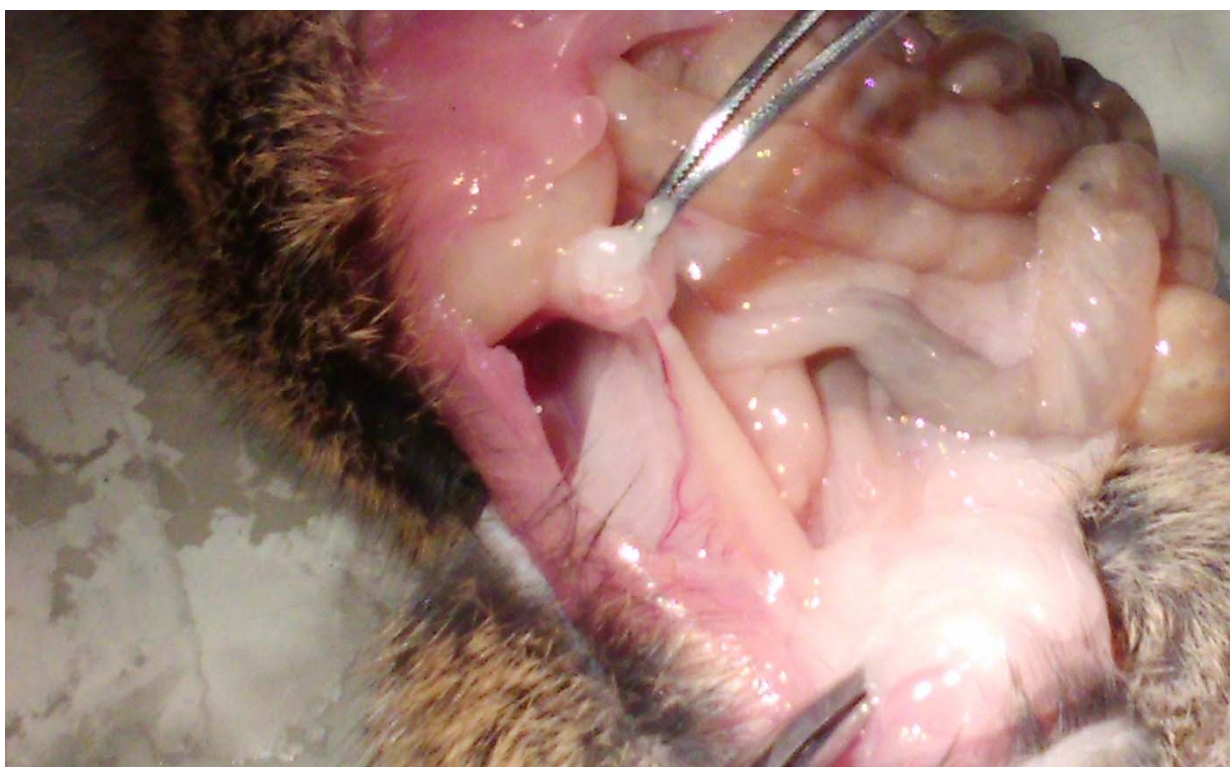


Рисунок 3



Рисунок 4

Удалить брюшную стенку для получения свободного доступа к органам брюшной полости при помощи пинцета зафиксировать один из рогов матки, ножницами освободив его вместе с его брыжейкой и яичником (Рисунок 3). Повторить указанную процедуру для второго рога. Диссекцию рогов необходимо провести максимально близко от зоны бифуркации матки (Рисунок 4).

Пинцетом аккуратно расправить брыжейку (Рисунок 5), после чего полностью ее отсечь.



Рисунок 5

Отделить яичник и яйцевод. Наполненный PBS 2 мл шприц расположить так, чтобы игла, введенная с дистального конца рога матки, оказалась в его полости. Проксимальный конец рога матки следует поместить на дно стерильной чашки для клеточных культур. Плавным нажатием на поршень шприца пропустить через полость рога матки 1 мл PBS, при этом весь объем введенного буфера, пройдя через проксимальный конец, должен быть собран в чашке. Повторить вышеописанные процедуры для каждого рога матки.

Поиск эмбрионов в чашке и определение их стадии развития, а также их целостности, провести при помощи бинокля на увеличении 32х.

Подходящие для дальнейших манипуляций эмбрионы в капилляре под ламинарным потоком воздуха перенести в чистую чашку в каплю стерильной среды M2. Повторить эту процедуру еще 2 раза. Выделенные эмбрионы следует поместить в CO₂-инкубатор при 37 °С.

9.Обработка и оформление результатов измерений

Не производится.

10. Требования безопасности, охраны окружающей среды

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования, изложенные в технической документации к приборам.

11. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки.