

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

УДК 547.96; 577.11

№ госрегистрации 115011660024

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФАВ РАН,
член-корреспондент РАН,
 С.О.Бачурин



«25» июня 2015 г.

**«МЕТОДИКА ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ РАННИХ ЭМБРИОНОВ
САМКАМ-РЕЦИПИЕНТАМ ПОСЛЕ СОЗДАНИЯ НЕОБХОДИМОГО
ГОРМОНАЛЬНОГО ФОНА»**

СТП-14.621.21.0008.03-2015

Ответственный исполнитель
Заведующий лабораторией,
к.б.н.



С.Г. Ключков

«25» июня 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАИМЕНОВАНИЕ МЕТОДИКИ ИЗМЕРЕНИЙ.....	4
2. НАЗНАЧЕНИЕ МЕТОДИКИ ИЗМЕРЕНИЙ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	4
3. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
4. ПОГРЕШНОСТЬ ИЗМЕРЕНИЙ.....	4
5. ТРЕБОВАНИЯ К ПОКАЗАТЕЛЯМ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ	5
6. УСЛОВИЯ ИЗМЕРЕНИЙ	5
7. ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМ УСТРОЙСТВАМ, МАТЕРИАЛАМ, РЕАКТИВАМ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДИКИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ РАННИХ ЭМБРИОНОВ САМКАМ-РЕЦИПИЕНТАМ ПОСЛЕ СОЗДАНИЯ НЕОБХОДИМОГО ГОРМОНАЛЬНОГО ФОНА.....	5
7.1. Реактивы.....	5
7.2. Материалы	5
7.3. Оборудование	5
8. ОПЕРАЦИИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДИКИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ РАННИХ ЭМБРИОНОВ САМКАМ-РЕЦИПИЕНТАМ ПОСЛЕ СОЗДАНИЯ НЕОБХОДИМОГО ГОРМОНАЛЬНОГО ФОНА	6
8.1 Получение вазэктомированных самцов.....	6
8.2 Получение ложнобеременных самок-реципиентов.....	10
8.3 Реимплантация эмбрионов мыши на стадии ранней бластоцисты ложнобеременным самкам-реципиентам.	10
9. ОБРАБОТКА И ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ.....	13

10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ, ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	13
11. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ	13

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ устанавливает методику «Методика хирургической трансплантации ранних эмбрионов самкам-реципиентам после создания необходимого гормонального фона»

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуру переноса эмбрионов мыши в полость матки самок-реципиентов. 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 при выполнении методики хирургической трансплантации ранних эмбрионов самкам-реципиентам после создания необходимого гормонального фона

7.1. Реактивы

- Авертин (SigmaAldrich, Германия)
- Среда M2 medium(SigmaAldrich, Германия)
- Этиловый спирт75%

7.2. Материалы

- Чашки для клеточных культур 35x10 мм, стерильные (Corning,США)
- Капиллярыиз 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.
- Спиртовая горелка.

8. Операции при выполнении методики хирургической трансплантации ранних эмбрионов самкам-реципиентам после создания необходимого гормонального фона

8.1 Получение вазэктомированных самцов

Для проведения операции необходимо отобрать самцов возрасте 1-2 месяца. Провести глубокую анестезию путем введения раствора авертина в дозе 0,5 мг/г веса внутривенно. Дальнейшие манипуляции следует продолжать только после того, как животное окажется в состоянии глубокого наркоза. С вентральной стороны животное обработать салфеткой, смоченной 75% этиловым спиртом. На 5 мм выше основания полового члена при помощи хирургических ножниц сделать горизонтальный надрез кожных покровов длиной около 1 см, затем соответствующий ему надрез брюшной стенки (Рисунок 1). Используя пинцет с тупым наконечником, поднять край брюшной стенки ближайший к каудальному концу тела, таким образом, обеспечивая обзор брюшной полости (Рисунок 2).



Рисунок 1

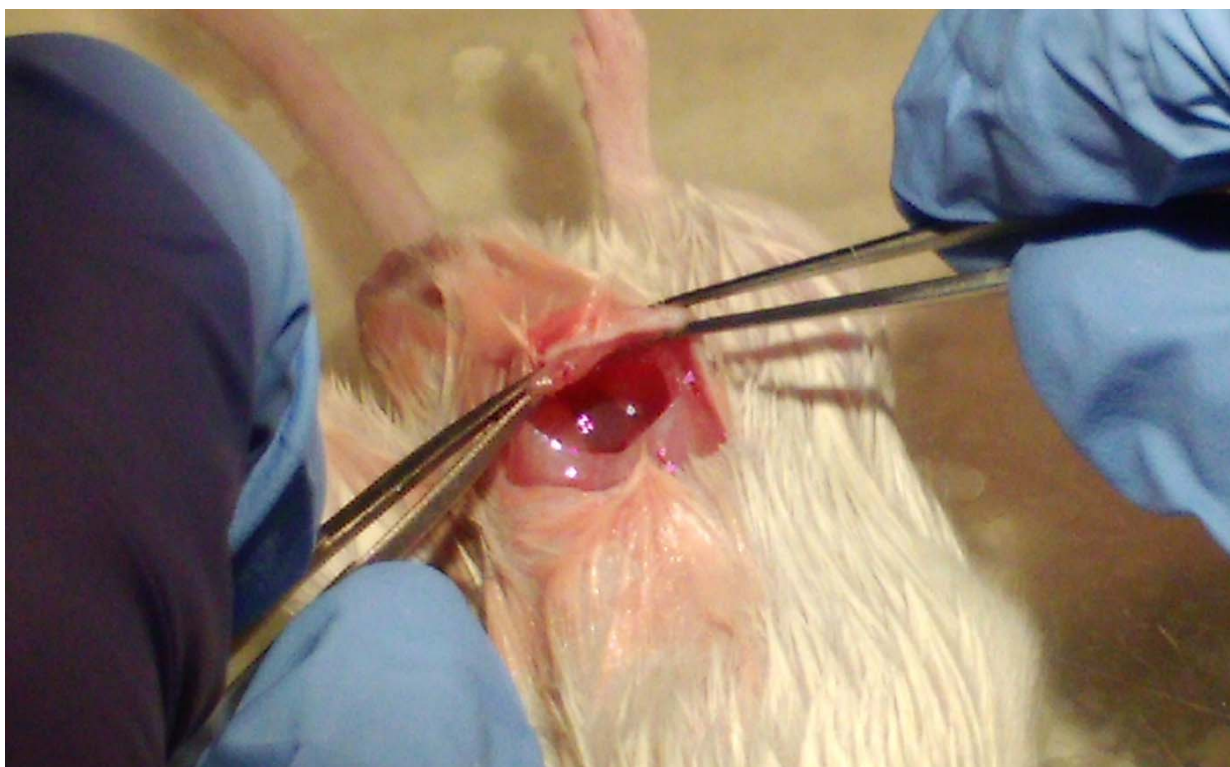


Рисунок 2

При выполнении последующих манипуляций хирургические инструменты не должны касаться семенников, мочевого пузыря и кишечника. Осторожно потянуть правый семенник за ассоциированную с ним жировую ткань, потянуть его к краю хирургической раны и осторожно развернуть так, чтобы увидеть семенной канатик (бледно-розовый каналец около 2мм толщиной, Рисунок 3).

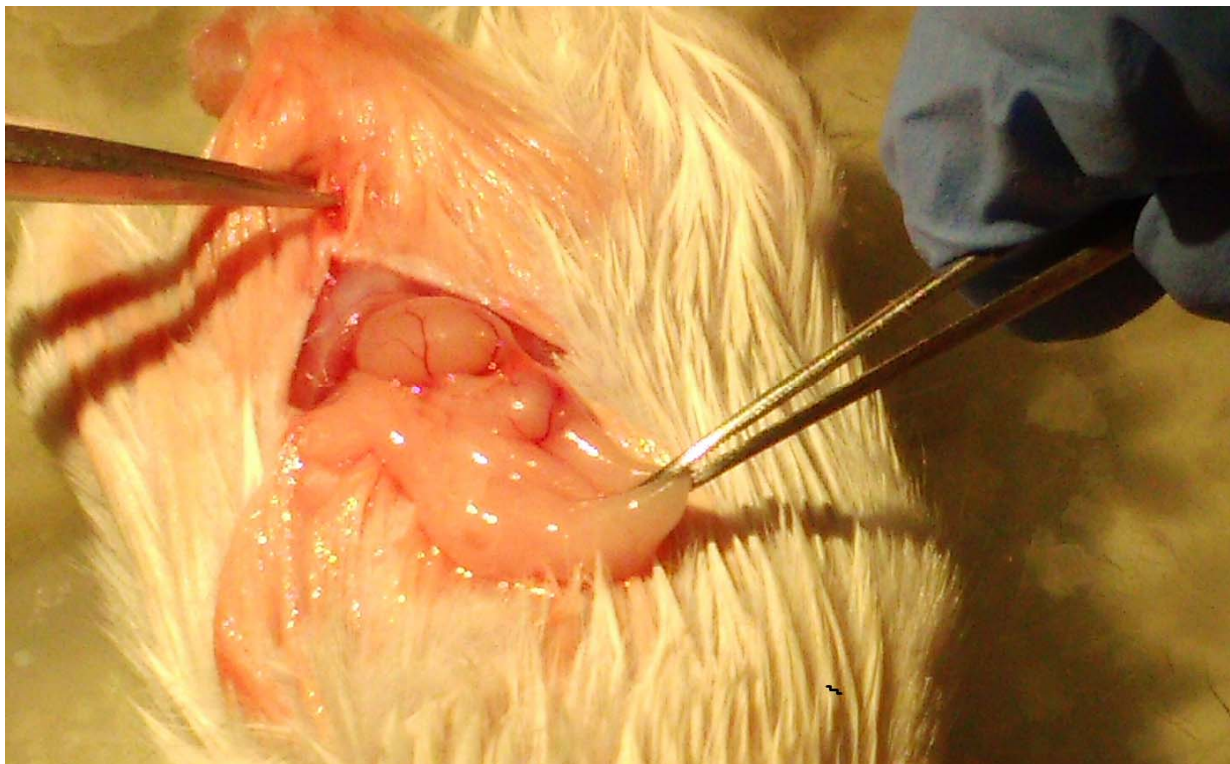


Рисунок 3

Зафиксировать семенной канатик, сформировав петлю при помощи пинцета (Рисунок 4). Над пламенем спиртовой горелки накаливать наконечник пинцета, после этого, прижечь края петли и удалить ее (Рисунок 5).

Аккуратно переместить правый семенник в свое первоначальное положение, и повторить вышеописанные процедуры для левого семенника. Далее следует наложить хирургические швы, последовательно на стенку брюшной полости и кожные покровы. До выхода из состояния наркоза мышью необходимо держать в тепле. Период послеоперационного восстановления в среднем составляет 10-20 дней.



Рисунок 4



Рисунок 5

8.2 Получение ложнобеременных самок-реципиентов

Ложно-беременных самок получают путем бридинга с вазэктомированными самцами (пункт 8.1 данной методики). В день обнаружения вагинального плага у самок доноров необходимо в 17.00 переместить в клетку к вазэктомированному самцу 4-5 самок, оставив их в одной клетке на ночь. На следующий день в 9.00 отобрать самок, которые имеют вагинальный плаг (рис 6). Такие самки являются ложно беременными, и будут использованы в качестве реципиентов при эмбриотрансфере.

8.3 Реимплантация эмбрионов мыши на стадии ранней бластоцисты ложнобеременным самкам-реципиентам.

Эмбрионы, готовые к реимплантации, должны быть размещены в капле стерильной среды M2. Следует набрать эмбрионы так, чтобы немного выше их уровня в капилляре оказались 2 пузырька воздуха для контроля движения жидкости.

Ложнобеременной самке-реципиенту на 2,5 день после обнаружения плага провести глубокую анестезию, путем введения раствора авертина в дозе 0,3 мг/г веса внутривентриально. С дорсальной стороны анестезированной самки выбрать широкий участок, на котором необходимо удалить шерсть и провести очистку 70% этиловым спиртом. На уровне 1 см выше пояса нижних конечностей перпендикулярно медиальной оси тела произвести надрез длиной 1 см. (Рисунок 7). Под слоем мышц видна жировая ткань, ассоциированная с яичником. Аккуратно разрезав мышцы, при помощи пинцета раздвинуть края раны. За жировую ткань вытянуть наружу яичник, яйцевод и дистальный конец рога матки (Рисунок 8).



Рисунок 6



Рисунок 7



Рисунок 8



Рисунок 9

Зафиксировав рог матки за жировую ткань, совершить прокол его стенки при помощи иглы. Ввести в полученное отверстие капилляр и медленно выдуть эмбрионы в полость матки (Рисунок 9). При этом важно следить за продвижением пузырьков воздуха в капилляре, чрезмерное усилие может привести к попаданию эмбрионов в нижележащие отделы половой системы.

Пинцетом с тупым наконечником заправить рог матки, яйцевод и яичник обратно в брюшную полость. Затем последовательно зашить мускулатуру и кожные покровы. Необходимо держать мышь в тепле до полного ее выхода из состояния наркоза.

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.