

**ФИБХ РАН  
НПП «ПИТОМНИК  
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»**

**СТРАНИЦА:** 1/5**КОД:** 03А; 03Б; 03Г; 09**ТИП ДОКУМЕНТА:** СОП № 1Р

**НАЗВАНИЕ:** Отбор и подготовка генетического материала  
для криосохранения

**ЦЕЛЬ:** Определение жесткого регламента отбора самок лабораторных мышей и хомяков с целью получения от них ооцитов/эмбрионов для проведения процедуры криосохранения

**ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:** Ответственность за проведение данной процедуры в соответствии с требованиями данной СОП лежит на технологе.

**ПРЕДПИСАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ:**  
**СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЖИВОТНЫМИ**

**СОСТАВИЛ:****ПРОВЕРИЛ:****УТВЕРДИЛ:**

Подпись:

Подпись:

Подпись:

Дата:

Дата:

Дата:

Место печати:

Место печати:

Место печати:

Место печати:

Место печати:

**ФИБХ РАН  
НПП «ПИТОМНИК  
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»**

**СТРАНИЦА: 2/5**

**КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09**

**ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 1Р**

## 1. Охват

Данная инструкция предназначена для ветеринарного врача, научного персонала и персонала по уходу за животными.

## 2. Ссылки

- 2.1. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NRC Press, 2011.
- 2.2. Handbook of laboratory animal science, 2003, CRC Press, Inc.
- 2.3. Институтская Программа по содержанию и использованию животных (Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН).
- 2.4. СО ПЛЖ 18-17 «Правила содержания и разведения лабораторных животных».
- 2.5. СОП № 2Р «Гормональная подготовка реципиентов при проведении криоконсервации генетических ресурсов».
- 2.6. СОП № 4У «Правила разведения лабораторных животных».
- 2.7. СОП № 4В «Клинический осмотр лабораторных мышей, крыс, хомяков».
- 2.8. СОП № 9В «Групповая и индивидуальная идентификация лабораторных животных».

## 3. Оборудование и средства

- 3.1. Идентификационные карточки;
- 3.2. Маркер;
- 3.3. Оборудование и материалы для содержания лабораторных грызунов (клетки, стеллажи, бутылки, подстилка, корм и пр.);
- 3.4. Средства индивидуальной защиты (шапки, маски, перчатки, комбинезоны);
- 3.5. Лабораторные мыши необходимой линии / хомяки.

## 4. Процедуры

### 4.1. Выполнение программы.

4.1.1. Формирование выборки животных для проведения процедуры криосохранения выполняет научный персонал или курирующий ветеринарный врач Питомника.

4.1.2. При проведении процедуры криосохранения эмбрионов/ооцитов используют гормонально стимулированных неполовозрелых самок, согласно СОП № 2Р и половозрелых самцов, согласно СО ПЛЖ 18-12.

4.1.3. Отбор проводят по результатам клинического осмотра, согласно СОП № 4В (выбирают клинически здоровых особей, с хорошим шерстным покровом, без внешних дефектов и повреждений, без признаков нарушения обмена веществ (ожирение, дистрофия и пр.)) и результатам лабораторного контроля состояния здоровья (мониторинг здоровья) мышей и хомяков.

4.1.4. Для проведения одного цикла работ по криосохранению ооцитов/эмбрионов отбирают не менее 10, но не более 20 самок каждого вида животных.

4.1.5. Для криосохранения допускается использовать особей, отсаженных из племенного ядра, не отходящих от общего предка более чем на 3 поколения.

4.1.6. На длительное криосохранение использовать ооциты/эмбрионы от самок-доноров I и II поколения, полученных от племенных животных коллекционного фонда. Генетический материал от III поколения использовать только для контроля условий хранения (контрольное размораживание).

**Важно!** Необходимо вести строгий учет генетического материала. Запрещается смешивать ооциты/эмбрионы, полученные от разных поколений животных.

4.1.7. Для длительного хранения размещают ооцитов/эмбрионов не менее:

- 250 шт для инбредной линии;
- 500 шт для аутбредной линии;

ФИБХ РАН  
НПП «ПИТОМНИК  
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 3/5

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 1Р

- 250 шт для геномодифицированной гомозиготной линии;
  - 300 шт для геномодифицированной гетерозиготной линии.
- 4.1.8. Сначала составляют недельный график проведения работ по криосохранению генетических ресурсов Питомника, согласно Приложению 1. В таблице необходимо указать вид и название линии используемых животных, даты выполнения гормональной стимуляции, проверки копулятивных пробок и вымывания эмбрионов/ооцитов, криоконсервации.
- 4.2. В зависимости от генетического статуса линии (аутбредная, инбредная, геномодифицированная) формирование выборки животных для получения ооцитов/эмбрионов проводят по утвержденной схеме.
- 4.2.1. Формирование выборки аутбредных линий лабораторных животных
- 4.2.1.1. При аутбредном разведении всех животных в племенном ядре разбивают на 6 одинаковых по величине групп, согласно СО ПЛЖ 18-12
- 4.2.1.2. При формировании группы необходимо равномерно отобрать самок-доноров от всех шести групп племенных ядер.
- 4.2.1.3. Для спаривания использовать половозрелых самцов от ядер из шести групп, но отсаженных из других ядер, нежели самки-доноры. Это необходимо для того, чтобы предотвратить близкородственное скрещивание.
- 4.2.1.4. После использования для спаривания самцов выбраковывают.
- 4.2.2. Формирование выборки инбредных линий лабораторных животных
- 4.2.2.1. При инбредном разведении племенное ядро представляет собой группу животных, размножающихся путем моногамного скрещивания родных братьев и сестер.
- 4.2.2.2. При формировании группы необходимо отбирать самок-доноров, полученных от племенных ядер одной сублинии. Одновременно в ядре могут находиться на размножении животные 2-3 сублиний.
- 4.2.2.3. Для спаривания берут самцов-производителей из тех же племенных ядер, откуда были получены самки-доноры.
- 4.2.2.4. После спаривания с самками, самцов возвращают в их исходные племенные ядра.
- Важно!** Не допускается возвращать самца не в «домашнюю» клетку.
- 4.2.3. Формирование выборки геномодифицированных линий лабораторных животных
- 4.2.3.1. Для каждой линии геномодифицированных мышей используют гомозиготное или гетерозиготное скрещивание.
- 4.2.3.2. Гомозиготное скрещивание подразумевает скрещивание гомозиготы на гомозиготу. Достаточно провести генотипирование мышей при закладке ядер. В этом случае используют отсаженных из племенных ядер самок-доноров и племенных самцов, взятых из этих же ядер. Для формирования выборки использовать животных с известным генотипом.
- 4.2.3.3. Гетерозиготное скрещивание (для нокинных и нокаутных мышей) предполагает скрещивание гетерозиготы на гомозиготу или гетерозиготы на гетерозиготу. Выбор животных-доноров должен основываться только на результатах генотипирования, поэтому требуется рутинное генотипирование всех полученных в потомстве мышей.
- 4.6. Содержание самок-доноров до начала процедуры вымывания ооцитов/эмбрионов.
- 4.6.1. Выбранную группу самок для получения ооцитов/эмбрионов размещают в отдельной клетке.
- 4.6.2. На идентификационной карточке маркером написать название линии, количество животных, дату родов, номер родительской клетки, дату инъекции первого гормона. В верхнем правом углу необходимо нанести кодовую маркировку (Z), которая обозначает,

**ФИБХ РАН  
НПП «ПИТОМНИК  
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»**

**СТРАНИЦА: 4/5**

**КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09**

**ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 1Р**

что животные из данной клетки будут использованы при криосохранении генетических ресурсов Питомника.

4.6.3. В течение всего времени нахождения животных в клетке, до момента забора ооцитов/эмбрионов, необходимо добавлять зерновую смесь «VitaCraft» и древесные волокна, а также следить за наличием воды и корма.

## **5. Примечания**

5.1. Генетический мониторинг – долговременное слежение за состоянием популяционных генофондов вида (породы), оценка и прогнозирование их динамики во времени и пространстве, определение пределов допустимых изменений.

5.2. Генетическая изменчивость – изменчивость, обусловленная взаимодействием и различным проявлением генетических факторов. Изменчивость в генетическом составе особей между породами и видами; наследуемая генетическая изменчивость внутри и между популяциями.

5.3. Аутбредная линия животных – такие животные, которые в течение четырёх генераций размножаются в закрытом разведении в определённом количестве и по системе спаривания, позволяющей избежать близкородственного скрещивания. Ротационная система разведения позволяет получать нелинейных животных в большинстве случаев не родственных между собой, нейтрализовать отрицательные последствия фактора изоляции животных в пространстве, неизбежно связанного с клеточным содержанием. Животные в этом случае гетерозиготные.

5.4. Инбредная линия животных – такие животные, которые прошли не менее 20 поколений принудительного братско-сестринского скрещивания. На этой стадии продолжение инбридинга уже не вызывает снижения жизнеспособности, которая сохраняется на некотором константном уровне. Коэффициент инбридинга животных при этом достигает 100%, поэтому животных называют гомозиготными.

5.5. Геномодифицированная линия животных – это животные, генотип которых был искусственно изменён при помощи методов геной инженерии. Генетическая модификация отличается целенаправленным изменением генотипа организма в отличие от случайного, характерного для естественного и искусственного мутационного процесса.

**ФИБХ РАН  
НПП «ПИТОМНИК  
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»**

**СТРАНИЦА: 5/5****КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09****ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 1Р****Приложение 1.** Таблица-график по проведению одного цикла криоконсервации**Быстрое замораживание****2017**

Начало вымывания и осмотр пробок – 09:00

Дата/день Вид Линия	24.08 Чт	25.08 Пт	26.08 Сб	27.08 Вс	28.08 Пн	29.08 Вт	Примечания
мыши <b>ВСНЕ</b> +/- SuperOva	I гормон 10♀	-	II гормон 10♀ ссадка с ♂ 1:1	Пробки	-	Вымывание <b>RF</b>	Получено 30 шт 8-клеточных эмбрионов, хорошего качества

**Принятые сокращения:****RF** – быстрое замораживание**SuperOva** – гормональная стимуляция доноров**I гормон** – гормон сывороточный гонадотропин жеребых кобыл**II гормон** – гормон человеческий хорионический гонадотропин