

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

СТРАНИЦА: 1/6**КОД:** 03А; 03Б; 03Г; 09**ТИП ДОКУМЕНТА:** СОП № 2Р

НАЗВАНИЕ: Гормональная подготовка реципиентов при
проведении криоконсервации генетических ресурсов

ЦЕЛЬ: Установить общую процедуру гормональной обработки самок мышей и хомяков для последующего получения ранних эмбрионов и ооцитов

ОТВЕТСТВЕННОСТЬ: Ответственность за проведение данной процедуры в соответствии с требованиями данной СОП лежит на ветеринарном враче

ПРЕДПИСАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ:
СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЖИВОТНЫМИ.
СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С КОЛЮЩЕ-РЕЖУЩИМИ ИНСТРУМЕНТАМИ

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: 2/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 2Р

1. Охват

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

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. Ch. 15. Common Nonsurgical Techniques and Procedures. C.A. Rekow, V. Baumans.
- 2.3. Laboratory Animal Medicine. J. G. Fox et al, 2nd edition, 2002.
- 2.4. Институтская Программа по содержанию и использованию животных (Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН).
- 2.5. СОП № 1В «Методы фиксации лабораторных мышей, крыс и хомяков».
- 2.6. СОП № 2В «Введение веществ лабораторным животным (мыши, крысы, хомяки)».
- 2.7. СОП № 7В «Эвтаназия мелких лабораторных грызунов в СО₂-боксе Bioscare».

3. Оборудование и средства

- 3.1. Гормон сывороточный гонадотропин жеребых кобыл (ГСЖК), №1, лиофилизированный, 1000 МЕ/уп;
- 3.2. Гормон человеческий хорионический гонадотропин (чХГ), №2, лиофилизированный, 1500 МЕ/уп;
- 3.3. Кожный антисептик «Sterisol»;
- 3.4. Салфетки нетканые;
- 3.5. Шприцы инсулиновые с несъемной иглой.
- 3.6. Пробирки типа Эппендорф, 1,5 мл, стерильные;
- 3.7. Штатив для пробирок типа Эппендорф;
- 3.8. Автоматическая пипетка;
- 3.9. Одноразовые наконечники на 1000 мл, стерильные;
- 3.10. Физиологический раствор;
- 3.11. Контейнер Шарпа;
- 3.12. Маркер;
- 3.13. Шкаф с ламинарным потоком воздуха;
- 3.14. Морозильная камера -20°C;
- 3.15. Средства индивидуальной защиты (шапка, маска, перчатки, халат).

4. Процедуры

4.1. Разведение и фасовка гормональных препаратов

Внимание! Разведение и фасовку гормональных препаратов проводить в продезинфицированном шкафу с ламинарным потоком воздуха с использованием средств индивидуальной защиты.

4.1.1. Взять ампулу с лиофилизированным ГСЖК, 1000 МЕ/уп и добавить 20 мл физиологического раствора. Тщательно перемешать с помощью автоматической пипетки. Не допускать образования пузырей в растворе.

4.1.2. Взять 20 пробирок и на каждой, с помощью маркера, сделать пометку «№1».

4.1.3. С помощью автоматической пипетки в каждую пробирку перенести по 1 мл разведенного гормона ГСЖК (50 МЕ/мл). Плотно закрыть крышку пробирки.

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 3/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 2Р

4.1.4. Взять ампулу с лиофилизированным чХГ, 1500 МЕ/уп и добавить 20 мл физиологического раствора. Тщательно перемешать с помощью автоматической пипетки. Не допускать образования пузырей в растворе.

4.1.5. Взять 20 пробирок и на каждой, с помощью маркера, сделать пометку «№2».

4.1.6. С помощью автоматической пипетки в каждую пробирку перенести по 1 мл разведенного гормона чХГ (75 МЕ/мл). Плотно закрыть крышку пробирки.

4.1.7. Все пробирки составить в штатив и поместить в морозильную камеру. Гормон можно хранить не более 6 месяцев при температуре – 20°C.

4.1.8. Дозировка гормонов для разных видов грызунов указана в Приложении 1.

4.2. Подготовка мышей-доноров для получения ранних эмбрионов

4.2.1. Для суперовуляции использовать 2 вида гормонов: сывороточный гонадотропин жеребых кобыл (№1) и человеческий хорионический гонадотропин (№2).

4.2.2. Взять неполовозрелых самок мышей в возрасте 4-5 недель.

4.2.3. Достать из морозильной камеры необходимое количество пробирок с ГСЖК №1.

Важно! Содержимого одной пробирки достаточно для гормональной обработки 10 мышей.

Важно! Время введения первого гормона должно быть в интервале между 15:00 и 19:00.

4.2.4. Дождаться полного размораживания содержимого пробирки и с помощью инсулинового шприца осторожно перемешать раствор гормона.

4.2.5. Инъекцию гормона №1 проводят внутривентриально в количестве 100 мкл (5 МЕ/гол), согласно СОП № 2В.

4.2.6. Зафиксировать мышь согласно СОП № 1В, обработать область введения нетканой салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.7. Аккуратно ввести 100 мкл раствора гормона внутривентриально. Обработать место инъекции салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.8. Повторить процедуры 4.2.6 – 4.2.7. для необходимого числа мышей.

Важно! Инъекцию второго гормона чХГ выполняют спустя 45-50 часов после инъекции первого гормона ГСЖК.

4.2.9. Достать из морозильной камеры необходимое количество пробирок с чХГ №2.

Важно! Содержимого одной пробирки достаточно для гормональной обработки 10 мышей.

4.2.10. Дождаться полного размораживания содержимого пробирки и с помощью инсулинового шприца осторожно перемешать раствор гормона.

4.2.11. Инъекцию гормона №2 проводят внутривентриально в количестве 100 мкл (7,5 МЕ/гол), согласно СОП № 2В.

4.2.12. Зафиксировать мышь согласно СОП № 1В, обработать область введения нетканой салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.13. Аккуратно ввести 100 мкл раствора гормона внутривентриально. Обработать место инъекции салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.14. Повторить процедуры 4.2.6 – 4.2.7. для необходимого числа мышей.

4.2.15. После введения второго гормона чХГ, самок спаривать с половозрелыми самцами для спаривания в соотношении 1:1.

4.2.16. На следующее утро (в период с 9:00 до 11:00) у самок, с помощью одноразового пластикового наконечника, проверить наличие копулятивной пробки – подтверждающего факта произошедшего спаривания и наступившей беременности.

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 4/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 2Р

4.2.17. Самок с копулятивными пробками отсадить в отдельную клетку. На идентификационной карточке указать линию, количество мышей, возраст, дату обнаружения копулятивной пробки, дату вымывания эмбрионов.

Важно! 8-клеточные эмбрионы вымывают из репродуктивных органов беременных мышей спустя 72 часа после обнаружения копулятивной пробки.

4.2.18. Самок без копулятивной пробки подвергают эвтаназии, согласно СОП № 7В.

4.3. Подготовка хомяков-доноров для получения ооцитов

4.3.1. Для суперовуляции использовать 2 вида гормонов: сывороточный гонадотропин жеребых кобыл (№1) и человеческий хорионический гонадотропин (№2).

4.3.2. Взять неполовозрелых самок хомяков в возрасте 4-6 недель.

4.2.3. Достать из морозильной камеры необходимое количество пробирок с ГСЖК №1.

Важно! Содержимого одной пробирки достаточно для гормональной обработки 2 хомяков.

Важно! Время введения первого гормона должно быть в интервале между 05:00 и 08:00.

4.2.4. Дождаться полного размораживания содержимого пробирки и, с помощью инсулинового шприца, осторожно перемешать раствор гормона.

4.2.5. Инъекцию гормона №1 проводят внутрибрюшинно в количестве 500 мкл (25 МЕ/гол), согласно СОП № 2В.

4.2.6. Зафиксировать хомяка согласно СОП № 1В, обработать область введения нетканой салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.7. Аккуратно ввести 500 мкл раствора гормона внутрибрюшинно. Обработать место инъекции салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.8. Повторить процедуры 4.2.6 – 4.2.7. для необходимого числа мышей.

Важно! Инъекцию второго гормона чХГ выполняют спустя 60 часов после инъекции первого гормона ГСЖК.

4.2.9. Достать из морозильной камеры необходимое количество пробирок с чХГ №2.

Важно! Содержимого одной пробирки достаточно для гормональной обработки 2 хомяков.

4.2.10. Дождаться полного размораживания содержимого пробирки и, с помощью инсулинового шприца, осторожно перемешать раствор гормона.

4.2.11. Инъекцию гормона №2 проводят внутрибрюшинно в количестве 500 мкл (37,5 МЕ/гол), согласно СОП № 2В.

4.2.12. Зафиксировать хомяка согласно СОП № 1В, обработать область введения нетканой салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.13. Аккуратно ввести 500 мкл раствора гормона внутрибрюшинно. Обработать место инъекции салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.14. Повторить процедуры 4.2.6 – 4.2.7. для необходимого числа хомяков.

Важно! Ооциты вымывают из репродуктивных органов хомяков спустя 16 часов после инъекции второго гормона.

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

СТРАНИЦА: 5/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 2Р

5. Примечания

5.1. Не допускается при разведении и фасовке разных гормонов использовать один и тот же носик для автоматической пипетки.

5.2. При перемешивании раствора гормонов не допускать образования пузырей и вспенивания.

5.3. Вскрытые ампулы от гормонов и использованные иглы от шприцев необходимо собирать в контейнер Шарпа.

5.4. Необходимо строго соблюдать временные интервалы введения гормональных препаратов.

5.5. После размораживания неиспользованный объем гормонов необходимо выбросить. Повторное замораживание и использование запрещается!

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

СТРАНИЦА: 6/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 2Р

Приложение 1. Таблица дозировки гормональных препаратов

Вид животного	ГСЖК, №1 МЕ / гол	чХГ, №2 МЕ / гол
мышь	5	7,5
хомяк	25	37,5