

ФИБХ РАН  
НПП «ПИТОМНИК  
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 1/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 3Р

**НАЗВАНИЕ:** Вымывание ооцитов/ранних эмбрионов при проведении криоконсервации генетических ресурсов

**ЦЕЛЬ:** Установить общую процедуру вымывания ооцитов/эмбрионов из репродуктивных путей самок мышей и хомяков для проведения процедуры криоконсервации

**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 № 3Р

## 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
- 2.3. Techniques and Procedures. C.A. Pekow, V. Baumans.
- 2.4. Laboratory Animal Medicine. J. G. Fox et al, 2nd edition, 2002.
- 2.5. Институтская Программа по содержанию и использованию животных (Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН).
- 2.6. «Collection and cryopreservation of hamster oocytes and mouse embryos» Nuno Costa-Borges, Sheyla González, Elena Ibáñez, Josep Santaló, Journal of Visualized Experiments (25), e1120, doi:10.3791/1120 (2009).
- 2.7. СОП № 2Р «Гормональная подготовка реципиентов при проведении криоконсервации генетических ресурсов».
- 2.8. СОП №2Х «Общие принципы хирургии лабораторных грызунов».
- 2.9. СОП № 3Х «Эвтаназия мелких лабораторных грызунов с использованием двуокси углерода (СО<sub>2</sub>)».
- 2.10. СОП № 7В «Эвтаназия мелких лабораторных грызунов в СО<sub>2</sub>-боксе Bioscаре».

## 3. Оборудование и средства

- 3.1. Биноклярная лупа (Olympus);
- 3.2. Автоматический СО<sub>2</sub> инкубатор (NU-5510 E, Nuairе);
- 3.3. Настольный сухожаровой стерилизатор инструментов;
- 3.4. Микропипетка-стриппер (Stripper MXL3-STR, MidAtlantic Diagnostics);
- 3.5. Автоматическая пипетка (ER-1000, Eppendorph);
- 3.6. Одноразовые пластиковые носики 1000 мкл;
- 3.7. Одноразовые пластиковые капилляры для микропипетки-стриппер, Ø 200 мкм;
- 3.8. Ножницы остроконечные прямые (ПТО Медтехника);
- 3.9. Ножницы глазные остроконечные вертикально изогнутые (ПТО Медтехника);
- 3.10. Ножницы роговичные по Кастровъехо (ПТО Медтехника);
- 3.11. Пинцет хирургический общего назначения (ПТО Медтехника);
- 3.12. Пинцет глазной прямой (ПТО Медтехника);
- 3.13. Пинцет большой анатомический 250 мм;
- 3.14. Шприц инсулиновый с несъемной иглой G29;
- 3.15. Шприц инсулиновый со съемной иглой G 27;
- 3.16. Чашка Петри 100 мм (ПанЭко);
- 3.17. Чашка Петри 60 мм (ПанЭко);
- 3.18. 4-луночная чашка (Nunc);
- 3.19. Среда культуральная M2 (Sigma);
- 3.20. Среда культуральная M16 (Sigma);
- 3.21. Фосфатно-солевой буфер модифицированный (Sigma);
- 3.22. 0,1% раствор трипсина;
- 3.23. Дезинфицирующие салфетки «Лизаксин»;
- 3.24. Дезинфицирующее средство «Лизоформин 3000»;
- 3.25. Бумажные салфетки стерильные;
- 3.26. Драпировочная пленка Op-Site;
- 3.27. 6% раствор перекиси водорода.

ФИБХ РАН  
НПП «ПИТОМНИК  
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 3/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 3Р

#### 4. Процедуры

##### 4.1. Вымывание ранних доимплантационных эмбрионов мышей

4.1.1. Для вымывания ранних эмбрионов использовать гормонально подготовленных беременных самок мышей согласно СОП № 2Р.

4.1.2. На 3-й день беременности (8-клеточная стадия развития эмбриона) провести эвтаназию самок методом цервикальной дислокации согласно п. 4.2. СОП № 3Х.

**Внимание!** Единовременно допускается проводить эвтаназию не более 4 самок!

4.1.3. Труп животного погрузить в 0,25% раствор дезинфектанта «Лизоформин 3000» для полного смачивания шерстного покрова.

4.1.4. Далее с помощью большого анатомического пинцета достать труп из дезраствора и обтереть бумажными салфетками.

4.1.5. Разместить труп животного в спинном положении на операционном столе согласно СОП №2Х. Остроконечными прямыми ножницами сделать кожный разрез в центральной части передней брюшной стенки и с помощью 2-х хирургических пинцетов снять кожу таким образом, чтобы полностью обнажить мышцы брюшины.

4.1.6. Задрапировать брюшную стенку с помощью самоклеющегося нетканого стерильного материала Op-Site и, придерживая мышцы анатомическим пинцетом, вскрыть брюшную полость остроконечными глазными ножницами.

4.1.7. Обратной стороной хирургического пинцета из брюшной полости отодвинуть петли кишечника (осторожно, чтобы не повредить его) для хорошего доступа к матке и яйцеводам.

4.1.8. Роговичными ножницами отсечь каждый яйцевод с 1/3 верхней части рога матки.

4.1.9. Отрезать в области перехода яичника в яйцевод и в середине рога матки, после чего пинцетом перенести матку с яйцеводом в чашку Петри (60 мм, для накопления) с фосфатно-солевым буфером для предотвращения высыхания тканей.

4.1.10. Использованные инструменты обработать согласно п. 4.2.2. СОП 2Х.

4.1.11. Повторить пункты 4.1.3. – 4.1.10 для необходимого количества мышей.

4.1.12. Далее, по очереди перенести каждый яйцевод с участком рога матки в большую чашку Петри (100 мм) под контролем бинокулярной лупы (увеличение х30).

4.1.13. В инсулиновый шприц с иглой (29G) набрать 0,5 мл фосфатно-солевого буфера комнатной температуры.

4.1.14. Иглу шприца вставить в просвет яйцевода и осторожно выполнить вымывание эмбрионов, при этом необходимо плотно прижимать прямым глазным пинцетом яйцевод к игле, во избежание его соскальзывания с иглы.

4.1.15. Повторить пункты 4.1.12.-4.1.14. для нужного количества яйцеводов.

4.1.16. Под контролем бинокулярной лупы (увеличение х60) с помощью микропипетки «Stripper» (наконечник с диаметром 200мкм) собрать только нормальные 8-клеточные эмбрионы и перенести их в 4-луночную чашку, заполненную средой M2, где они находятся до начала процедуры замораживания.

**Важно!** При сборе эмбрионов необходимо уделять пристальное внимание их морфологии: качественные 8-клеточные эмбрионы должны иметь четкие границы бластомеров, быть прозрачными, без следов разрушения и посторонних вкраплений. В противном случае, эмбрионы не использовать для процедуры криосохранения.

ФИБХ РАН  
НПП «ПИТОМНИК  
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 4/6

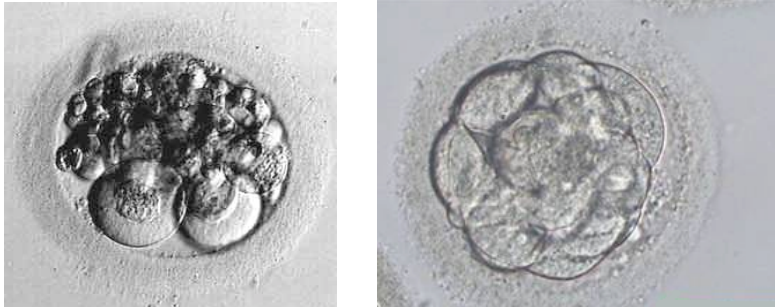
КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 3Р

**Пример качественных 8-клеточных эмбрионов мыши**



**Пример некачественных 8-клеточных эмбрионов мыши (нарушение процесса деления-дробления, разрушение отдельных бластомеров эмбриона)**



4.1.17. После завершения процедуры вымывания необходимо провести контрольное культивирование эмбрионов, чтобы убедиться в правильности проведения процедуры и сохранении эмбрионами жизнеспособности.

4.1.18. Для этого необходимо случайным образом, из общего числа полученных эмбрионов, отобрать 10% 8-клеточных эмбрионов и перенести их в 4-луночный планшет со средой M16.

4.1.19. Планшет убрать в инкубатор на 37°C, при 5% CO<sub>2</sub>, на 48 часов.

4.1.20. Спустя указанное время провести оценку развития: все эмбрионы должны достигнуть стадии бластоцисты – последней стадии доимплантационного развития (см. рисунок).

**Морфология эмбрионов мыши на стадии бластоцисты  
нормальные бластоцисты (средняя, поздняя, выклюнувшаяся)**



**Важно!** В случае, если не все эмбрионы достигли конечной стадии развития, или вовсе произошла остановка развития, необходимо сделать пометку «Нарушение развития при культивировании» в «Таблице размещения криопаеток с эмбрионами в криохранилище BioCape 73» напротив соответствующих паёток с эмбрионами из данной партии (СОП № 4Р).

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

**СТРАНИЦА: 5/6**

**КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09**

**ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 3Р**

#### **4.2. Вымывание ооцитов хомяков**

4.2.1. Для вымывания ооцитов использовать гормонально синхронизированных самок хомяков согласно СОП № 2Р.

4.2.2. Ооциты вымывают из репродуктивных органов хомяков спустя 16 часов после инъекции второго гормона (ооциты на стадии метафазы II).

4.2.3. Провести эвтаназию самок согласно СОП № 3Х «Эвтаназия мелких лабораторных грызунов с использованием двуокиси углерода (СО<sub>2</sub>)».

**Внимание!** Единовременно допускается эвтаназировать не более 3 самок!

4.2.4. Труп животного погрузить в водный 0,25% раствор дезинфектанта «Лизоформин 3000» для полного смачивания шерстного покрова.

4.2.5. Далее, с помощью большого анатомического пинцета достать труп из дезраствора и обтереть бумажными салфетками.

4.2.6. Разместить труп животного в спинном положении на операционном столе, согласно СОП №2Х. Остроконечными прямыми ножницами сделать кожный разрез в центральной части передней брюшной стенки и с помощью 2-х хирургических пинцетов снять кожу таким образом, чтобы полностью обнажить мышцы брюшины.

4.2.7. Задрапировать брюшную стенку с помощью самоклеющегося нетканого стерильного материала Op-Site и, придерживая мышцы анатомическим пинцетом, вскрыть брюшную полость остроконечными глазными ножницами.

4.2.8. Обратной стороной хирургического пинцета из брюшной полости отодвинуть петли кишечника (осторожно, чтобы не повредить его) для хорошего доступа к яйцеводам.

4.2.9. Роговичными ножницами отсечь каждый яйцевод.

4.2.10. Отрезать в области перехода яичника в яйцевод и в области перехода в рог матки, после чего пинцетом перенести яйцевод в чашку Петри (60 мм, для накопления) с фосфатно-солевым буфером для предотвращения высыхания тканей.

4.2.11. Повторить пункты 4.2.4. – 4.2.10 для необходимого количества хомяков.

4.2.12. После по очереди перенести каждый яйцевод в большую чашку Петри (100 мм) под контролем бинокулярной лупы (увеличение x30).

4.2.13. В инсулиновый шприц с иглой (27G ½) набрать 0,5 мл фосфатно-солевого буфера комнатной температуры.

4.2.14. Иглу шприца вставить в просвет яйцевода и осторожно выполнить вымывание эмбрионов, при этом необходимо плотно прижимать прямым глазным пинцетом яйцевод к игле, во избежание его соскальзывания с иглы.

4.2.15. Повторить пункты 4.2.12.-4.1.14. для нужного количества яйцеводов.

4.2.16. Далее, ооцитно-кумуляные комплексы необходимо на 5 минут перенести в 0,1% раствор трипсина для освобождения ооцитов.

4.2.17. Под контролем бинокулярной лупы (увеличение x60) с помощью микропипетки «Stripper» (наконечник с диаметром 200мкм) собрать только нормальные ооциты.

4.2.18. Ооциты дважды отмыть в фосфатно-солевом буфере и перенести в 4-луночную чашку, заполненную средой M2, где они находятся до начала процедуры замораживания.

**Важно!** При сборе ооцитов необходимо уделять пристальное внимание их морфологии: качественные ооциты на стадии метафазы II должны иметь четкие границы, быть прозрачными, без следов разрушения и посторонних вкраплений, с хорошо визуализированным полярным тельцем. В противном случае, ооциты не использовать для процедуры криосохранения.

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

**СТРАНИЦА: 6/6**

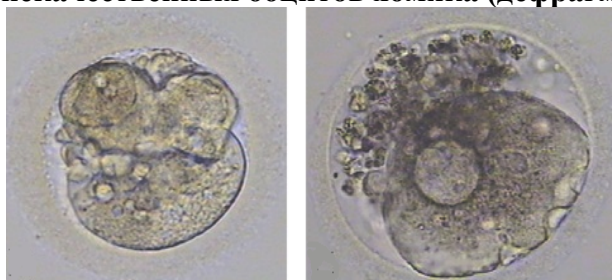
**КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09**

**ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 3Р**

**Пример качественных ооцитов на стадии метафазы II**



**Пример некачественных ооцитов хомяка (дефрагментация)**



**5. Примечания**

- 5.1. Использованные иглы от шприцев необходимо собирать в контейнер Шарпа.
- 5.2. Для замораживания использовать ооциты/эмбрионы высокого качества по результатам морфологической оценки.
- 5.3. Все используемые при вымывании культуральные среды и растворы должны быть комнатной температуры.