

Procédure Normalisée de Fonctionnement

TITRE : PRÉPARATION DES SOLUTIONS POUR LA MICRO-INJECTION	NUMÉRO : MI-1
DESTINATAIRES : Équipe de micro-injection	VERSION 1 : 29.09.2014 VERSION 5 : 27.11.2019
ÉMISE PAR : Normand Lapierre, T.S.A. CORRIGÉE : Manon St-Germain, vétérinaire et directrice	CIPA : 20.01.2020
APPROUVÉE PAR : Manon St-Germain, vétérinaire et directrice	DATE : 01.10.2014
BUTS : Expliquer la préparation des différentes solutions nécessaires au déroulement de la micro-injection.	

MATÉRIEL :

- Saline 0.9% et PBS
- Seringues 1ml, 3ml, 10ml, 20ml + aiguilles 25G
- Tubes Eppendorf®
- Tubes à culture cellulaire stériles 50ml
- Huile minérale pour manipulation d'embryons (sigma #M8410-1L)
- Eau pour transfert d'embryons (sigma #W1503-500ml)
- PMSG (Cedarlane #HOR-272)
- hCG (sigma #CG10-1VL, fiole 10 000 UI)
- Hyaluronidase (sigma #H3884-100MG, fiole 100 mg)
- Embryomax® advanced KSOM (sigma #MR-101-D)
- Marqueur permanent fin
- Support à congélation
- Pipette à répétition et embout 5ml/100µl
- Pipettes P1000, P100, P10 + embouts

SANTÉ ET SÉCURITÉ : Les F.D.S. des produits utilisés sont disponibles en [version électronique](#) et papier dans le SB-M472.

PROCÉDURES :

A. PMSG :

La PMSG ou Pregnant Mare Serum Gonadotropin se présente sous forme lyophilisée et doit être dissoute pour être utilisée. La poudre et les aliquotes doivent être conservées à -20°C. Durant la préparation des aliquotes conserver le stock initial et les aliquotes sur glace. Chaque aliquote permet l'injection de 5 souris. Voir la **P.N.F. MI-3. RÉCOLTE ET PRÉPARATION D'EMBRYONS DE SOURIS POUR MICRO-INJECTION** pour les détails concernant l'injection des souris.

1. Commander chez Cedarlane une fiole de 1 000 UI de PMSG, code HOR-272.
2. Identifier 20 tubes Eppendorf® comme suit avec un marqueur permanent fin: PMSG, 50 UI/ml, date.
3. Avec une seringue 1ml, diluer avec 1 ml de saline la PMSG.
4. Bien mélanger en évitant la formation de bulles.
5. Récupérer le mélange de la fiole avec la même seringue et le transférer dans un tube à culture cellulaire de 50ml.

6. Répéter à nouveau les étapes 3 à 5 puis passer à l'étape 7.
7. Compléter la dissolution en ajoutant 18ml de saline dans le tube de 50ml, pour un volume final de 20ml.
8. Faire des aliquotes de 550µl dans les tubes Eppendorf® préalablement identifiés.
9. Congeler les aliquotes à -20°C pour une période ne dépassant pas 6 mois. Jeter une fois la date d'expiration dépassée.
10. Décongeler les aliquotes nécessaires pour la super ovulation.

B. hCG :

La hCG ou Human Chorionic Gonadotropin se présente sous forme lyophilisée et doit être dissoute pour être utilisée. La poudre se conserve à 4°C et les aliquotes doivent être conservées à -20°C. Garder la fiole hCG diluée ainsi que les aliquotes qui sont préparées sur la glace. Chaque aliquote permet l'injection de 10 souris. Voir la **P.N.F. MI-3. RÉCOLTE ET PRÉPARATION D'EMBRYONS DE SOURIS POUR MICRO-INJECTION** pour les détails concernant l'injection des souris.

1. Commander chez Sigma une fiole de 10 000 UI de hCG, code CG10-1VL.
2. Identifier 200 tubes Eppendorf® comme suit avec un marqueur permanent fin: hCG, 500 UI/ml, date.
3. Avec une seringue 3ml, diluer avec 3ml de saline la hCG.
4. Bien mélanger en évitant la formation de bulles.
5. Récupérer le mélange de la fiole avec la même seringue et le transférer dans un tube à culture cellulaire de 50ml.
6. Répéter les étapes 3 à 5 une seconde fois puis passer à l'étape 7.
7. Compléter la dissolution en ajoutant 14ml de saline dans le tube de 50ml, pour un volume final de 20ml.
8. Utiliser une pipette à répétition ou une pipette P1000 pour faire des aliquotes de 100µl dans les tubes Eppendorf® préalablement identifiés.
9. Congeler les aliquotes à -20°C pour une période ne dépassant pas 6 mois. Jeter une fois la date d'expiration dépassée.
10. Décongeler les aliquotes nécessaires pour la super ovulation.
11. Reconstituer chaque aliquotes avec 900µl de saline 0.9%.

C. Hyaluronidase :

La hyaluronidase se présente sous forme lyophilisée et doit être dissoute afin d'être utilisée. La poudre et les aliquotes doivent être conservées à -20°C. Voir la **P.N.F. MI-3. RÉCOLTE ET PRÉPARATION D'EMBRYONS DE SOURIS POUR MICRO-INJECTION** pour les détails concernant l'utilisation de la hyaluronidase.

1. Identifier 300 tubes Eppendorf® comme suit avec un marqueur permanent fin: HCG, 3mg/ml, date.
2. Avec une seringue 3ml, reconstituer la hyaluronidase avec 3ml de saline 0.9%.

3. Bien mélanger en évitant la formation de bulles.
4. Récupérer le mélange de la fiole avec la même seringue et le transférer dans un tube à culture cellulaire de 50ml.
5. Répéter les étapes 2 à 4 une seconde fois puis passer à l'étape 6.
6. Compléter la dissolution en ajoutant 27ml de saline dans le tube de 50ml, pour un volume final de 33ml.
7. Utiliser une pipette à répétition pour faire des aliquotes de 100µl dans les tubes Eppendorf® préalablement identifiés.
8. Congeler les aliquotes à -20°C pour une période ne dépassant pas 6 mois. Jeter une fois la date d'expiration dépassée.
9. Décongeler les aliquotes nécessaires pour la récolte d'embryons.
10. Reconstituer avec 900µl de d'Embryomax®.

D. Huile minérale pour manipulation d'embryons :

1. Distribuer l'huile dans des tubes stériles de 50ml.
2. Identifier les tubes avec le lot de l'huile et la date.
3. Conserver les tubes à l'abri de la lumière.
4. Voir la **P.N.F. MI-3. RÉCOLTE ET PRÉPARATION D'EMBRYONS DE SOURIS POUR MICRO-INJECTION** pour l'utilisation de l'huile.

E. Milieu Embryomax® advanced KSOM

Le milieu Embryomax® advanced KSOM se présente sous forme liquide. Il doit être conservé à -20°C. Durant la préparation des aliquotes conserver le stock initial et les aliquotes sur glace. Voir la **P.N.F. MI-3. RÉCOLTE ET PRÉPARATION D'EMBRYONS DE SOURIS POUR MICRO-INJECTION** et **MI-4. MICRO-INJECTION D'ADN CHEZ LA SOURIS** pour les détails concernant l'utilisation du KSOM.

1. Allumer et désinfecter la hotte en vaporisant de l'éthanol 70% sur toutes les surfaces intérieures.
2. Sous la hotte, préparer des aliquotes de 1 ml dans des tubes stériles.
3. Identifier les tubes avec la date et le contenu.
4. Congeler les aliquotes à -20°C jusqu'à leur utilisation.
5. Utiliser Embryomax® pour la manipulation des embryons tant en incubateur que sur le comptoir.