

Procédure Normalisée de Fonctionnement

TITRE : FABRICATION DE MICROPIPETTES	NUMÉRO : MI-2
DESTINATAIRES : Équipe de micro-injection	VERSION1 : 29.09.2014 VERSION 5 : 2.12.2019
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 : 1.10.2014
BUTS : Décrire les étapes de fabrication des différentes micropipettes utilisées pour tout le processus de micro-injection	

MATÉRIEL :

- Microforge Narishige MF-900
- Puller P-87 Sutter Instruments Inc.
- Capillaires en borosilicate Sutter Instruments Inc. (#B100-75-15)
- Capillaires en borosilicate avec filament Sutter Instruments Inc. (#B100-78-10)
- Tuile de céramique Sutter Instruments Inc.
- Brûleur ou chandelle
- Briquet

SANTÉ ET SÉCURITÉ : Non applicable

Règles générales pour les micropipettes :

- Une attention particulière doit être portée à la fabrication des diverses micropipettes afin d’assurer la réussite des différentes étapes de la micro-injection.
- Le matériel et l’équipement utilisés pour la fabrication des micropipettes doivent être manipulés avec précaution.
- Préparer assez de micropipettes pour une séance de micro-injection, mais ne pas en fabriquer trop. Les micropipettes s’abîment facilement même entreposées convenablement.
- Utiliser toujours des capillaires en verre de 1mm de diamètre externe pour la fabrication des micropipettes, car les appareils sur lesquels elles sont installées sont adaptés pour un diamètre de 1mm.

PROCÉDURES :

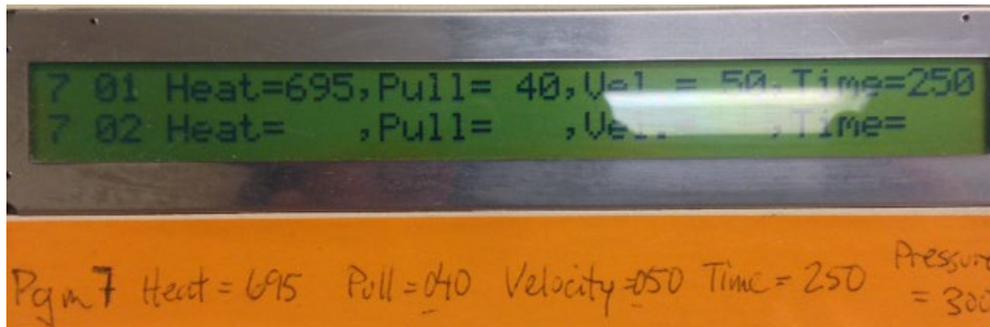
A. Fonctionnement de la microforge Narishige MF-900 pour les pipettes (micropipettes de maintien, transfert et réimplantation)

1. Allumer la microforge.
2. Installer le capillaire à forger sur le support à capillaire.
3. Placer le support à capillaire sur la pince de la microforge prévue à cette fin.
4. Sélectionner l’objectif 10X.

5. Faire la mise au point de l'élément chauffant en utilisant les vis macro et micrométrique situées sur la base de la microforge.
6. Réaliser le focus sur le capillaire, en second lieu, à l'aide des vis macro et micrométrique.
7. Tester l'intensité de l'élément chauffant en appuyant sur la pédale d'activation. Une intensité entre 7 et 8 devrait être suffisante pour effectuer toutes les manipulations sur les capillaires.
8. Placer le capillaire juste au-dessus l'élément chauffant à l'aide des vis de positionnement.
9. Déclencher l'élément chauffant et forger l'élément de verre selon le type de pipette recherchée (maintien, transfert ou réimplantation).
10. Relâcher la pédale d'activation de l'élément.
11. Retirer la pipette du support à capillaire et la déposer dans le boîtier à pipettes dans la section désignée.
12. Pour plus de détails concernant l'utilisation de la microforge, cliquer [ici](#).

B. Fonctionnement du puller Sutter Instrument Co. Model P-87 pour les pipettes d'injection

1. Mettre le bouton d'alimentation du puller en position « On ».
2. Appuyer sur 7 sur le clavier, afin de sélectionner le programme #7.
3. Confirmer les paramètres du programme 7 sur l'écran du puller :



4. Ouvrir le couvercle protecteur.
5. Installer un capillaire en verre avec filament sur un des étriers et serrer la vis de maintien.
6. Ramener manuellement l'étrier en faisant passer le capillaire dans l'élément chauffant, ATTENTION le filament est très fragile il ne doit en aucun cas être accroché.
7. Déclencher le second étrier pour que le capillaire s'appuie sur celui-ci aussi et serrer la vis de maintien.
8. Fermer le couvercle.

9. Appuyer sur « Pull ».
10. Attendre la fin du programme avant d'ouvrir le couvercle et de récupérer les micropipettes d'injection.
11. Recommencer les étapes 4 à 10 jusqu'à obtenir le nombre désiré de pipettes d'injection. Généralement pour une séance fabriquer une dizaine de pipettes d'injection. Voici une courte [vidéo](#) démontrant l'utilisation du puller P-87

D. Micropipette de transfert et de réimplantation

Comme son nom l'indique la micropipette de transfert sert à déplacer d'un pétri à un autre les embryons et la micropipette de réimplantation sert à transférer les embryons micro-injectés au sein de femelles pseudogestantes. Une fois fabriquées, elles sont rattachées au dispositif d'aspiration d'embryons avec pièce buccale.

1. Chauffer indirectement le centre d'un capillaire en verre à la base d'une flamme de chandelle.
2. Lorsque le verre devient malléable, retirer rapidement de la flamme tout en effectuant un mouvement d'étirement horizontal avec les bras afin de rendre le centre du capillaire très fin, tel que démontré dans cette [vidéo](#).
3. Couper au centre du capillaire avec une tuile de céramique de Sutter Instruments Inc. pour obtenir 2 micropipettes, tel que démontré dans cette [vidéo](#).
4. Installer une des micropipettes sur la microforge.

***Le diamètre interne de l'extrémité de la micropipette de transfert devrait être au minimum de 100 μm . Pour la micropipette de réimplantation voici les paramètres requis (diam int. >90 μm ; diam ext. 120-160 μm) ***.

5. Adoucir l'extrémité de la micropipette avec la microforge. Dès que l'extrémité s'arrondit, retirer la main du déclencheur de l'élément de la microforge.
6. Conserver les micropipettes dans le boîtier à pipettes dans la section désignée.
7. Rattacher la micropipette au dispositif d'aspiration d'embryons avec pièce buccale et procéder à la récupération et au transfert des embryons d'un pétri à un autre ou pour la réimplantation chirurgicale.

E. Micropipette de maintien :

La micropipette de maintien a pour principal objectif de retenir un embryon sans l'aspirer pour pouvoir le déplacer dans le pétri de micro-injection ou le micro-injecter.

1. Chauffer indirectement le centre d'un capillaire en verre à la base d'une flamme de chandelle.
2. Lorsque le verre devient malléable, retirer rapidement de la flamme tout en effectuant un mouvement d'étirement horizontal avec les bras afin de rendre le centre du capillaire très fin, tel qu'illustré sur la figure ci-dessous. Voir section D, étape 2.
3. Couper au centre du capillaire avec une tuile de céramique de Sutter Instruments Inc. pour obtenir 2 micropipettes. Voir section D, étape 3.

4. Installer une des micropipettes sur la microforge.
5. Adoucir l'extrémité et réduire l'ouverture de la micropipette avec la microforge.

Le diamètre de l'ouverture de la micropipette devrait être entre 10 μm et 20 μm ou 20% maximum de la taille de l'embryon.

6. Conserver les micropipettes dans le boîtier à pipettes dans la section désignée.
7. Rattacher la micropipette de maintien sur le micromanipulateur gauche du microscope. Voir la P.N.F. **MI-4.MICRO-INJECTION D'ADN CHEZ LA SOURIS**, pour connaître les détails concernant le fonctionnement du microscope et des micromanipulateurs.

F. Micropipette d'injection :

La micropipette d'injection est littéralement une aiguille microscopique qui sert à pénétrer le noyau d'un embryon dans le but d'y injecter une molécule de matériel génétique. Celles-ci doivent être préparées le jour même de l'injection.

Voir la section [B. Fonctionnement du puller](#) de cette P.N.F. pour l'utilisation du puller.

1. Déposer les micropipettes d'injection dans le tube contenant le matériel génétique à injecter. Elles se rempliront par capillarité.
2. Rattacher la micropipette d'injection sur le micromanipulateur de droite du microscope. Voir la P.N.F. **MI-4.MICRO-INJECTION D'ADN CHEZ LA SOURIS**, pour connaître les détails concernant le fonctionnement du microscope et des micromanipulateurs.

G. Tableau des diamètres internes et externes des différentes pipettes

Type de pipette	Utilisation	Diamètre interne (μm)	Diamètre externe (μm)
Transfert	Préparation et nettoyage des embryons en vue de leur injection	>100	>110
Maintien	Maintien et déplacement des embryons dans le pétris d'injection	10 à 20	100-140
Réimplantation	Chargement et implantation des embryons injectés dans des femelles pseudogestantes	>90	120-160
Injection	Injection d'embryons avec du matériel génétique en vue de les modifier génétiquement	Voir fonctionnement du P-87	Voir fonctionnement du P-87