

Procédure Normalisée de Fonctionnement

TITRE : MICRO-INJECTION D'ADN CHEZ LA SOURIS	NUMÉRO : MI-4
DESTINATAIRES : Plateforme de transgénèse de l'UQAM	VERSION 1 : 29.09.2014 VERSION 5 : 2.12.2019
ÉMISE PAR : Normand Lapierre et Manon St-Germain CORRIGÉE : Manon St-Germain, directrice et vétérinaire	CIPA : 20.01.2020
APPROUVÉE PAR : Manon St-Germain, directrice et vétérinaire	DATE : 1.10.2014
BUT : Procéder à la récolte des embryons de souris	

MATÉRIEL pour la récolte des embryons:

- Fluorinert
- Microscope inversé
- Incubateur à CO₂
- Pétri de micro-injection (voir MI-3)
- Micropipettes de maintien et d'injection
- Micromanipulateurs
- Kimwipes®

SANTÉ ET SÉCURITÉ :

- Le port du sarrau est obligatoire.
- Se référer aux F.D.S. disponibles dans le bureau SB-M415 pour connaître les risques reliés aux produits chimiques.
- En cas de déversement de produits chimiques, se référer aux fiches d'urgence affichées près des téléphones dans le SB-M472.

GÉNÉRALITÉS :

Les procédures se déroulent au local SB-M472 de l'animalerie du SB.

PROCÉDURES :

A. Installation de la micropipette de maintien

1. Utiliser la vis macrométrique (sens horaire ⤴) du système hydraulique côté gauche pour faire sortir les bulles d'air à l'extrémité du support de micropipette de maintien.
2. Si la seringue du système hydraulique est vide, suivre les étapes suivantes :
 - a. Mettre la valve 3 voies du côté gauche en position ouverte entre la réserve de Fluorinert et la seringue du système, ceci permettra le transfert de Fluorinert entre la seringue de réserve et la seringue du système.
 - b. Tourner la vis macro métrique (sens antihoraire ⤵) jusqu'à ce que la seringue du système soit remplie au 2/3.

- c. Remettre la valve 3 voies du côté gauche en position ouverte entre le système hydraulique et la seringue du système, ceci permettra le transfert de Fluorinert entre la seringue du système et le système hydraulique.
 3. Retirer de sa fixation le support de micropipette de gauche et desserrer la vis de fixation du support.
 4. Insérer délicatement une micropipette de maintien (voir P.N.F. **MI-2.FABRICATION DE MICROPIPETTES**) dans le joint d'étanchéité du support et serrer la vis de fixation.
 5. Tourner la vis macro métrique (sens horaire ⤴) jusqu'à ce qu'une goutte de Fluorinert sorte du bout de la micropipette de maintien.
 6. Installer le support de micropipette sur le micromanipulateur.
 7. Allumer le bloc d'alimentation du micromanipulateur et la lumière du microscope.
 8. Déposer sur la platine un pétris de micro-injection ne contenant pas d'embryons. Voir la P.N.F. **MI-3.RÉCOLTE ET PRÉPARATION D'EMBRYONS DE SOURIS POUR MICRO-INJECTION**, section **B. Pétris de micro-injection, Jour 4**, pour le schéma du pétris de micro-injection.
 9. Ajuster le positionnement de la micropipette de maintien à l'aide de la manette du micromanipulateur et des vis de positionnement.
- ***La micropipette de maintien doit se retrouver au centre de l'objectif du microscope et du triangle dans le pétri de micro-injection.***
10. Une fois le positionnement effectué, relever la micropipette de maintien et déplacer (à l'aide de la platine) le pétri de micro-injection de sorte que la micropipette de maintien, une fois remise dans le pétris, se retrouvera dans la demi-lune de droite du pétris.
 11. Tourner la vis macro métrique (sens antihoraire ⤵), afin d'aspirer de l'Embryomax® jusque dans la partie conique de la micropipette de maintien.
 12. Équilibrer la pression de la pipette de maintien avec la vis macro métrique du système hydraulique.
 13. Relever la micropipette de maintien.
 14. Ramener la platine de manière à remettre le triangle du pétri dans le centre de l'objectif et descendre la micropipette de maintien dans le triangle du pétris.

B. Installation de la micropipette d'injection

1. Utiliser la vis macrométrique (sens horaire ⤴) du système hydraulique côté droit pour faire remonter le Fluorinert jusqu'à la marque jaune sur la tubulure du système hydraulique.
2. Retirer de sa fixation le support de micropipette de droite et desserrer la vis de fixation du support.

3. Insérer délicatement une micropipette d'injection (voir P.N.F. **MI-2.FABRICATION DE MICROPIPETTES**) dans le joint d'étanchéité du support et serre la vis de fixation.
4. Installer le support sur le micromanipulateur.
5. Allumer le bloc d'alimentation du micromanipulateur.
6. Installer une pétris de micro-injection contenant des embryons sur la platine du microscope.
7. Ajuster le positionnement de la micropipette d'injection à l'aide de la manette du micromanipulateur et des vis de positionnement.

La micropipette d'injection doit se retrouver au centre de l'objectif du microscope et du triangle dans le pétris de micro-injection. Elle doit aussi être en ligne directe avec la micropipette de maintien. Finalement, on doit pouvoir effectuer, avec le bras du micromanipulateur de droite, un mouvement elliptique autour de la micropipette de maintien avec celle d'injection.

8. Faire 3 quarts de tour en sens horaire ⤵ avec la vis macrométrique du système hydraulique côté droit.
9. En regardant dans les objectifs du microscope, briser la pointe de l'aiguille de la micropipette d'injection en frottant très légèrement celle-ci sur la micropipette de maintien.
10. Placer l'aiguille près d'un embryon. Si celui-ci se met à tourner légèrement, l'étape a réussi. Sinon, recommencer les étapes 8-9 et replacer l'aiguille près d'un embryon pour voir s'il tourne.

Si l'aiguille est trop abimée ou que la pression semble trop forte ou qu'elle est obturée pour une quelconque raison, changer la micropipette d'injection au complet et recommencer à l'étape 1 de cette section.

C. Manipulation et injection des embryons

La manipulation et l'injection des embryons demandent une grande dextérité et beaucoup de pratique. Voici les conseils à retenir :

1. La micropipette de maintien devrait frotter très légèrement le fond du pétri afin d'éviter aux embryons de remonter brusquement sur celle-ci et s'endommager.
2. La pression dans la micropipette de maintien doit autant que possible être neutre, ce qui permet d'aspirer et de repousser facilement les embryons. La pression de la micropipette d'injection doit être positive.
3. Les micropipettes et la platine sont utilisées autant pour les déplacements que le maintien et l'injection des embryons.
4. Si de l'huile tombe en dehors du pétris de micro-injection, nettoyer immédiatement la platine du microscope ou toutes autres surfaces où l'huile est tombée et le pétris.
5. Un pétris de micro-injection ne devrait pas contenir plus de 35 embryons. Ceci permet au manipulateur d'injecter un nombre optimal d'embryons dans un court laps de temps sans endommager ceux-ci, soit environ 15 minutes.

6. Vérifier entre chaque injection que l'aiguille est fonctionnelle (est-elle bouchée, y a-t-il toujours de la pression, est-elle endommagée ou émoussée...). Changer l'aiguille au besoin.
7. Lorsque les embryons commencent à avoir une apparence granulaire, il faut les remettre dans l'incubateur à CO₂.
8. Au moment de l'injection, la pression de retenue sur l'embryon doit être assez forte pour l'éviter de bouger, mais pas assez pour l'aspirer dans la micropipette de maintien.
9. Débuter les injections par les embryons où le pro noyau est bien défini et terminé par les moins clairs.
10. Placer les embryons non injectés dans la pointe supérieure du triangle dans le pétri de micro-injection. Mettre les embryons injectés dans le bas à droite lorsque l'injection est un succès et en bas à gauche lorsque celle-ci a échoué.
11. Une seule tentative d'injection par embryon peut être faite.
12. Utiliser la demi-lune d'Embryomax® en périphérie du pétris pour nettoyer ou remplir la micropipette de maintien.
13. Préparer toujours 1 ou 2 pétris supplémentaires pour transférer au besoin les embryons (milieu sale, embryons avec une apparence anormale...).

D. Tri et incubation des embryons micro-injectés

Lorsque toutes les injections sont terminées :

1. Préparer un pétris (couvercle de pétris non utilisés) avec des gouttes d'Embryomax® (3-4 gouttes de 50-100µl chacune) et recouvrir les gouttes d'huile jusqu'à ce le milieu soit complètement recouvert d'huile.
2. Trier les embryons comme suit :
 - a. Compter et mettre les embryons survivants dans le nouveau pétris à l'aide du système d'aspiration et d'une micropipette de transfert;
 - b. Compter les non injectables;
 - c. Compter les morts;
 - d. Comptabiliser ces chiffres dans le cahier de micro-injection.
3. Implanter les embryons le jour même dans des femelles pseudogestantes ou laisser incuber jusqu'au lendemain tous les embryons et confirmer au matin le nombre d'embryons passés au stade 2 cellules avant de les implanter dans des femelles pseudogestantes. Voir la P.N.F. **MI-5** pour l'implantation d'embryons.