

Procédure Normalisée de Fonctionnement

TITRE : MATÉRIEL ET SOLUTIONS POUR CRYOPRÉSERVATION	NUMÉRO : MI-7
DESTINATAIRES : Équipe de micro-injection	Version 1 : 4.06.2017 VERSION 4 : 2.12.2019
ÉMISE PAR : Normand Lapierre, T.S.A. CORRIGÉE : Manon St-Germain, vétérinaire et directrice Guillaume Bernas, agent de recherche Labo N.Pilon.	CIPA : 20.01.2020
APPROUVÉE PAR : Manon St-Germain, vétérinaire et directrice	DATE : 5.06.2017
BUTS : Décrire la marche à suivre afin de cryopréserver une lignée de souris en récoltant les spermatozoïdes de mâles donneurs.	

MATÉRIEL :

- Voir procédures

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

PROCÉDURES :

ATTENTION, certains produits sont difficiles à peser étant donné le faible poids. Il est possible de préparer des solutions 1000x et d'utiliser 100µl de ces solutions lors de la préparation de solutions ci-dessous.

Ex. : Na-Pyruvate= 3.7mg pour mHTF. Préparer une solution de 1ml avec 37mg de Na-Pyruvate. Aliquoter en tubes de 200µl et conserver à -20°C jusqu'à utilisation.

Ces protocoles sont tirés du site internet [Infrafrontier mouse disease models](#)

Solution cryoprotectante pour spermatozoïdes (CPA)

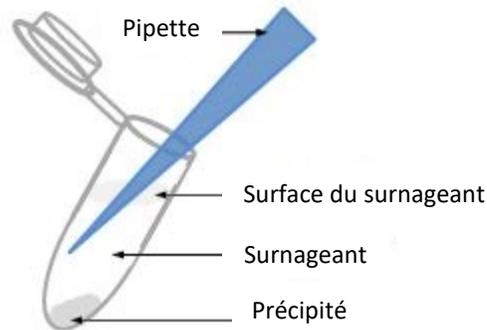
Pour 10 mL

Nom du produit	Quantité/10mL	Fournisseur	Code	Format	Coût	Entreposage
Raffinose	1.8g	Sigma	R7630	100g	406.00	T°P
L-Glutamine	146mg	Sigma	G8540	100g	170.00	T°P
Skim milk	300mg	Fisher	DF0032-17-3	500g	45.27	T°P
Ultra pure water Molecular grade	10mL	Millipore Sigma	TMS-006-B	500mL	19.80	T°P

*T°P=température pièce

1. Ajouter la raffinose à 10mL d'eau et passer au vortex pour 3 minutes.
2. Placer dans un bain-marie à 60°C jusqu'à dissolution complète de la raffinose.
3. Ajouter L-glutamine et dissoudre au vortex.
4. Dissoudre le lait au vortex.

5. Remettre le tube dans le bain à 60°C pour 60 minutes en vortexant le tube aux 15 minutes.
6. Préparer des aliquots de 1mL dans des Eppendorf et centrifuger à 10 000g pendant 60 minutes.
7. Récupérer le surnageant dans la partie centrale du tube (500à 700 µL) et le filtrer avec un filtre 0.22µm dans des Eppendorf.



8. Sceller les Eppendorf avec du parafilm et entreposer à T°P pour une durée maximale de 2 mois.

Milieu HTF haute teneur en calcium (mHTF)

Pour 100 mL

Nom du produit	Quantité/100mL	Fournisseur	Code	Format	Coût	Entreposage
NaCl	593.8mg	Sigma	S5586	1kg	63.30	T°P
KCl	35mg	Sigma	P5405	250g	34.00	T°P
MgSO₄.7H₂O	4.9mg	Sigma	63138	250g	86.00	T°P
KH₂PO₄	5.4mg	Sigma	P5655	100g	35.30	T°P
CaCl₂.2H₂O	75.5mg	Sigma	C7902	500g	81.90	T°P
NaHCO₃	210mg	Sigma	S5761	500g	53.40	T°P
Glucose	50mg	Sigma	G6152	100g	48.20	T°P
Na-Lactate	453.9mg (340µl)	Sigma	L7900	100mL	80.20	4°C
Na-Pyruvate	3.7mg	Sigma	P4562	5g	50.70	4°C
Pénicilline G	7.5mg	Sigma	P7794	1MU	25.70	T°P
Streptomycine	5mg	Sigma	S1277	5g	34.70	4°C
Phenol red (0.5%)	40µl	Sigma	P0290	100mL	29.60	T°P
BSA (FractionV, Fatty free acid)	400mg	Sigma	A3311	10g	153.00	4°C

1. Pour éviter la précipitation du CaCl₂, préparer une solution séparée du reste.
2. Mélanger tous les autres produits (**sauf le BSA**) dans de l'eau ultra pure.
3. Mélanger les 2 solutions.

4. Filtrer la solution sur un filtre 0.22µm.
5. Préparer des aliquots de 10mL dans des tubes identifiés.
6. Entreposer à 4°C pour une durée maximale de 3 mois.
7. Utiliser cette solution pour la préparation des pailles de cryopréservation et les fécondations *in vitro* (FIV).
8. Ajouter le BSA (40mg/10mL) le jour d'utilisation du mHTF et jeter le reste après utilisation.

Milieu de pré-incubation pour spermatozoïdes (TYH+0.75mM MBCD)

Pour 100 mL

Nom du produit	Quantité/100mL	Fournisseur	Code	Format	Coût	Entreposage
NaCl	697.6mg	Sigma	S5586	1kg	63.30	T°P
KCl	35.6mg	Sigma	P5405	250g	34.00	T°P
MgSO₄.7H₂O	29.3mg	Sigma	63138	250g	86.00	T°P
KH₂PO₄	16.2mg	Sigma	P5655	100g	35.30	T°P
NaHCO₃	210.6mg	Sigma	S5761	500g	53.40	T°P
Na-Pyruvate	5.5mg	Sigma	P4562	5g	50.70	4°C
Glucose	100mg	Sigma	G6152	100g	48.20	T°P
CaCl₂.2H₂O	25.1mg	Sigma	C7902	500g	81.90	T°P
Methyl-β-cyclodextrine	98.3mg	Sigma	C4555	1g	87.00	T°P
Pénicilline G	7.5mg	Sigma	P7794	1MU	25.70	T°P
Streptomycine	5mg	Sigma	S1277	5g	34.70	4°C
Poly(vinyl alcohol)	100mg	Sigma	P8136	250g	61.20	T°P

1. Pour éviter la précipitation du CaCl₂, préparer une solution séparée du reste.
2. Mélanger tous les autres produits dans de l'eau ultra pure.
3. Mélanger les 2 solutions.
4. Filtrer la solution sur un filtre 0.22µm.
5. Préparer des aliquots de 1mL dans des tubes identifiés.
6. Entreposer à 4°C pour une durée maximale de 3 mois.
7. Utiliser cette solution pour la préparation des spermatozoïdes en vue des fécondations *in vitro* (FIV).

Tableau de matériel et produits divers utilisés pour la cryopréservation

Nom du produit	Fournisseur	Code	Format	Coût	Utilisation
Cloche N₂ liquide					Récipient pour congélation à N ₂ liquide
Aluminium cane	Reproduction provisions	347550	Pqt 100	29.70USD	Support principal dans les cloches N ₂ liquide
Goblet	Reproduction provisions	347440	Pqt 100	26.00USD	Support pour les pailles. Ils sont déposés dans les « aluminium cane »
Cryotags	Reproduction provisions	347515 347516 347518 347521	Bleu Vert Rouge Jaune	6.80USD Ch. Pqt 100	Tags couleurs pour ID les « aluminium cane »
Reduced glutathione	Sigma	G6013	5g	92.60	4°C, pour mHTF FIV
Huile minérale	Sigma	M8410	1L	49.90	T°P, doit être stérilisée avec 20% eau, utilisé pour éviter la déshydratation des milieux en pétris
Pailles	Reproduction provisions	13407/0010	2000/pqt	103.00USD	Pour congélation de spermatozoïdes