

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА и
Ю.А. ОВЧИННИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» (ИБХ РАН)

УДК 574/577, 599.32

№ госрегистрации АААА-А17-117121350145-1

Инв. №



«УТВЕРЖДАЮ»
ВРИО директора ИБХ РАН
доктор химических наук
академик

А.Г. Габиров

«30» сентября 2017

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Программа фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013–2020 годы

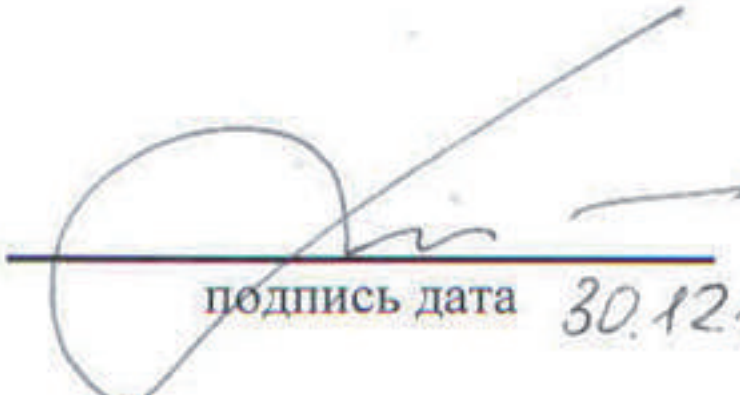
52. Биологическое разнообразие

ИНВЕНТАРИЗАЦИЯ И РАЗВИТИЕ БИОРЕСУРСНОЙ КОЛЛЕКЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ
ГРЫЗУНОВ

(заключительный)

Номер проекта в ИСГЗ ФАНО 0101-2016-002

Научный руководитель
Заведующий НПП «Питомник
лабораторных животных»,
кандидат биологических наук



подпись дата 30.12.17

Г.Б. Телегин

Москва–2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель
Заведующий НПП
«Питомник лабораторных
животных», к.б.н.

 30.12.17

Г.Б. Телегин

подпись, дата

Исполнители темы

м.н.с., к.б.н.

 30.12.17

А.Н. Минаков

подпись, дата

инженер-исследователь

 30.12.17

Е.В. Малявина

подпись, дата

инженер-исследователь

 30.12.17

М.В. Денисова

подпись, дата

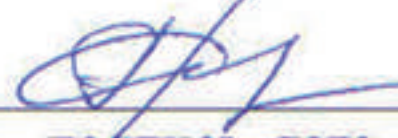
инженер

 30.12.17

Б.М. Щекатуров

подпись, дата

инженер

 30.12.17

Р.Б. Щекатуров

подпись, дата


инженер

 30.12.17

Г.А. Соломина

подпись, дата

ст. лаборант

 30.12.17

С.В. Денисова

подпись, дата


ст. лаборант

 30.12.17

Н.Б. Иваницкая

подпись, дата

ст. лаборант

 30.12.17

Е.И. Тремасова

подпись, дата

ст. лаборант

 30.12.17

Т.Д. Филипенко

подпись, дата


ст. лаборант

 30.12.17

Е.Н. Чалко

подпись, дата

лаборант

 30.12.17

С.В. Турдиева

подпись, дата

нормоконтролер

 30.12.17

Л.А. Широкова

подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 126 с., 1 ч., 1 рис., 0 табл., 18 источников, 12 прил.

БИОРЕСУРСНАЯ КОЛЛЕКЦИЯ, SPF СТАТУС, МЕЛКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ГРЫЗУНЫ, СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА, СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

Объект исследования – БРК «Коллекция лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований».

Цель работы – инвентаризация и развитие биоресурсной коллекции «Коллекция лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований».

Результаты. В рамках выполнения государственного задания были проведены следующие работы:

- 1) Создан технологический паспорт «Коллекция лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований» ИБХ РАН, включающий в себя: а) описание полного набора ключевых СОП, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции ИБХ РАН. 2) Технологический паспорт ИБХ РАН размещен на интернет-сайте коллекции ИБХ РАН. 3) Проведена экспериментальная проверка восьми СОП по криосохранению генетических ресурсов Питомника: а) подобраны криопротекторы и отработан полный цикл криосохранения ооцитов хомяков, б) в криобанк заложены более 250 восьмиклеточных эмбрионов от криосохраняемых линии мышей ПЛЖ. 4) Разработан и оформлен СО ПЛЖ «Криосохранение генетических ресурсов Питомника». 5) Разработана и внедрена в производственный процесс модель хирургической травмы спинного мозга у крыс для исследования регенеративных возможностей наноструктурных конструкторов, полученных методами 3D-принтинга. 6) Электронный каталог коллекции ИБХ РАН пополнен информацией о геномодифицированных мышах согласно имеющемуся формату унифицированной сетевой коллекции лабораторных животных. 7) Подготовлены и отправлены в рецензируемые журналы четыре научные публикации на основе использования генетического материала коллекции, одна из которых принята к печати (WoS). 8) Подготовлен календарный план работ дополнительного государственного задания. 9) Успешно пройден реаккредитационный аудит AAALACi. 10) Проведена подготовка к ресертификации системы менеджмента Питомника для следующей области применения: «Проектирование и разработка, разведение, содержание и поставка мелких лабораторных грызунов для научных исследований и испытаний», на соответствие требованиям ISO 9001:2015. 11) Подготовлен отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте коллекции ИБХ РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания. 12) Сделаны предположения о развитии объекта исследования: планирование работы по поддержанию коллекции, расширению генофонда и оказанию услуг по запросам потребителя.

СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения	6
Введение	7
Основная часть	9
1 Общая информация о коллекции	9
2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания	9
3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование	10
4 Результаты, полученные в рамках исполнения дополнительного государственного задания	10
Заключение	13
Список использованных источников	17
Приложение А. Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы	19
Приложение Б СОП 1Р	24
Приложение В СОП 2Р	29
Приложение Г СОП 3Р	35
Приложение Д СОП 4Р	41
Приложение Е СОП 5Р	54
Приложение Ж СОП 6Р	60
Приложение И СОП 7Р	65
Приложение К СОП 8Р	70
Приложение Л СОП 8.13Х	76
Приложение М СО ПЛЖ 19-17	87
Приложение Н Технологический паспорт	109

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БРК – Биоресурсная коллекция

БРЦ – Биоресурсный центр

ПЛЖ – Питомник лабораторных животных

СО – Стандарт организации

СОП – Стандартная операционная процедура

ФАНО – Федеральное агентство научных организаций

AAALACi – Международная ассоциация по аттестации и аккредитации программ по работе с лабораторными животными

ISO – International Organization for Standardization, Международная организация по стандартизации

SPF – Specified Pathogen Free, свободные от специфицированной микрофлоры

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все более активно используют лабораторных животных с целью создания адекватных моделей функционирования человека и животных для последующего описания и анализа изучаемых процессов [1]. Применяют генетическую, клеточную и хирургическую модификации организма животных с целью создания моделей для исследования различных генетических заболеваний и патологических процессов, а также поиска потенциальных лекарственных препаратов [2-7]. Лидирующее место среди мелких лабораторных животных, обеспечивающих исследователей богатым материалом для изучения роли и функционирования генов, а также различных физиологических состояний в норме/патологии занимает лабораторная мышь [8]. Для получения надежных и воспроизводимых результатов медико-биологических исследований необходимо соблюдать стандартность всех составляющих, и, в первую очередь, это относится к животным-биомоделям, которых используют в исследованиях/испытаниях, производстве. В соответствии с требованиями ведущих международных организаций (AAALACi), стандартность лабораторных животных достигается путем применения современных технологий разведения и содержания в контролируемой среде (барьерной системе), а также едиными критериями оценки состояния их здоровья [9-18].

В вивариях и питомниках содержится большое количество разнообразных линий мышей, крыс и хомяков (аутбредные, инбредные, иммунодефицитные, геномодифицированные). Зачастую, сохранение линий в условиях *ex situ – in vivo* (в разведении) связано со значительными экономическими и техническими трудностями. Существует опасность потери ценных признаков в результате неконтролируемых скрещиваний, появления мутаций, генетического дрейфа, случайных инфекций и техногенных катастроф. Для минимизации вышеперечисленных рисков создаются низкотемпературные криобанки, в которых осуществляют хранение генетического материала (эмбрионы, яйцеклетки, сперма) в течение длительного времени в неизменном состоянии. Криобанк позволяет обеспечить сохранность генетического материала на фоне общего снижения финансовых затрат на содержание и разведение мало востребованных линий животных.

Непрерывное увеличение числа новых линий ведет к необходимости создания биоресурсных центров (БРЦ) с контролируемыми условиями содержания и последующего хранения коллекционного материала. Это позволяет обеспечить надежную сохранность и доступность ценных генетических ресурсов. Единицами хранения коллекционных фондов могут быть как живые особи в разведении (*in vivo*), так и криосохраненный генетический материал (эмбрионы, яйцеклетки, сперма). Существующие коллекции подразделяют на

сервисные – коллекционные фонды, предназначенные для активного использования широким кругом организаций (включая биофармацевтические компании), и научные – поддерживаемые, в основном, для обеспечения исследований в научных организациях.

Биоресурсная коллекция мелких лабораторных грызунов SPF категории, поддерживаемая в Питомнике лабораторных животных (ПЛЖ) ФИБХ РАН, является сервисной и призвана повысить эффективность кооперативного использования научно - технологических ресурсов. На базе ПЛЖ проводятся сохранение, разведение и содержание стандартизованных инбредных/аутбредных и уникальных геномодифицированных животных-биомоделей (болезни Альцгеймера, мышечной дистрофии, бокового амиотрофического склероза и др.), свободных от специфицированной патогенной микрофлоры (SPF-категории).

Поставляемые ПЛЖ российским научным организациям и биофармацевтическим компаниям лабораторные животные соответствуют международным требованиям AAALACi и ISO. Успешное поддержание и развитие собственной коллекции, обеспечивающей генетическим материалом производство лабораторных грызунов в ПЛЖ, основывается, в том числе, на строгом соблюдении стандартных операционных процедур (СОП) и стандартов организации (СО).

Целью данной работы было провести инвентаризацию и усовершенствование учета имеющихся единиц хранения коллекции лабораторных грызунов, а также формализовать производственный процесс (путем введения новых СО и СОП) при криосохранении генетических ресурсов ПЛЖ.

Поставленные задачи:

1) Создать Технологический паспорт коллекции ИБХ РАН, который включает в себя: а) описание полного набора ключевых СОП, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции ИБХ РАН.

2) Разработать и оформить стандарт организации «Криосохранение генетических ресурсов Питомника».

3) Подобрать криопротекторы и отработать полный цикл криосохранения: замораживание, криохранение, контроль качества и размораживание ооцитов хомяков. Заложить в криобанк не менее 250 восьмиклеточных эмбрионов от каждой криосохраняемой линии мышей.

4) Разработать и внедрить в производственный процесс новую модель хирургической травмы спинного мозга у крыс для исследования регенеративных возможностей наноструктурных конструкторов, полученных методами 3D-принтинга.

5) Пополнить электронный каталог коллекции ИБХ РАН информацией о геномодифицированных мышах согласно имеющемуся формату унифицированной сетевой коллекции лабораторных животных.

6) Разработать единый формат описания единиц хранения, совместимый с общей базой данных биоресурсных коллекций ФАНО.

7) Подготовить три рукописи статей в рецензируемых журналах (Scopus, WoS), на основе материалов коллекции, одна из которых должна быть принята в печать.

8) Подготовить календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.

9) Разместить отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте коллекции ИБХ РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

Настоящий отчет является заключительным по теме «Инвентаризация и развитие биоресурсной коллекции лабораторных грызунов» за 2017 год.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Общая информация о коллекции

1.1 Название коллекции: «Коллекция лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований».

1.2 Наименование организации ФАНО России – держателя коллекции (если организация прошла реорганизацию в 2017г, то указать старое и новое название): Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

1.3 Регистрационный номер биоресурсной коллекции в информационной системе «Парус» ФАНО России: 101.

1.4 Направление ФНИ: 52. Биологическое разнообразие.

1.5 Руководитель коллекции: Телегин Георгий Борисович, заведующий Научно-производственным подразделением «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, к.б.н., telegin@bibch.ru, +7(4967)73-42-44.

1.6 Назначение коллекции: предоставление исследователям стандартизованных мелких лабораторных грызунов для получения надежных и воспроизводимых результатов медико-биологических экспериментов.

1.7 Регистрация коллекции в перечне ЦКП/УНУ «Современная исследовательская инфраструктура Российской Федерации»: Есть.

1.8 Наименование, реестровый номер и адрес ЦКП/УНУ на сайте <http://www.ckp-rf.ru>: УНУ «Био-модель», № 507553, <http://ckp-rf.ru/usu/507553/>.

1.9 Дата образования коллекции: 03.01.2002.

1.10 Отражение коллекционной деятельности в Уставе организации: Нет

1.11 Положение о коллекции, утвержденное на Ученом совете организации: Нет

1.12 Адрес WEB-сайта организации, на котором представлена информация о коллекции: <http://www.bibc.psn.ru/> , <http://www.spf-animals.ru>.

2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного госзадания

2.1 Текст Отчета представлен на:

а) WEB-сайте организации: <http://www.ibch.ru/>

б) Информационном портале БРК:

<http://brk.forge.sscs.ru/kollekcii/kollekcii-zhivotnyh-dikie-i-laboratornye-zhivotnye/kollekciya-laboratornyh-zhivotnyh-ibh>

2.2 Содержание основных результатов работы по дополнительному госзаданию в соответствии с ПФНИ ГАН: Инвентаризация и развитие биоресурсной коллекции лабораторных грызунов.

3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование

3.1 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе «Парус» ФАНО России: 0101-2016-002

3.2 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе ЦИТИС: АААА-А17-117121350145-1

3.3 Отчет по дополнительному госзаданию (*указать регистрационный номер в системе Парус*) подготовлен и загружен в систему Парус (*указать дату загрузки*)

3.4 Отчет по дополнительному госзаданию (*указать регистрационный номер в системе ЦИТИС*) подготовлен и загружен в систему ЦИТИС (*указать дату загрузки с систему ЦИТИС*)

3.5 Объем финансирования, выделенного на выполнение ДГЗ из средств ФАНО России в 2017 году: 4, 8894 млн. рублей, Соглашение № 007-03-175/3.

3.6 Объем финансирования, выделенного на приобретение крупного оборудования из средств ФАНО России в 2017 г.(свыше 500 000 руб.): 0 рублей.

4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания

4.1 Подготовка технологического паспорта «Коллекция лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований» ИБХ РАН.

Технологический паспорт ИБХ РАН включает в себя: а) описание полного набора ключевых СОП, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции ИБХ РАН. Технологический паспорт размещен на интернет-сайте коллекции ИБХ РАН. Стандартные операционные процедуры по поддержанию и развитию коллекции, а также сметы расходов находятся в Приложениях Б-Л, ниже приведены их названия:

1 СОП № 1Р «Отбор и подготовка генетического материала для криосохранения».

2 СОП № 2Р «Гормональная подготовка реципиентов при проведение криоконсервации генетических ресурсов».

3 СОП № 3Р «Вымывание ооцитов/эмбрионов при проведении криоконсервации генетических ресурсов».

- 4 СОП № 4Р «Замораживание ооцитов/ранних эмбрионов при сохранении генетических ресурсов».
- 5 СОП № 5Р «Размораживание ооцитов/ранних эмбрионов».
- 6 СОП № 6Р «Нехирургическая трансплантация размороженных эмбрионов самкам-реципиентам».
- 7 СОП № 7Р «Маркировка и учет единиц хранения в криохранилище».
- 8 СОП № 8Р «Общие правила работы с криохранилищем при проведении криоконсервации генетических ресурсов».
- 9 СОП № 8.13.X «Моделирование структурной травмы спинного мозга у крыс».

Для обоснования смет стандартных операционных процедур и расчета общей стоимости работ, обеспечивающих развитие и поддержание коллекции лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований ИБХ РАН, были собраны данные об оплате труда, приобретении материалов, расходах на содержание оборудования, коммунальных и иных затратах, необходимых для выполнения работ по перечисленным выше СОП. Сметы расчета стоимости выполнения СОП, необходимых для развития БРК представлены в Приложениях Б-К.

Расчеты проводились в соответствии с моделью и методикой оценки, разработанными ИЦиГ СО РАН в рамках выполнения дополнительного государственного задания по теме: «Разработка модели финансового управления сохранением и рациональным использованием биоресурсов в рамках функционирования биоресурсных научных коллекций» (http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/report). Полный набор данных представлен на портале «Биоресурсные коллекции ФАНО России» (http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/collections/45).

Итоговый объем требуемого годового финансирования коллекции рассчитан на основе предполагаемого плана работ и составляет 12661571,21 руб., из которых 9496178,41 руб. запланированы для выполнения работ по содержанию и развитию коллекции, 3165392,80 руб. запланированы для обеспечения накладных расходов на работу коллекции.

4.2 Подбор криопротекторов и отработка полного цикла криосохранения: замораживание, криохранилище, контроль качества и размораживание ооцитов хомяков.

В ходе выполнения работы по криосохранению ооцитов хомяков были подобраны оптимальные криопротектирующие среды на основе пропиленгликоля, а также выбраны рабочие концентрации, позволившие получить заморожено-оттаянные ооциты высокого

качества (рисунок 1). Процент ооцитов, успешно прошедших все этапы замораживания-размораживания, составил 83%.

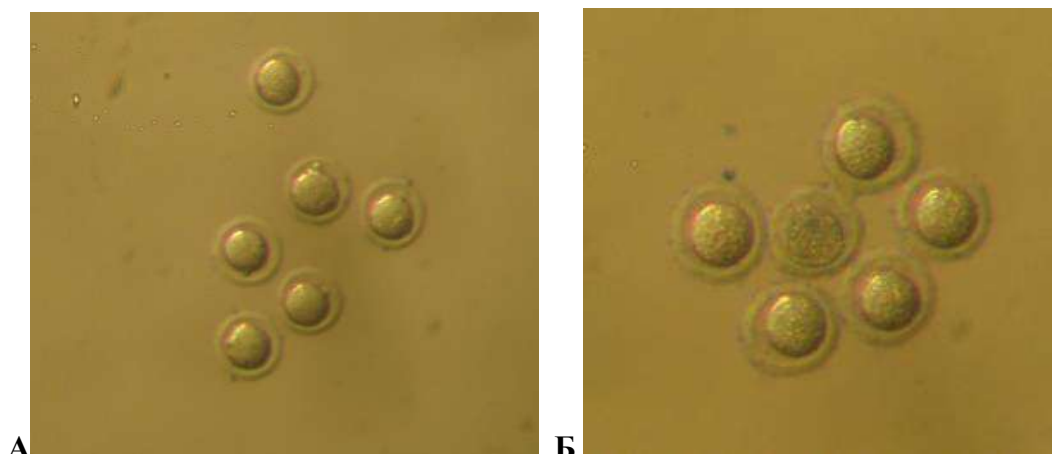


Рисунок 1 – Ооциты хомяков на стадии метафаза II:

А - сразу после вымывания;

Б – после процедуры замораживания-оттаивания согласно разработанных СОП.

Вся информация об использованных материалах и подходах для криосохранения ооцитов хомяков представлена в Приложениях Б-Е.

В криобанк на длительное хранение было заложено более 250 восьмиклеточных эмбрионов мышей линий: C57BL/6, ВСHE^{+/-}, 202. Информация по данным линиям мышей была обновлена на сайте коллекции (www.spf-animals.ru). В соответствии с разработанными СОПми была подготовлена вся необходимая сопроводительная документация, которая позволяет проводить описание единиц хранения в соответствии с общей базой данных биоресурсных коллекций ФАНО. Информации о разработанной документации представлена в Приложениях Б-К.

4.3 Подготовка статей в рецензируемых журналах.

В соответствии с дополнительным государственным заданием на основе материалов коллекции подготовлены четыре рукописи статей в рецензируемых журналах (Scopus, WoS), одна из которых принята в печать:

1) Минаков А.Н., Чернов А.С., Асютин Д.С., Коновалов Н.А., Телегин Г.Б. «Экспериментальное моделирование травмы спинного мозга у лабораторных крыс». Acta Nature (WoS);

2) E.P. Barykin, I.Y. Petrushanko, S.A. Kozin, G.B. Telegin, A.S. Chernov, O.D. Lopina, S.P. Radko, V.A. Mitkevich, A.A. Makarov «The β -amyloid peptide “bad habits” corrected by phosphorylation: aggregation, ionic homeostasis impairment and amyloidogenicity». Отправлена в печать в Nature Communications (WoS).

3) Y. Lomakin, S. Terekhov, N. Kostin, A. Kudriaeva, A. Chernov, G. Telegin, A. Belogurov «Fluorescence peptide-based sensor of myelin-specific abzymatic activity». Отправлена в печать в BioNanoScience (Scopus).

4) K.V. Korneev, A.N. Kondakova, E.N. Sviriaeva, N.A. Mitkin, A. Palmigiano, A.A. Kruglov, G.B. Telegin, M.S. Drutskaya, L. Sturiale, D. Garozzo, S.A. Nedospasov, Y.A. Knirel, D.V. Kupras «Reduced inflammatory response to pathogenic bacteria: moderate TLR4-mediated signaling in response to hypoacylated LPS from a foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*». Отправлена в печать в Frontiers in Cellular and Infection Microbiology BioNanoScience.

Материалы статей представлены в Приложении А.

4.4 Стандарт организации «Криосохранение генетических ресурсов Питомника».

В ходе выполнения работы был разработан и формализован стандарт организации «Криосохранение генетических ресурсов Питомника», в котором отражены главные требования при выполнении процедур криосохранения генетических ресурсов ПЛЖ (эмбрионы/ооциты). (Приложение М).

4.5 Разработка новой модели хирургической травмы спинного мозга у крыс.

В ходе выполнения работы была разработана и верифицирована новая модель структурной гемилатеральной травмы спинного мозга у крыс для исследования регенеративных возможностей наноструктурных конструкторов, полученных методами 3D-принтинга. Использование данной методики позволило получать 100% выживаемость подопытных животных, и снизить срок послеоперационного восстановления. Данная методика была оформлена в виде СОП (Приложение Л). По результатам материалов литературного обзора имеющихся в настоящее время моделей травмы спинного мозга у лабораторных крыс, была оформлена и отправлена в печать статья «Экспериментальное моделирование травмы спинного мозга у лабораторных крыс» (Приложение А).

4.6 Подготовка календарного плана работ.

Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания:

- Описание полного перечня стандартных операционных процедур для развития и поддержания БРК, 10.08.2017;
- Оформление и экспериментальная проверка четырех СОП, 20.09.2017;
- Создание Технологического паспорта ИБХ РАН, 30.09.2017 (Приложение Н);
- Промежуточный отчет о проделанной работе, 29.09.2017;

- Формирование и оформление стандарта организации, 10.10.2017;
- Размещение обновленной информации о материале коллекции на веб-сайте коллекции ИБХ РАН, 10.11.2017;
- Оформление и экспериментальная проверка четырех СОП, 15.12.2017;
- Направление в рецензируемые журналы (Scopus, WoS) не менее трех рукописей статей, подготовленных на основе материалов коллекции, 22.12.2017;
- Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания, 25.12.2017.

4.7 Размещение отчета о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте коллекции ИБХ РАН.

Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте коллекции ИБХ РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Главная задача биоресурсного центра - введение единых стандартов качества предоставляемого коллекционного генетического материала и обеспечение его биобезопасности. Введение стандартов качества предполагает использование единых методологических подходов (СО и СОП) к идентификации принимаемого на хранение, сохраняемого и выдаваемого коллекционного материала. Расширение используемой методологической базы в соответствии с достижениями в области науки о жизни.

В ходе выполнения работ по поддержанию и развитию коллекционного фонда ИБХ РАН были получены следующие результаты:

- 1) Создан технологический паспорт «Коллекция лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований» ИБХ РАН, включающий в себя: а) описание полного набора ключевых СОП, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции ИБХ РАН.
- 2) Технологический паспорт ИБХ РАН размещен на интернет-сайте коллекции ИБХ РАН.
- 3) Проведена экспериментальная проверка восьми СОП по криосохранению генетических ресурсов Питомника: а) подобраны криопротекторы и отработан полный цикл криосохранения: замораживание, криохраниение, контроль качества и размораживание ооцитов хомяков, б) в криобанк заложены более 250 восьмиклеточных эмбрионов от криосохраняемых линии мышей ПЛЖ.
- 4) Разработан и оформлен СО ПЛЖ «Криосохранение генетических ресурсов Питомника».
- 5) Разработана и внедрена в производственный процесс модель хирургической травмы спинного мозга у крыс для исследования регенеративных возможностей наноструктурных конструкторов, полученных методами 3D-принтинга.
- 6) Электронный каталог коллекции ИБХ РАН пополнен информацией о геномодифицированных мышах согласно имеющемуся формату унифицированной сетевой коллекции лабораторных животных.
- 7) На основе использования генетического материала коллекции подготовлены и отправлены в рецензируемые журналы четыре научные публикации: «Экспериментальное моделирование травмы спинного мозга у лабораторных крыс»; «The β -amyloid peptide “bad habits” corrected by phosphorylation: aggregation, ionic homeostasis

impairment and amyloidogenicity»; «Fluorescence peptide-based sensor of myelin-specific abzymatic activity»; «Reduced inflammatory response to pathogenic bacteria: moderate TLR4-mediated signaling in response to hypoacylated LPS from a foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*».

8) Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.

9) Успешно пройдет реаккредитационный аудит AAALACi.

10) Проведена подготовка к ресертификации системы менеджмента Питомника для следующей области применения: «Проектирование и разработка, разведение, содержание и поставка мелких лабораторных грызунов для научных исследований и испытаний», на соответствие требованиям ISO 9001:2015.

11) Подготовлен отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте коллекции ИБХ РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

12) Сделаны предположения о развитии объекта исследования: планирование работы по поддержанию коллекции, расширению генофонда и оказанию услуг по запросам потребителя.

Таким образом, проведенная в рамках государственного задания работа позволяет решать на базе коллекции лабораторных животных SPF статуса задачи как исследовательские, так и прикладные, обеспечивая отечественных исследователей стандартизированными лабораторными животными.

Поставленные задачи выполнены в полном объеме. Результаты верифицированы экспертами AAALACi.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Каркищенко Н.Н. «Основы биомоделирования», М.: Изд-во ВПК, 2004. - 608 с.
- 2 Frank M. LaFerla and Kim N. Green «Animal Models of Alzheimer Disease» // Cold Spring Harb Perspect Med. 2012. 2(11), p. 1-13.
- 3 Shui-liang Wang, Hua Yang, You-hua Xie, Wang Yuan, Jian-zhong Li, Long Wang, Zhu-gang Wang, Ji-liang Fu. Establishment of transgenic mice carrying the gene of human nuclear receptor NR5A2(Hb1f) // World Journal of Gastroenterology. 2003. №9(6). P.1333-1336.
- 4 Jian-Zhong Li, Xia Chen, Hua Yang, Shui-Liang Wang, Hao Feng, Bao-Yu Guo, Long Yu, Zhu-Gang Wang, Ji-Liang Fu. Establishment of transgenic mice carrying the gene encoding human zinc finger protein 191 // World J Gastroenterol. 2004. 10(2). P.264-267.
- 5 Zhou FF, et al. Myostatin Gene Mutated Mice Induced with Tale Nucleases // Animal Biotechnology, 2002. 26(3). P.169-179.
- 6 Doyle A., McGarry M.P., Lee N.A., Lee J.J. The Construction of Transgenic and Gene Knockout/Knockin Mouse Models of Human Disease // Transgenic Res. 2012; 21(2): 327–349.
- 7 Bockamp E., Sprengel R., Eshkind L., Lehmann T., Braun J.M., Emmrich F., Hengstler J.G. Conditional transgenic mouse models: from the basics to genome-wide sets of knockouts and current studies of tissue regeneration // Regen Med. 2008;3(2):217-35.
- 8 Глик Б.Н. «Молекулярная биотехнология принципы и применение». 2002. 591 стр.
- 9 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NRC Press, 2011.
- 10 Directive 2010/63/eu of the european parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Official Journal of the European Union. L276 / 33-79.
- 11 Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (Вивариев) Сп 2.2.1.3218-14.
- 12 ГОСТ 33216 – 2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».
- 13 FAO: The State of the World’s Animal Genetic Resources for Food and Agriculture // FAO, 2007.
- 14 CBD. United Nations. 1992. United Nations Environment Program Convention on Biological Diversity. <http://dad.fao.org/en/refer/library/conventn/cbd.pdf>.
- 15 OECD: Biological resource centers: underpinning of the future life science and biotechnology // Paris: OECD, 2001.

16 FELASA, Recommendations of the European Laboratory Animal Science Associations «Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units», 2014.

17 ГОСТ Р 1.4-2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Стандарты организаций. Общие положения».

18 Riegman P.H., Dinjens W.N., Oomen M.N., et al., TuBaFrost 1: uniting local frozen tumour banks into European network: an overview // Eur.J.Cancer. 2006. V.42. P. 2678-2683.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Библиографический список публикаций, полученных
в результате выполнения научно-исследовательской работы

1 Минаков А.Н., Чернов А.С., Асютин Д.С., Коновалов Н.А., Телегин Г.Б. «Экспериментальное моделирование травмы спинного мозга у лабораторных крыс». Acta Nature. [принята к печати].

2 Barykin E.P., Petrushanko I.Y., Kozin S.A., Telegin G.B., Chernov A.S., Lopina O.D., Radko S.P., Mitkevich V.A., Makarov A.A. «The β -amyloid peptide “bad habits” corrected by phosphorylation: aggregation, ionic homeostasis impairment and amyloidogenicity». Отправлена в печать в Nature Communications.

3 Lomakin Y., Terekhov S., Kostin N., Kudriaeva A., Chernov A., Telegin G., Belogurov A. «Fluorescence peptide-based sensor of myelin-specific enzymatic activity». Отправлена в печать в BioNanoScience.

4 Korneev K.V., Kondakova A.N., Sviriaeva E.N., Mitkin N.A., Palmigiano A., Kruglov A.A., Telegin G.B., Drutskaya M.S., Sturiale L., Garozzo D., Nedospasov S.A., Knirel Y.A., Kupras D.V. «Reduced inflammatory response to pathogenic bacteria: moderate TLR4-mediated signaling in response to hypoacylated LPS from a foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*». Отправлена в печать в Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.

«ПАРК – МЕДИА»

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ

119901, Москва, Ленинские горы, владение 1, строение 75 "1", корпус Б
47 (495) 030-6850

Уважаемые авторы!

Настоящим подтверждением уведомляем, что статья
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРАВМЫ СПИННОГО
МОЗГА У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС
авторства А.Н. Минакова, А.С. Чернова, Д.С. Асютина, Н.А. Коновалова,
Г.Б. Телегина
принята к публикации в журнал Acta Naturae в 2018 году

Редколлегия журнала «Acta Naturae»

Главный редактор
Академик РАН



Габибов А.Г.

Главный редактор
Член-корр. РАН



Кочетков С.Н.

Рисунок А.1 – Копия письма из редакции журнала Acta Nature о принятии в печать статьи Минакова А.Н., Чернова А.С., Асютина Д.С., Коновалова Н.А., Телегина Г.Б. «Экспериментальное моделирование травмы спинного мозга у лабораторных крыс».

The β -amyloid peptide “bad habits” corrected by phosphorylation: aggregation, ionic homeostasis impairment and amyloidogenicity

Evgeny P. Barykin, Irina Y. Petrushanko, Sergey A. Kozin, Georgy B. Telegin, Alexander S. Chernov, Olga D. Lopina, Sergey P. Radko, Vladimir A. Mitkevich, Alexander A. Makarov

Abstract

The triggers of late-onset sporadic Alzheimer’s disease are still poorly understood. Impairment of protein phosphorylation with age is well-known; however, the role of this modification in β -amyloid peptide is not studied sufficiently. Here we demonstrate that phosphorylation of pathogenic β -amyloid 1-42 species at serine 8 suppresses its zinc-induced aggregation and also prevents aggregates formation in a mixture with non-modified peptide. We further show that injection of the phosphorylated β -amyloid slows senile plaques formation in transgenic mice model of the disease. Recently shown inhibition of Na,K-ATPase activity by β -amyloid, which is thought to be a major contributor to neuronal dysfunction in Alzheimer’s disease, is also rescued by phosphorylation of the peptide. Our results propose that phosphorylation of β -amyloid 1-42 is a protective mechanism against Alzheimer’s disease.

Methods

Laboratory animals

B6C3-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo mice were used at the age of 2-8 months (weight of 24–26 g). Mice were housed in the Pushchino Animal Breeding Facility (branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences), under specific pathogen free conditions. Housing and use of laboratory animals were approved by the commission IACUC, protocol № 479/15 from 16.03.15. All animal manipulations were performed according to recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NRC 2011), the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, Council of Europe (ETS 123), and “The Guidelines for Manipulations with Experimental Animals” (the decree of the Presidium of the Russian Academy of Sciences of April 02, 1980, no. 12000-496). The study was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations Program for Support of the Bioresource Collections.

Рисунок А.2 – Копия абстракта и раздела статьи со ссылкой на источник финансирования Barykin E.P., Petrushanko I.Y., Kozin S.A., Telegin G.B., Chernov A.S., Lopina O.D., Radko S.P., Mitkevich V.A., Makarov A.A. «The β -amyloid peptide “bad habits” corrected by phosphorylation: aggregation, ionic homeostasis impairment and amyloidogenicity», отправленной в печать в журнал Nature Communications.

Fluorescence peptide-based sensor of myelin-specific abzymatic activity.

Yakov Lomakin^{1,2}, Stanislav Terekhov¹, Nikita Kostin¹, Anna Kudriaeva¹, Alexander Chernov³, Georgy Telegin³ and Alexey Belogurov Jr.^{1,2,4*}

¹*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;*

²*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia;* ³*Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia;*

⁴*Moscow State University, Moscow, Russia;*

*corresponding author, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya str., 16/10, Moscow, 117997, Russian Federation

Abstract

The phenomena of natural antibodies with catalytic activity is widely studied during last few decades. These antibody-enzymes or abzymes may either protect organism or contribute to the development of the autoimmune abnormalities. Previously we showed that myelin-reactive autoantibodies from patients with multiple sclerosis (MS) had a ability to recognize and hydrolyze distinct epitopes in the myelin basic protein (MBP). Abzyme-mediated cleavage of encephalitogenic MBP peptide 81–103 flanked by two fluorescent proteins, PS-CFP2 and TurboYFP, designated EPeFRET (*Encephalitogenic Peptide Fluorescence Resonance Energy Transfer*), was shown to be a novel biomarker of MS. Here we report improved test-system based on antibody-mediated degradation of FRET substrate representing fluorophore Cy5 and quencher QXL680 interconnected by MBP peptide 81-99 – Cy5-MBP₈₁₋₉₉-QXL680. This substrate is degraded by both, purified antibodies and mononuclear cells (MNC) isolated from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in contrast to those from non-immunized mice. Data presented herein may result in elaboration of additional specific, rapid and sensitive diagnostic criteria for MS in the nearest future.

Keywords: biomarker, catalytic antibodies, B cell, myelin basic protein, Multiple Sclerosis, immunoglobulin, encephalitogenic peptide

Acknowledgements

This study was supported by Russian Science Foundation grant #17-74-30019; YL and ST received personal financial support from The Russian Foundation for Basic Research grant HP 17-04-01233 A (conjugation of fluorescent substrate). Laboratory animals used in the study were provided by the bioresource collections of IBCh, RAS, supported by the Federal Agency for Scientific Organizations program for support the bioresource collections.

Рисунок А.3 – Копия абстракта и раздела статьи со ссылкой на источник финансирования Lomakin Y., Terekhov S., Kostin N., Kudriaeva A., Chernov A., Telegin G., Belogurov A. «Fluorescence peptide-based sensor of myelin-specific abzymatic activity», отправленной в печать в журнал BioNanoScience.

Reduced inflammatory response to pathogenic bacteria: moderate TLR4-mediated signaling in response to hypoacylated LPS from a foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*

Kirill V. Korneev^{a,b}, Anna N. Kondakova^c, Ekaterina N. Sviriaeva^{a,b}, Nikita A. Mitkin^a, Angelo Palmigiano^d, Andrey A. Kruglov^{a,e,f}, Georgy B. Telegin^g, Marina S. Drutskaya^a, Luisa Sturiale^d, Domenico Garozzo^d, Sergei A. Nedospasov^{a,b,g,f}, Yuriy A. Knirel^c, Dmitry V. Kuprash^{a,b,*}

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova st. 32, Moscow 119991, Russia,

^b Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, bld 12, Moscow 119234, Russia,

^c Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky Prospect 47, Moscow 119991, Russia,

^d CNR Institute for Polymers Composites and Biomaterials, Via Paolo Gaifami 18, Catania 95126, Italy,

^e Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, bld 40, Moscow 119234, Russia,

^f German Rheumatism Research Center (DRFZ), a Leibniz Institute, Charitéplatz 1, Berlin 10117, Germany,

^g Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Prospekt Nauki 6, Pushchino 142290, Russia.

Abstract

Toll-like receptor 4 (TLR4) initiates immune response against Gram-negative bacteria upon specific recognition of lipid A moiety of lipopolysaccharide (LPS), the major component of their cell wall. Some natural differences between LPS variants in their ability to interact with TLR4 may lead to either insufficient activation that may not prevent bacterial growth, or excessive activation which may lead to septic shock. In this study, we evaluated the biological activity of LPS isolated from pathogenic strain of *Campylobacter jejuni*, the most widespread bacterial cause of foodborne diarrhea in humans. With the help of hydrophobic chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry we showed that LPS from a *C. jejuni* strain O2A consists of both hexaacyl and tetraacyl forms. Since such hypoacylation can result in a reduced immune response in humans, we assessed the activity of LPS from *C. jejuni* in mouse macrophages by measuring its capacity to activate TLR4-mediated proinflammatory cytokine production and NF- κ B-dependent reporter gene transcription. Our data support the hypothesis that LPS acylation correlates with its bioactivity.

Acknowledgements

We thank R. Zvartsev and R. Kazaryan for their technical assistance. Parts of this study were supported by grant 13-04-40269-H from Russian Foundation for Basic Research (isolation, purification and structural characterization of LPS, Fig. 1), grant 14-25-00160 from Russian Science Foundation (IL-6 mRNA and protein levels, Fig. 2, 3) and grant 16-34-01087 from Russian Foundation for Basic Research (luciferase reporter assays, Fig. 4). Laboratory animals used in the study were provided by the bioresource collections of IBCh, RAS, supported by the Federal Agency for Scientific Organizations program for support the bioresource collections.

Рисунок А.4 – Копия абстракта и раздела статьи со ссылкой на источник финансирования Korneev K.V., Kondakova A.N., Sviriaeva E.N., Mitkin N.A., Palmigiano A., Kruglov A.A, Telegin G.B., Drutskaya M.S., Sturiale L., Garozzo D., Nedospasov S.A., Knirel Y.A., Kupras D.V. «Reduced inflammatory response to pathogenic bacteria: moderate TLR4-mediated signaling in response to hypoacylated LPS from a foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*», отправленной в печать в журнал *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 1/5

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 1Р

НАЗВАНИЕ: Отбор и подготовка генетического материала
для криосохранения

ЦЕЛЬ: Определение жесткого регламента отбора самок лабораторных мышей и хомяков с целью получения от них ооцитов/эмбрионов для проведения процедуры криосохранения

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

СОСТАВИЛ: Зернов А.С.		ПРОВЕРИЛ: Миняков А.Н.		УТВЕРДИЛ: Телегин Г.Б.	
Подпись: <i>Зернов</i>		Подпись: <i>Миняков</i>		Подпись: <i>Телегин</i>	
Дата: 10.09.17		Дата: 10.09.17		Дата: 11.09.17	
Место печати: УЧТЕН. СЕКЦИЯ, №1 ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ ПОДПИСЬ	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 10.09.17
<p align="center">ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»</p>	СТРАНИЦА: 2/5
	КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 1Р

1. Охват

Данная инструкция предназначена для ветеринарного врача, научного персонала и персонала по уходу за животными.

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.
- 2.3. Институтская Программа по содержанию и использованию животных (Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН).
- 2.4. СО ПЛЖ 18-17 «Правила содержания и разведения лабораторных животных».
- 2.5. СОП № 2Р «Гормональная подготовка реципиентов при проведении криоконсервации генетических ресурсов».
- 2.6. СОП № 4У «Правила разведения лабораторных животных».
- 2.7. СОП № 4В «Клинический осмотр лабораторных мышей, крыс, хомяков».
- 2.8. СОП № 9В «Групповая и индивидуальная идентификация лабораторных животных».

3. Оборудование и средства

- 3.1. Идентификационные карточки;
- 3.2. Маркер;
- 3.3. Оборудование и материалы для содержания лабораторных грызунов (клетки, стеллажи, бутылки, подстилка, корм и пр.);
- 3.4. Средства индивидуальной защиты (шапки, маски, перчатки, комбинезоны);
- 3.5. Лабораторные мыши необходимой линии / хомяки.

4. Процедуры

4.1. Выполнение программы.

4.1.1. Формирование выборки животных для проведения процедуры криосохранения выполняет научный персонал или курирующий ветеринарный врач Питомника.

4.1.2. При проведении процедуры криосохранения эмбрионов/ооцитов используют гормонально стимулированных неполовозрелых самок, согласно СОП № 2Р и половозрелых самцов, согласно СО ПЛЖ 18-12.

4.1.3. Отбор проводят по результатам клинического осмотра, согласно СОП № 4В (выбирают клинически здоровых особей, с хорошим шерстным покровом, без внешних дефектов и повреждений, без признаков нарушения обмена веществ (ожирение, дистрофия и пр.)) и результатам лабораторного контроля состояния здоровья (мониторинг здоровья) мышей и хомяков.

4.1.4. Для проведения одного цикла работ по криосохранению ооцитов/эмбрионов отбирают не менее 10, но не более 20 самок каждого вида животных.

4.1.5. Для криосохранения допускается использовать особей, отсаженных из племенного ядра, не отходящих от общего предка более чем на 3 поколения.

4.1.6. На длительное криосохранение использовать ооциты/эмбрионы от самок-доноров I и II поколения, полученных от племенных животных коллекционного фонда. Генетический материал от III поколения использовать только для контроля условий хранения (контрольное размораживание).

Важно! Необходимо вести строгий учет генетического материала. Запрещается смешивать ооциты/эмбрионы, полученные от разных поколений животных.

4.1.7. Для длительного хранения размещают ооцитов/эмбрионов не менее:

- 250 шт для инбредной линии;
- 500 шт для аутбредной линии;

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 10.09.17
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 3/5
	КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 1Р

- 250 шт для геномодифицированной гомозиготной линии;
- 300 шт для геномодифицированной гетерозиготной линии.

4.1.8. Сначала составляют недельный график проведения работ по криосохранению генетических ресурсов Питомника, согласно Приложению 1. В таблице необходимо указать вид и название линии используемых животных, даты выполнения гормональной стимуляции, проверки копулятивных пробок и вымывания эмбрионов/ооцитов, криоконсервации.

4.2. В зависимости от генетического статуса линии (аутбредная, инбредная, геномодифицированная) формирование выборки животных для получения ооцитов/эмбрионов проводят по утвержденной схеме.

4.2.1. Формирование выборки аутбредных линий лабораторных животных

4.2.1.1. При аутбредном разведении всех животных в племенном ядре разбивают на 6 одинаковых по величине групп, согласно СО ПЛЖ 18-12

4.2.1.2. При формировании группы необходимо равномерно отобрать самок-доноров от всех шести групп племенных ядер.

4.2.1.3. Для спаривания использовать половозрелых самцов от ядер из шести групп, но отсаженных из других ядер, нежели самки-доноры. Это необходимо для того, чтобы предотвратить близкородственное скрещивание.

4.2.1.4. После использования для спаривания самцов выбраковывают.

4.2.2. Формирование выборки инбредных линий лабораторных животных

4.2.2.1. При инбредном разведении племенное ядро представляет собой группу животных, размножающихся путем моногамного скрещивания родных братьев и сестер.

4.2.2.2. При формировании группы необходимо отбирать самок-доноров, полученных от племенных ядер одной сублинии. Одновременно в ядре могут находиться на размножении животные 2-3 сублиний.

4.2.2.3. Для спаривания берут самцов-производителей из тех же племенных ядер, откуда были получены самки-доноры.

4.2.2.4. После спаривания с самками, самцов возвращают в их исходные племенные ядра.

Важно! Не допускается возвращать самца не в «домашнюю» клетку.

4.2.3. Формирование выборки геномодифицированных линий лабораторных животных

4.2.3.1. Для каждой линии геномодифицированных мышей используют гомозиготное или гетерозиготное скрещивание.

4.2.3.2. Гомозиготное скрещивание подразумевает скрещивание гомозиготы на гомозиготу. Достаточно провести генотипирование мышей при закладке ядер. В этом случае используют отсаженных из племенных ядер самок-доноров и племенных самцов, взятых из этих же ядер. Для формирования выборки использовать животных с известным генотипом.

4.2.3.3. Гетерозиготное скрещивание (для нокинных и нокаутных мышей) предполагает скрещивание гетерозиготы на гомозиготу или гетерозиготы на гетерозиготу. Выбор животных-доноров должен основываться только на результатах генотипирования, поэтому требуется рутинное генотипирование всех полученных в потомстве мышей.

4.6. Содержание самок-доноров до начала процедуры вымывания ооцитов/эмбрионов.

4.6.1. Выбранную группу самок для получения ооцитов/эмбрионов размещают в отдельной клетке.

4.6.2. На идентификационной карточке маркером написать название линии, количество животных, дату родов, номер родительской клетки, дату инъекции первого гормона. В верхнем правом углу необходимо нанести кодовую маркировку (Z), которая обозначает,

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 10.09.17
<p align="center">ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»</p>	СТРАНИЦА: 4/5
	КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 1Р

что животные из данной клетки будут использованы при криосохранении генетических ресурсов Питомника.

4.6.3. В течение всего времени нахождения животных в клетке, до момента забора ооцитов/эмбрионов, необходимо добавлять зерновую смесь «VitaCraft» и древесные волокна, а также следить за наличием воды и корма.

5. Примечания

5.1. Генетический мониторинг – долговременное слежение за состоянием популяционных генофондов вида (породы), оценка и прогнозирование их динамики во времени и пространстве, определение пределов допустимых изменений.

5.2. Генетическая изменчивость – изменчивость, обусловленная взаимодействием и различным проявлением генетических факторов. Изменчивость в генетическом составе особей между породами и видами; наследуемая генетическая изменчивость внутри и между популяциями.

5.3. Аутбредная линия животных – такие животные, которые в течение четырёх генераций размножаются в закрытом разведении в определённом количестве и по системе спаривания, позволяющей избежать близкородственного скрещивания. Ротационная система разведения позволяет получать нелинейных животных в большинстве случаев не родственных между собой, нейтрализовать отрицательные последствия фактора изоляции животных в пространстве, неизбежно связанного с клеточным содержанием. Животные в этом случае гетерозиготные.

5.4. Инбредная линия животных – такие животные, которые прошли не менее 20 поколений принудительного братско-сестринского скрещивания. На этой стадии продолжение инбридинга уже не вызывает снижения жизнеспособности, которая сохраняется на некотором константном уровне. Коэффициент инбридинга животных при этом достигает 100%, поэтому животных называют гомозиготными.

5.5. Геномодифицированная линия животных – это животные, генотип которых был искусственно изменён при помощи методов геной инженерии. Генетическая модификация отличается целенаправленным изменением генотипа организма в отличие от случайного, характерного для естественного и искусственного мутационного процесса.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 10.09.17
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 5/5 КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09 ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 1Р

Приложение 1. Таблица-график по проведению одного цикла криоконсервации

Быстрое замораживание

2017

Начало вымывания и осмотр пробок – 09:00

Дата/день Вид Линия	24.08 Чт	25.08 Пт	26.08 Сб	27.08 Вс	28.08 Пн	29.08 Вт	Примечания
мыши ВСНЕ +/- SuperOva	I гормон 10♀	-	II гормон 10♀ ссадка с ♂ 1:1	Пробки	-	Вымывание RF	Получено 30 шт 8-клеточных эмбрионов, хорошего качества

Принятые сокращения:

RF – быстрое замораживание

SuperOva – гормональная стимуляция доноров

I гормон – гормон сывороточный гонадотропин жеребых кобыл

II гормон – гормон человеческий хорионический гонадотропин

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 20.08.17
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 1/6 КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09 ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 2Р

<p>НАЗВАНИЕ: Гормональная подготовка реципиентов при проведении криоконсервации генетических ресурсов</p>				
<p>ЦЕЛЬ: Установить общую процедуру гормональной обработки самок мышей и хомяков для последующего получения ранних эмбрионов и ооцитов</p>				
<p>ОТВЕТСТВЕННОСТЬ: Ответственность за проведение данной процедуры в соответствии с требованиями данной СОП лежит на ветеринарном враче</p>				
<p>ПРЕДПИСАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ: СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЖИВОТНЫМИ. СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С КОЛЮЩЕ-РЕЖУЩИМИ ИНСТРУМЕНТАМИ</p>				
СОСТАВИЛ: Зеров А.С.	ПРОВЕРИЛ: Минаков А.Н.	УТВЕРДИЛ: Телегин Р.Б.		
Подпись: <i>Зеров</i> Дата: 20.08.17	Подпись: <i>[подпись]</i> Дата: 20.08.17	Подпись: <i>[подпись]</i> Дата: 20.08.17		
Место печати: УЧТЕН. ЭКЗЕМП. № 1 ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ ПОДПИСЬ <i>[подпись]</i>	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 20.08.17
<p align="center">ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»</p>	СТРАНИЦА: 2/6
	КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 2Р

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 Techniques and Procedures. С.А. Pekow, V. Baumans.
- 2.3. Laboratory Animal Medicine. J. G. Fox et al, 2nd edition, 2002.
- 2.4. Институтская Программа по содержанию и использованию животных (Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН).
- 2.5. СОП № 1В «Методы фиксации лабораторных мышей, крыс и хомяков».
- 2.6. СОП № 2В «Введение веществ лабораторным животным (мыши, крысы, хомяки)».
- 2.7. СОП № 7В «Эвтаназия мелких лабораторных грызунов в СО₂-боксе Bioscare».

3. Оборудование и средства

- 3.1. Гормон сывороточный гонадотропин жеребых кобыл (ГСЖК), №1, лиофилизированный, 1000 МЕ/уп;
- 3.2. Гормон человеческий хорионический гонадотропин (чХГ), №2, лиофилизированный, 1500 МЕ/уп;
- 3.3. Кожный антисептик «Sterisol»;
- 3.4. Салфетки нетканые;
- 3.5. Шприцы инсулиновые с несъемной иглой.
- 3.6. Пробирки типа Эппендорф, 1,5 мл, стерильные;
- 3.7. Штатив для пробирок типа Эппендорф;
- 3.8. Автоматическая пипетка;
- 3.9. Одноразовые наконечники на 1000 мл, стерильные;
- 3.10. Физиологический раствор;
- 3.11. Контейнер Шарпа;
- 3.12. Маркер;
- 3.13. Шкаф с ламинарным потоком воздуха;
- 3.14. Морозильная камера -20°С;
- 3.15. Средства индивидуальной защиты (шапка, маска, перчатки, халат).

4. Процедуры

4.1. Разведение и фасовка гормональных препаратов

Внимание! Разведение и фасовку гормональных препаратов проводить в продезинфицированном шкафу с ламинарным потоком воздуха с использованием средств индивидуальной защиты.

- 4.1.1. Взять ампулу с лиофилизированным ГСЖК, 1000 МЕ/уп и добавить 20 мл физиологического раствора. Тщательно перемещать с помощью автоматической пипетки. Не допускать образования пузырей в растворе.
- 4.1.2. Взять 20 пробирок и на каждой, с помощью маркера, сделать пометку «№1».
- 4.1.3. С помощью автоматической пипетки в каждую пробирку перенести по 1 мл разведенного гормона ГСЖК (50 МЕ/мл). Плотно закрыть крышку пробирки.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 20.08.17
<p align="center">ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»</p>	СТРАНИЦА: 3/6
	КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 2Р

4.1.4. Взять ампулу с лиофилизированным чХГ, 1500 МЕ/уп и добавить 20 мл физиологического раствора. Тщательно перемешать с помощью автоматической пипетки. Не допускать образования пузырей в растворе.

4.1.5. Взять 20 пробирок и на каждой, с помощью маркера, сделать пометку «№2».

4.1.6. С помощью автоматической пипетки в каждую пробирку перенести по 1 мл разведенного гормона чХГ (75 МЕ/мл). Плотно закрыть крышку пробирки.

4.1.7. Все пробирки составить в штатив и поместить в морозильную камеру. Гормон можно хранить не более 6 месяцев при температуре – 20°С.

4.1.8. Дозировка гормонов для разных видов грызунов указана в Приложении 1.

4.2. Подготовка мышей-доноров для получения ранних эмбрионов

4.2.1. Для суперовуляции использовать 2 вида гормонов: сыровоточный гонадотропин жеребых кобыл (№1) и человеческий хорионический гонадотропин (№2).

4.2.2. Взять неполовозрелых самок мышей в возрасте 4-5 недель.

4.2.3. Достать из морозильной камеры необходимое количество пробирок с ГСЖК №1.

Важно! Содержимого одной пробирки достаточно для гормональной обработки 10 мышей.

Важно! Время введения первого гормона должно быть в интервале между 15:00 и 19:00.

4.2.4. Дождаться полного размораживания содержимого пробирки и с помощью инсулинового шприца осторожно перемешать раствор гормона.

4.2.5. Инъекцию гормона №1 проводят внутривентриально в количестве 100 мкл (5 МЕ/гол), согласно СОП № 2В.

4.2.6. Зафиксировать мышшь согласно СОП № 1В, обработать область введения нетканой салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.7. Аккуратно ввести 100 мкл раствора гормона внутривентриально. Обработать место инъекции салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.8. Повторить процедуры 4.2.6 – 4.2.7. для необходимого числа мышей.

Важно! Инъекцию второго гормона чХГ выполняют спустя 45-50 часов после инъекции первого гормона ГСЖК.

4.2.9. Достать из морозильной камеры необходимое количество пробирок с чХГ №2.

Важно! Содержимого одной пробирки достаточно для гормональной обработки 10 мышей.

4.2.10. Дождаться полного размораживания содержимого пробирки и с помощью инсулинового шприца осторожно перемешать раствор гормона.

4.2.11. Инъекцию гормона №2 проводят внутривентриально в количестве 100 мкл (7,5 МЕ/гол), согласно СОП № 2В.

4.2.12. Зафиксировать мышшь согласно СОП № 1В, обработать область введения нетканой салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.13. Аккуратно ввести 100 мкл раствора гормона внутривентриально. Обработать место инъекции салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.14. Повторить процедуры 4.2.6 – 4.2.7. для необходимого числа мышей.

4.2.15. После введения второго гормона чХГ, самок ссадить с половозрелыми самцами для спаривания в соотношении 1:1.

4.2.16. На следующее утро (в период с 9:00 до 11:00) у самок, с помощью одноразового пластикового наконечника, проверить наличие копулятивной пробки – подтверждающего факта произошедшего спаривания и наступившей беременности.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 20.08.17
<p align="center">ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»</p>	СТРАНИЦА: 4/6
	КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 2Р

4.2.17. Самок с копулятивными пробками отсадить в отдельную клетку. На идентификационной карточке указать линию, количество мышей, возраст, дату обнаружения копулятивной пробки, дату вымывания эмбрионов.

Важно! 8-клеточные эмбрионы вымывают из репродуктивных органов беременных мышей спустя 72 часа после обнаружения копулятивной пробки.

4.2.18. Самок без копулятивной пробки подвергают эвтаназии, согласно СОП № 7В.

4.3. Подготовка хомяков-доноров для получения ооцитов

4.3.1. Для суперовуляции использовать 2 вида гормонов: сывороточный гонадотропин жеребых кобыл (№1) и человеческий хорионический гонадотропин (№2).

4.3.2. Взять неполовозрелых самок хомяков в возрасте 4-6 недель.

4.2.3. Достать из морозильной камеры необходимое количество пробирок с ГСЖК №1.

Важно! Содержимого одной пробирки достаточно для гормональной обработки 2 хомяков.

Важно! Время введения первого гормона должно быть в интервале между 05:00 и 08:00.

4.2.4. Дождаться полного размораживания содержимого пробирки и, с помощью инсулинового шприца, осторожно перемешать раствор гормона.

4.2.5. Инъекцию гормона №1 проводят внутрибрюшинно в количестве 500 мкл (25 МЕ/гол), согласно СОП № 2В.

4.2.6. Зафиксировать хомяка согласно СОП № 1В, обработать область введения нетканой салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.7. Аккуратно ввести 500 мкл раствора гормона внутрибрюшинно. Обработать место инъекции салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.8. Повторить процедуры 4.2.6 – 4.2.7. для необходимого числа мышей.

Важно! Инъекцию второго гормона чХГ выполняют спустя 60 часов после инъекции первого гормона ГСЖК.

4.2.9. Достать из морозильной камеры необходимое количество пробирок с чХГ №2.

Важно! Содержимого одной пробирки достаточно для гормональной обработки 2 хомяков.

4.2.10. Дождаться полного размораживания содержимого пробирки и, с помощью инсулинового шприца, осторожно перемешать раствор гормона.

4.2.11. Инъекцию гормона №2 проводят внутрибрюшинно в количестве 500 мкл (37,5 МЕ/гол), согласно СОП № 2В.

4.2.12. Зафиксировать хомяка согласно СОП № 1В, обработать область введения нетканой салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.13. Аккуратно ввести 500 мкл раствора гормона внутрибрюшинно. Обработать место инъекции салфеткой, смоченной кожным антисептиком.

4.2.14. Повторить процедуры 4.2.6 – 4.2.7. для необходимого числа хомяков.

Важно! Ооциты вымывают из репродуктивных органов хомяков спустя 16 часов после инъекции второго гормона.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 20.08.17
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	<u>СТРАНИЦА:</u> 5/6 <u>КОД:</u> 03А; 03Б; 03Г; 09 <u>ТИП ДОКУМЕНТА:</u> СОП № 2Р

5. Примечания

5.1. Не допускается при разведении и фасовке разных гормонов использовать один и тот же носик для автоматической пипетки.

5.2. При перемешивании раствора гормонов не допускать образования пузырей и вспенивания.

5.3. Вскрытые ампулы от гормонов и использованные иглы от шприцев необходимо собирать в контейнер Шарпа.

5.4. Необходимо строго соблюдать временные интервалы введения гормональных препаратов.

5.5. После размораживания неиспользованный объем гормонов необходимо выбросить. Повторное замораживание и использование запрещается!

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 20.08.17
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 6/6
	КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 2Р

Приложение 1. Таблица дозировки гормональных препаратов

Вид животного	ГСЖК, №1 МЕ / гол	чХГ, №2 МЕ / гол
мышь	5	7,5
хомяк	25	37,5

**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: Зиринов А.С.		ПРОВЕРИЛ: Минамов А.И.		УТВЕРДИЛ: Телегин Р.Б.	
Подпись: <i>Зиринов</i> Дата: 25.08.17		Подпись: <i>[подпись]</i> Дата: 26.08.17		Подпись: <i>[подпись]</i> Дата: 27.08.17	
Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:
УЧТЕН. БЕЗДВИЖ. № 1 ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ ГОРДИНОВ					

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 25.08.17
<p align="center">ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»</p>	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. С.А. 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 проведение криоконсервации генетических ресурсов».
- 2.8. СОП №2Х «Общие принципы хирургии лабораторных грызунов».
- 2.9. СОП № 3Х «Эвтаназия мелких лабораторных грызунов с использованием двуоксида углерода (СО₂)».
- 2.10. СОП № 7В «Эвтаназия мелких лабораторных грызунов в СО₂-боксе Bioscape».

3. Оборудование и средства

- 3.1. Биноклярная лупа (Olympus);
- 3.2. Автоматический СО₂ инкубатор (NU-5510 E, Nuair);
- 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 М2 (Sigma);
- 3.20. Среда культуральная М16 (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.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 25.08.17
<p align="center">ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»</p>	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).

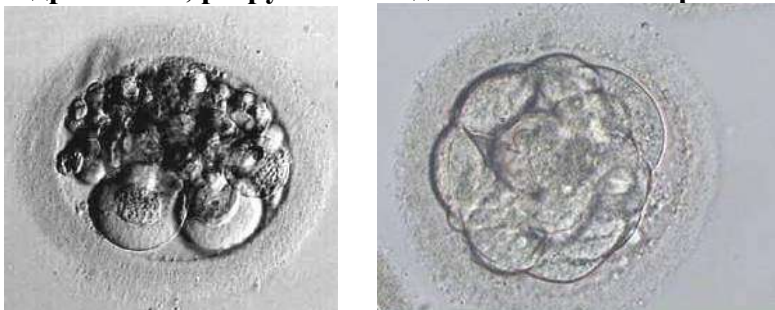
4.1.13. В инсулиновый шприц с иглой (29G) набрать 0,5 мл фосфатно-солевого буфера комнатной температуры.

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.

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% CO₂, 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, выключившаяся)

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).

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 25.08.17
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 (СО₂)».

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-кумуляусные 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 М2, 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

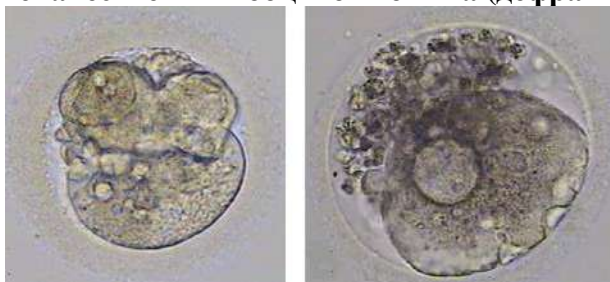
КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

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.

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 1/12

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 4Р

НАЗВАНИЕ: Замораживание ооцитов/ранних эмбрионов при
сохранении генетических ресурсов

ЦЕЛЬ: Установить общую процедуру быстрого замораживания ранних эмбрионов мышей и программного замораживания ооцитов хомяков для сохранения генетических ресурсов Питомника

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 КОЛЮЩЕ-РЕЖУЩИМИ ИНСТРУМЕНТАМИ.

СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЖИДКИМ АЗОТОМ

СОСТАВИЛ:

Сернов А.С.

ПРОВЕРИЛ:

Минянов А.И.

УТВЕРДИЛ:

Телегин Р.Б.

Подпись:

Сернов

Подпись:

Минянов

Подпись:

Телегин

Дата:

29.08.17

Дата:

29.08.17

Дата:

30.08.17

Место печати:

Место печати:

Место печати:

Место печати:

Место печати:

УЧТЕН. ОБЪЕМ. № 1
ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ
ТОЛАНОВ Сернов

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 29.08.17
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 2/12
	КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 4Р

1. Охват

Данная инструкция предназначена для 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.
- 2.3. Common Nonsurgical Techniques and Procedures. C.A. Pekow, V. Baumans. Laboratory Animal Medicine. J. G. Fox et al, 2nd edition, 2002.
- 2.4. Nuno Costa-Borges, Sheyla González, Elena Ibáñez, Josep Santaló «Collection and cryopreservation of hamster oocytes and mouse embryos». Journal of Visualized Experiments (25), e1120, doi:10.3791/1120 (2009).
- 2.5. Khromenkova O.B., Zhernoklev G.V., Zhegunov G.V., Grischenko V.I. «The incidence of mitotic abnormalities in cryopreserved eight-cell early and compacted mouse embryos». Cryo Letters. 2003;24(1):27-32.
- 2.6. Инструкция пользователя для программного замораживателя «BioCool-II, FTS».
- 2.7. СОП № 3Р «Вымывание ооцитов/ранних эмбрионов при проведении криоконсервации генетических ресурсов».
- 2.8. СОП № 3Х «Эвтаназия мелких лабораторных грызунов с использованием двуокси углерода (СО₂)».
- 2.9. СОП №18Т «Установка и использование весов электронных прецизионных «Sartorius Laboratory ED 3202S-OCE, -RCE» с принтером данных YDP-20-OCE».

3. Оборудование и средства

- 3.1. Шкаф с ламинарным потоком воздуха;
- 3.2. Автоматический СО₂ инкубатор (NU-5510 E, Nuaire);
- 3.3. Биноклярная лупа (Olympus);
- 3.4. Микропипетка-стриппер (Stripper MXL3-STR, MidAtlantic Diagnostics);
- 3.5. Автоматическая пипетка (ER-200, Eppendorph);
- 3.6. Автоматическая пипетка (ER-1000, Eppendorph);
- 3.7. Прецизионные лабораторные весы (Sartorius);
- 3.8. Сосуд Дьюара с жидким азотом;
- 3.9. Криоперчатки, криофартук, защитные очки;
- 3.10. Криолинейка;
- 3.11. Система контроля уровня жидкого азота в криохранилище (Thermo);
- 3.12. Чашка Петри 35 мм (ПанЭко);
- 3.13. 4-луночный планшет (Nunc);
- 3.14. Одноразовые пластиковые носики для автоматической пипетки;
- 3.15. Криопаетки (BioCane);
- 3.16.



3.17. Алюминиевые держатели для паеток (гоблет);



3.18. Маркер криоустойчивый для записи;

3.19. Дюльбеко фосфатно-солевой буфер, ДФСБ (Sigma);

3.20. Бычий сывороточный альбумин, БСА (Sigma);

3.21. Глицерин, >99% (Sigma);

3.22. Пропиленгликоль (1,2- пропандиол), >99% (Sigma);

3.23. Сахароза, >99% (Sigma);

3.24. Среда культуральная M2 (Sigma);

3.25. Дезинфектант «Клиндезин спрей»;

3.26. Электронный таймер;

3.27. Этанол, 96%;

3.28. Программный замораживатель (BioCool-II, FTS), состоящий из блока управления и блока замораживания;



4. Процедуры

Внимание! Приготовление стоковых растворов криопротекторов необходимо выполнять только в шкафу с ламинарным потоком воздуха, за день до замораживания, и тщательно перемешивать. Остатки растворов к повторному использованию не пригодны.

Важно! Взвешивание сухих компонентов растворов криопротекторов необходимо проводить с использованием прецизионных лабораторных весов согласно СОП № 18Т.

4.1. Подготовка растворов криопротекторов для быстрого замораживания 8-клеточных эмбрионов мышей

4.1.1. Приготовить 4 раствора:

1 раствор: 5% раствор БСА в ДФСБ. На весах необходимо отвесить 1г сухого альбумина. Перенести в 50мл пробирку и растворить его в 20мл ДФСБ.

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 4/12

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 4Р

2 раствор: 12% раствор глицерина в ДФСБ с 5% БСА. На 1мл готового раствора необходимо взять 870мкл 1 раствора и 120мкл чистого глицерина. Тщательно перемешать.

3 раствор: 1М раствор сахарозы в ДФСБ с 5% БСА. На весах необходимо отвесить 3,42г сахарозы. Перенести в 15мл пробирку и растворить её в 10мл 1 раствора. Тщательно перемешать.

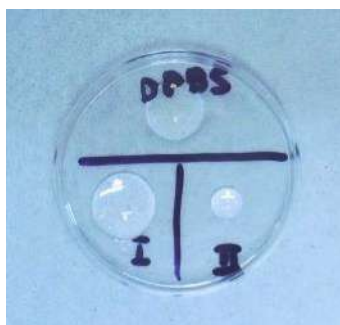
4 раствор: 30% раствор глицерина в 1М растворе сахарозы в ДФСБ с 5% БСА. На 1мл готового раствора необходимо взять 700мкл 3 раствора и растворить в нем 300мкл глицерина.

4.2. Быстрое замораживание 8-клеточных эмбрионов мышей

Важно! Для точного отсчета времени, при нахождении эмбрионов в растворах криопротекторов, необходимо использовать электронный таймер.

Важно! Все процедуры выполнять при комнатной температуре. Все используемые в работе среды и растворы криопротекторов должны быть комнатной температуры.

4.2.1. С помощью маркера разметить чашку Петри на 3 части: ДФБС(DPBS), **I**, **II**. В область ДФБС(DPBS) налить 0,5мл 1 раствора, в область **I** – 0,5мл 2 раствора, в область **II** – 60мкл 4 раствора.

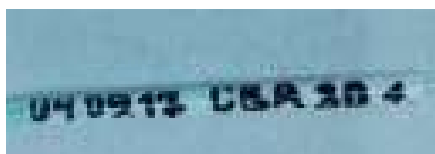


4.2.2. С помощью микропипетки «Stripper» собрать хорошие эмбрионы, подготовленные в соответствии с СОП № 3Р, и перенести на 10 минут в размеченную чашку Петри в область ДФБС(DPBS) с 1 раствором.

4.2.3. Спустя указанное время все эмбрионы (в минимальном количестве раствора) необходимо перенести в область **I** со 2 раствором на 10 минут.

4.2.4. Необходимо визуально оценить эмбрионы: при нормальном протекании процесса их наполнения криопротектором наблюдается постепенное сжатие blastomeres (более плотная компоновка), после чего они восстанавливают свою исходную форму.

4.2.5. Пока эмбрионы находятся во 2 растворе, необходимо приготовить криопаетку для замораживания. С помощью криоустойчивого маркера на жакете криопаетки записать дату замораживания, линию, количество эмбрионов, порядковый номер криопаетки. Эти же сведения необходимо внести в таблицу (см. Приложение 1).



4.2.6. Присоединить криопаетку к шприцу и набрать 80мкл 4 раствора, затем набрать столбик воздуха и отложить паетку в сторону, не отсоединяя шприц.

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 5/12

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 4Р



4.2.7. С одной стороны криопакетка закрыта запирающим фильтром, который, при его смачивании 4 раствором, образует плотную пробку.

Важно! На данном этапе работы 4 раствор в пакетке не должен доходить до запирающего фильтра.

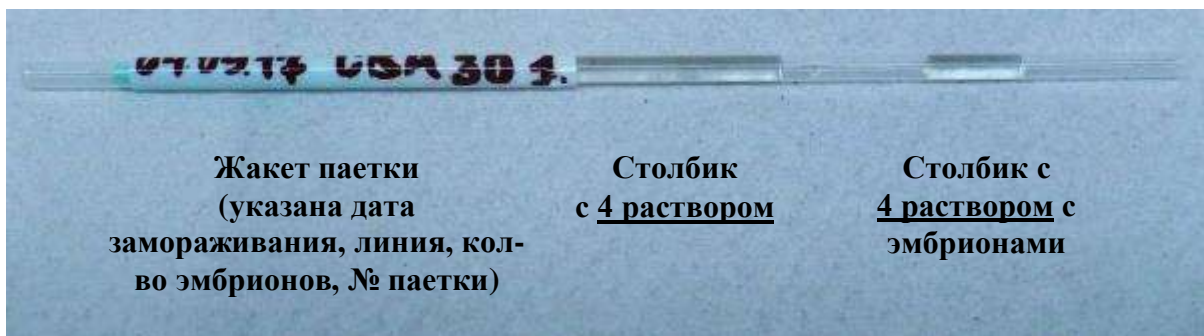
4.2.8. По истечению 10 минут эмбрионы из 2 раствора (в минимальном количестве раствора) с помощью микропипетки «Stripper» перенести в размеченную область II с 4 раствором.

4.2.9. С помощью электронного таймера засечь 1,5 минуты.

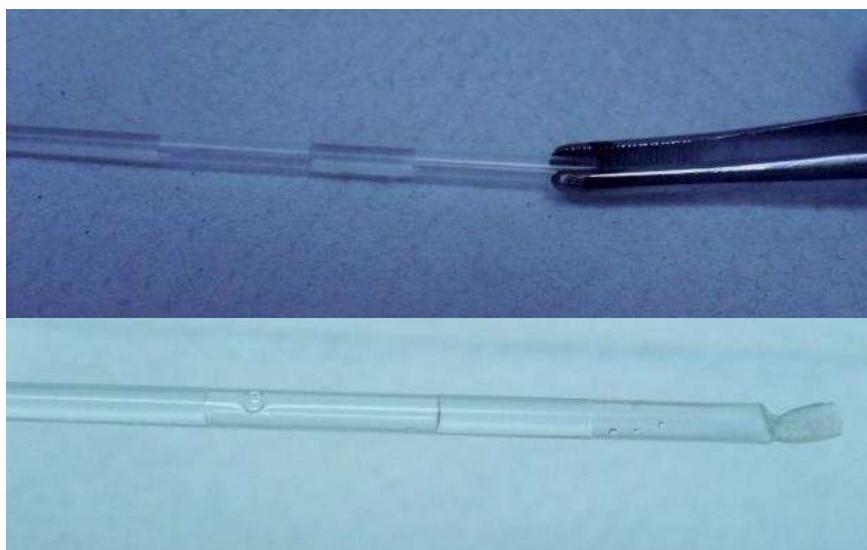
4.2.10. Сразу же после этого взять пакетку с присоединенным шприцем и втянуть внутрь 60 мкл 4 раствора с эмбрионами. При этом столбик с 4 раствором в пакетке должен смочить запирающий фильтр.

4.2.10. Осторожно отсоединить шприц от пакетки.

Важно! Столбик с 4 раствором и эмбрионами в пакетке должен сохранять целостность, не содержать воздушных пузырей.



4.2.11. Со стороны внесения эмбрионов в криопакетку сделать запайку с помощью разогретого до 250°C пинцета, предварительно бумажной салфеткой очистив кончик криопакетки от излишков криоконсервирующих растворов (запайка препятствует проникновению азота в криопакетку и вытеканию среды с эмбрионами).



4.2.12. По истечению 1,5 минут криопаетку с эмбрионами мгновенно погрузить в емкость для паёток, закрепленную на алюминиевом держателе (гоблет), заполненную жидким азотом.



Паетка с эмбрионами

Алюминевый держатель (гоблет)
с емкостью для паёток

Жидкий азот

4.2.13. Перенести емкость с паёткой в дьюар с жидким азотом.

Внимание! Общее время на выполнение пунктов 4.2.8. – 4.2.12. не должно превышать 1,5 минут.

Внимание! Криопаетки с эмбрионами должны храниться в толще жидкого азота, а не в парах.

4.2.14. Сделать соответствующие записи в таблице учета и движения генетического материала (Приложение 2).

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 7/12

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 4Р

4.3. Подготовка растворов криопротекторов для программного замораживания ооцитов хомяков

4.3.1. Приготовить 2 раствора:

1 раствор: 12% раствор пропиленгликоля в ДФБС. В 15 мл пробирку добавить 5 мл ДФБС и добавить 570 мкл пропиленгликоля. Тщательно перемешать.

2 раствор: 2М раствор сахарозы в 12% растворе пропиленгликоля. На весах необходимо отвесить 68,4 мг сахарозы. Перенести в 15 мл пробирку и растворить в 2 мл 1 раствора. Тщательно перемешать.

4.4. Программное замораживание ооцитов хомяков

4.4.1. Залить в резервуар программного замораживателя 96% этиловый спирт до отметки.

4.4.2. Включить тумблер блока управления и блока замораживания в положение «I» (на рисунке отмечены желтыми стрелками).



4.4.3. Согласно пользовательской инструкции запустить программу для медленного замораживания ооцитов.

Алгоритм программы: понижение с комнатной температуры до +4°C с шагом 3°C/мин; выдержка при температуре +4°C в течение 10 мин; далее понижение температуры до минус 20°C с шагом 1°C/мин; выдержка при температуре минус 20°C в течение 5 минут; далее понижение температуры до минус 40°C с шагом 1°C/мин и поддержание установившейся температуры в течение 2 часов.

4.4.4. Взять чашку Петри и с помощью маркера разделить ее на две зоны: I и II. С помощью автоматической пипетки в зону I налить 150 мкл 1 раствора, а в зону II – несколько капель по 50 мкл со 2 раствором.

4.4.5. Используя микропипетку «Stripper» собрать хорошие ооциты, подготовленные в соответствии с СОП № 3Р, и перенести на 10 минут в чашку Петри в каплю с 1 раствором.

4.4.6. Пока эмбрионы находятся в 1 растворе, необходимо приготовить криопаетку для замораживания. С помощью криоустойчивого маркера на жакете криопаетки записать дату замораживания, линию, количество ооцитов, порядковый номер криопаетки. Эти же сведения необходимо внести в таблицу (см. Приложение 1).

4.4.7. Присоединить криопаетку к шприцу и набрать 60 мкл 1 раствора, затем набрать столбик воздуха и отложить папку в сторону, не отсоединяя шприц.

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 8/12

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 4Р

4.4.8. С одной стороны криопаяетка закрыта запирающим фильтром, который при его смачивании 1 раствором образует плотную пробку.

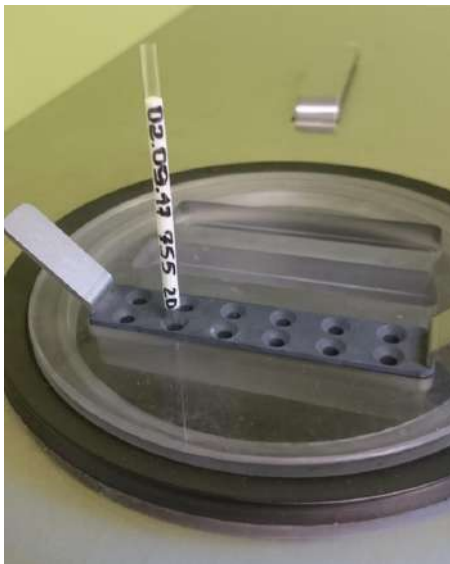
Важно! На данном этапе работы 1 раствор в паяетке не должен доходить до запирающего фильтра.

4.4.9. По истечению 10 минут ооциты из 1 раствора (в минимальном количестве раствора) с помощью микропипетки «Stripper» перенести в каплю со 2 раствором.

4.4.10. Взять паяетку с присоединенным шприцем и втянуть внутрь 50 мкл 2 раствора с ооцитами. При этом 1 раствор в паяетке должен смочить запирающий фильтр.

4.4.11. Со стороны внесения ооцитов в криопаяетку сделать запайку с помощью разогретого до 250°C пинцета, предварительно бумажной салфеткой очистив кончик криопаяетки от излишков криоконсервирующих растворов.

4.4.12. Поместить запаянную паяетку с ооцитами в держатель программного замораживателя.



4.4.13. Запустить программу замораживания, последовательно нажав на лицевой панели блока управления сперва кнопку «Remote», а затем кнопку «Run».



4.4.13. Когда цикл программы дойдет до стадии «выдержка при температуре минус 20°C в течение 5 минут» необходимо сделать «сидинг» - принудительное инициирование процесса замерзания криораствора в паяетке.

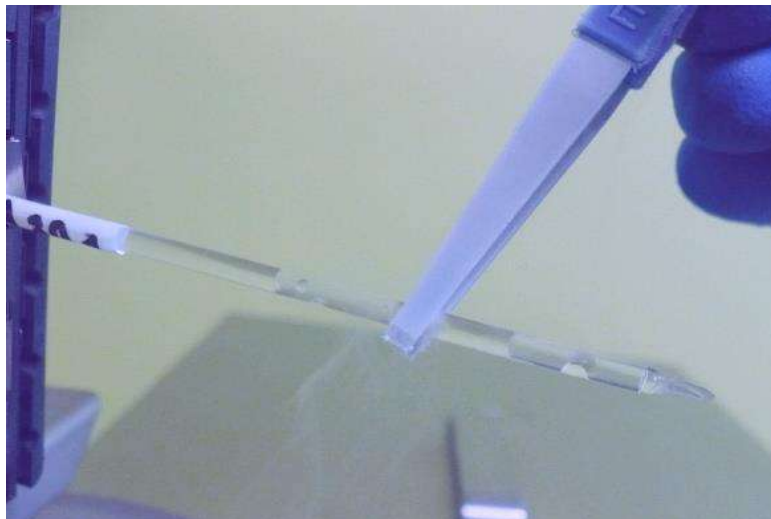
ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 9/12

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 4Р

4.4.14. Используя пинцет, предварительно охлажденный в жидком азоте до прекращения интенсивного процесса кипения жидкого азота, необходимо запустить процесс замерзания 2 раствора с эмбрионами в паетке, для чего нужно достать паетку из держателя и пинцетом обхватить стенки паетки на уровне верхнего края столбика со 2 раствором и эмбрионами.



4.4.14. При этом внутри паетки хорошо будет визуализироваться процесс замерзания раствора.

4.4.15. После полного замерзания столбика со 2 раствором и эмбрионами, поместить паетку обратно в держатель программного замораживателя.

4.4.15. При достижении температуры в замораживателе минус 40°C, паетку с эмбрионами нужно быстро перенести в емкость для паеток, заполненную жидким азотом, закрепленную на алюминиевом держателе (гоблете).

Внимание! Во время процедуры необходимо использовать защитные очки, криоперчатки и криофартук.

4.4.16. Выключить программный замораживатель и, с помощью большого шприца, удалить спирт из резервуара замораживателя.

4.5. Температурный контроль при хранении

4.5.1. Для контроля уровня жидкого азота в криохранилище используют систему с термочувствительным датчиком, настроенным на температуру минус 196°C. При падении уровня азота в результате его естественного испарения и при нахождении датчика в парах азота (температура которых значительно выше температуры жидкого азота), происходит срабатывание аварийных сигнализаций контроллера. Необходимо незамедлительно принять меры по устранению этой внештатной ситуации (провести доливку азота в хранилище).

4.5.2. Во избежание подобных аварийных ситуаций, доливать азот в криохранилище необходимо не реже 1 раза в 15 дней.

4.5.3. Уровень жидкого азота в заправочных дюарах контролируют с помощью криолинейки.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 29.08.17
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	<u>СТРАНИЦА:</u> 10/12
	<u>КОД:</u> 03А; 03Б; 03Г; 09
	<u>ТИП ДОКУМЕНТА:</u> СОП № 4Р

5. Примечания

5.1. Генетический материал одного вида (полученный от одной линии животных) размещают на хранение в два физически разделенных криохранилища, для повышения сохранности на случай непредвиденных внештатных ситуаций.

5.2. При криоконсервации генетического материала, для каждой партии замороженных эмбрионов/ооцитов, делают дополнительно контрольную паетку, содержащую 12-15 эмбрионов/ооцитов, которая выступает индикатором соблюдения условий хранения.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 29.08.17
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 11/12 КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09 ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 4Р

Приложение 1.

Таблица размещения криопаеток с эмбрионами в криохранилище BioCane 73

№ гобле та	Стакан № (цвет:)				Расход / дата	Примечания
	цвет/ пп№	Дата заморажива ния	Линия	Кол-во эмбрионов		

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 29.08.17
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 12/12
	КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 4Р

Приложение 2. Таблица учета и движения генетического материала.

ДОНОРЫ _____ (____) S_____				РЕЦИПИЕНТЫ Дата _____				Примечания	Результат ЭТ				
ЕТ-FT _____ Дата _____				Синхронизация: _____									
Эмбрионы до заморозки		Код паетки (кол-во эмбр-ов)	Эмбрионы после размораживания		№ операции	Линия	Место ЭТ	ЭТ					
OVA	Норма		Кол-во	Норма				Яичник	Супраренин	Матка	Общее качество		
		_____/1 ()			1		ЛР / ЛЯ						
		_____/2 ()			2		ЛР / ЛЯ						
		_____/3 ()			3		ЛР / ЛЯ						
							ПР / ПЯ						
							ПР / ПЯ						
							ПР / ПЯ						

- OVA** – дается общее количество вымытых эмбрионов. **Норма** – Общее количество эмбрионов находящихся на соответствующей стадии развития.
- Код паетки (кол-во эмбр-ов)** – пишется код, соответствующий записи в тетради (ком. 208) и количество эмбрионов в каждой паетке.
- Кол-во** – указывается, сколько эмбрионов осталось после процедуры размораживания. **Норма** – сколько эмбрионов достигли стадии бластоцисты (в случае с культивированием) или сколько нормальных 8-клеточных эмбрионов было после разморозки (без культивирования).
- Место ЭТ** – ЛР, ПР – левый, правый рог, ЛЯ, ПЯ – левый, правый яйцевод (ненужное вычеркнуть).
- Эмбрионы** - например (**ЕТ-FT6 -8к-5**) – означает, что пересажено 6 шт, 8кл. заморожено –оттаянных эмбриона, отличного качества.
- Яичник, Матка** - дается оценка для каждого пункта по 5-ти бальной шкале.
- Супраренин** – использовали (+) или не использовали (-).
- Общее качество ЭТ** – если стриппер вошел плавно и столбик с эмбрионами выдавился беспрепятственно – 5, далее по убыванию.
- Синхронизация - - например: «4 /3» – означает, что у Д - 4-й день эструса, а у Р – 3-й. ЭТ асинхронно с отставанием 1 день.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 29.08.17
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	<u>СТРАНИЦА:</u> 13/12
	<u>КОД:</u> 03А; 03Б; 03Г; 09
	<u>ТИП ДОКУМЕНТА:</u> СОП № 4Р

Принятые сокращения: **ET-FT** – пересадка заморожено –оттаянных эмбрионов. **ET-FTС** – пересадка заморожено –оттаянных и культивированных эмбрионов. **RF** – быстрое замораживание. **S + / S –** - эмбрионы полученные после суперовуляторной обработки (*описать подробно на обратной стороне листа*) или БЕЗ суперовуляции.

Конфиденциальный документ		Дата последней коррекции: 04.12.17	
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»		СТРАНИЦА: 1/6	
		КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09	
		ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 5Р	

<u>НАЗВАНИЕ:</u> Размораживание ооцитов/ранних эмбрионов				
<u>ЦЕЛЬ:</u> Установить общую процедуру размораживания и проведения оценки качества ранних эмбрионов мышей и ооцитов хомяков после криоконсервации				
<u>ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:</u> Ответственность за проведение данной процедуры в соответствии с требованиями данной СОП лежит на ветеринарном враче				
<u>ПРЕДПИСАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ:</u> СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С КОЛЮЩЕ-РЕЖУЩИМИ ИНСТРУМЕНТАМИ. СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЖИДКИМ АЗОТОМ.				
СОСТАВИЛ: Зернов А.С.		ПРОВЕРИЛ: Минаев А.И.		УТВЕРДИЛ: Ткаченко Р.Б.
Подпись: <i>Зернов</i>		Подпись: <i>[подпись]</i>		Подпись: <i>[подпись]</i>
Дата: 04.12.17		Дата: 04.12.17		Дата: 04.12.17
Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:
УЧЕТН. ОБЪЕКТ. № 1 ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ ПОДПИСЬ <i>Зернов</i>				

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

СТРАНИЦА: 2/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 5Р

1. Охват

Данная инструкция предназначена для ветеринарного врача и научного персонала.

2. Ссылки

- 2.1. Common Nonsurgical Techniques and Procedures. C.A. Pekow, V. Baumans. Laboratory Animal Medicine. J. G. Fox et al, 2nd edition, 2002.
- 2.2. Nuno Costa-Borges, Sheyla González, Elena Ibáñez, Josep Santaló «Collection and cryopreservation of hamster oocytes and mouse embryos». Journal of Visualized Experiments (25), e1120, doi:10.3791/1120 (2009).
- 2.3. Khromenkova O.B., Zhernoklev G.V., Zhegunov G.V., Grischenko V.I. «The incidence of mitotic abnormalities in cryopreserved eight-cell early and compacted mouse embryos». Cryo Letters. 2003;24(1):27-32.
- 2.4. Лабораторный протокол «Hamster oocyte/Mouse embryos slow freezing and thawing», Embryotools, updated: 19.02.2014.
- 2.5. СОП №4Р «Замораживание ооцитов/ранних эмбрионов при сохранении генетических ресурсов».
- 2.6. СОП №6Р «Трансплантация заморожено - оттаянных эмбрионов самкам-реципиентам».
- 2.7. СОП №18Т «Установка и использование весов электронных прецизионных «Sartorius Laboratory ED 3202S-OCE, -RCE» с принтером данных YDP-20-OCE».

3. Оборудование и средства

- 3.1. Шкаф с ламинарным потоком воздуха;
- 3.2. Автоматический CO₂ инкубатор (Nuair);
- 3.3. Стереомикроскоп (Leica);
- 3.4. Микропипетка стриппер (Stripper MXL3-STR, MidAtlantic Diagnostics);
- 3.5. Прецизионные лабораторные весы (Sartorius);
- 3.6. Криобанк с жидким азотом;
- 3.7. Одноразовые стерильные капилляры для микропипетки стриппер (Ø 200 мкм);
- 3.8. Автоматическая пипетка (ER-200, Eppendorph);
- 3.9. Автоматическая пипетка (ER-1000, Eppendorph);
- 3.10. Шприц стерильный, 2мл (SFM);
- 3.11. Чашка Петри 35 мм (ПанЭко);
- 3.12. 4-луночный планшет (Nunc);
- 3.13. Пробирки центрифужные 15 мл (Corning);
- 3.14. Пробирки центрифужные 50 мл (Corning);
- 3.15. Микропробирки типа Эппендорф 1,5 мл (Eppendorph);
- 3.16. Одноразовые пластиковые носики для автоматической пипетки 200 мкл;
- 3.17. Одноразовые пластиковые носики для автоматической пипетки 1000 мкл;
- 3.18. Дюльбеко фосфатно-солевой буфер, ДФСБ (Sigma);
- 3.19. Бычий сывороточный альбумин, БСА (Sigma);
- 3.20. Сахароза (Sigma);
- 3.21. Среда культуральная M2 (Sigma);
- 3.22. Среда культуральная M16 (Sigma);
- 3.23. Дезинфицирующие салфетки «Лизаксин»;
- 3.24. Электронный таймер;
- 3.25. Одноразовые лезвия;
- 3.26. Контейнер Шарпа.

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 3/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 5Р

4. Процедуры

4.1. Подготовка раствора для размораживания 8-клеточных эмбрионов мышей

4.1.1. Приготовить растворы №1 и №3 согласно п. 4.1. СОП № 4Р.

Важно! Взвешивание сухих компонентов для приготовления растворов проводить с использованием прецизионных лабораторных весов согласно СОП № 18Т.

4.2. Размораживание ранних эмбрионов

4.2.1. В микропробирке приготовить 0,5М раствор сахарозы в ДФСБ с 5% БСА. Для этого необходимо тщательно смешать по 0,5мл **раствора №3** и **раствора №1** с помощью автоматической пипетки.

4.2.2. В центр чашки Петри налить 0,5мл 0,5М раствора сахарозы в ДФСБ с 5% БСА.

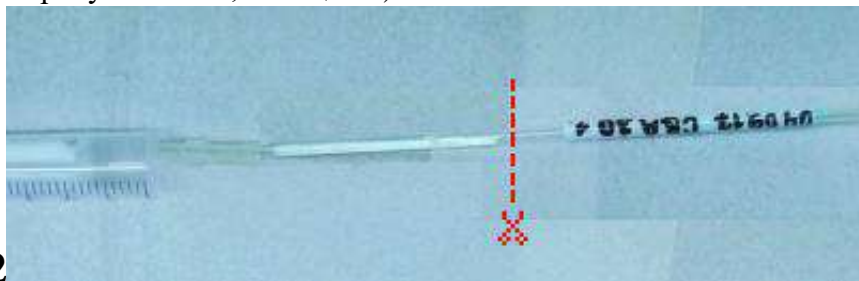
4.2.3. Достать криопаетку с эмбрионами из криобанка с жидким азотом, на 30 сек погрузить в водяную баню, а после обработать снаружи дезинфицирующими салфетками.

4.2.4. С помощью одноразового лезвия отсечь край паетки со стороны запайки (см. рисунок ниже, позиция 1).



1

4.2.5. Присоединить криопаетку к шприцу, используя силиконовый переходник. После чего отсечь противоположный край паетки на расстоянии не менее 1 см от столбика с эмбрионами (см. рисунок ниже, позиция 2).

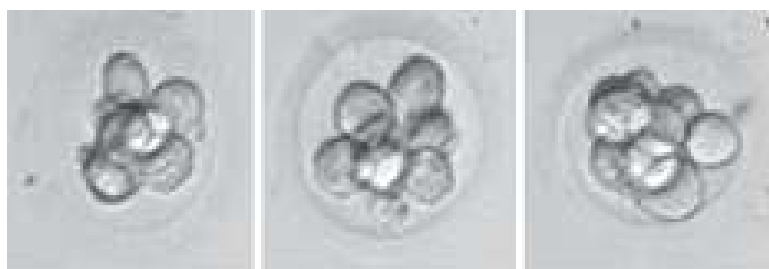


2

4.2.6. Осторожно, с помощью шприца вытолкнуть столбик с эмбрионами в чашку Петри с 0,5М раствором сахарозы в ДФСБ с 5% БСА и оставить на 10 минут.

Важно! Для точного отсчета времени нахождения эмбрионов в растворе, необходимо использовать электронный таймер.

4.2.7. Используя стереомикроскоп, оценить состояние эмбрионов (увел. х60). При нахождении в 0,5М растворе сахарозы в ДФСБ с 5% БСА, они должны сжаться и приобрести более плотную компоновку blastomerov (см. рисунок ниже).



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

СТРАНИЦА: 4/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 5Р

4.2.8. Спустя 10 минут, в центр чашки Петри налить 0,5мл **раствора №1**, и с помощью микропипетки эмбрионы перенести из 0,5М раствор сахарозы в ДФСБ с 5% БСА в **раствор №1**.

4.2.9. Используя стереомикроскоп оценить состояние эмбрионов (увел. х60). Эмбрионы постепенно приобретают нормальную форму, бластомеры расправляются и становятся правильной круглой формы, возвращаясь к первоначальному состоянию (см. рисунок ниже).



4.2.10. Затем эмбрионы трижды промыть в **растворе №1** и перенести в 4-луночную чашку с культуральной средой М2.

4.2.11. Перед трансплантацией размороженные эмбрионы необходимо культивировать в СО₂-инкубаторе (при 37°C и 5% СО₂) в течение 2 суток до достижения ими стадии бластоцисты – конечной стадии доимплантационного развития.

4.2.12. С помощью микропипетки перенести эмбрионы в 4-луночную чашку в среду М16 и убрать в СО₂-инкубатор.

4.2.13. Спустя 48 часов культивирования эмбрионов в СО₂-инкубаторе, до начала трансплантации, необходимо оценить качество развившихся бластоцист (см. рисунок ниже).

Внимание! Бластоцисты с нарушением морфологии для трансплантации не использовать!

4.2.14. После проведения процедуры трансплантации (согласно СОП №6Р) необходимо сделать соответствующие записи о размороженных эмбрионах (количество, качество) в «Таблице учета и движения генетического материала» (СОП №4Р, Приложение 2).

4.2.15. Сделать отметку об использовании паетки с эмбрионами в «Таблице размещения криопаеток с эмбрионами в криохранилище BioCane 73» (СОП №4Р, Приложение 1).

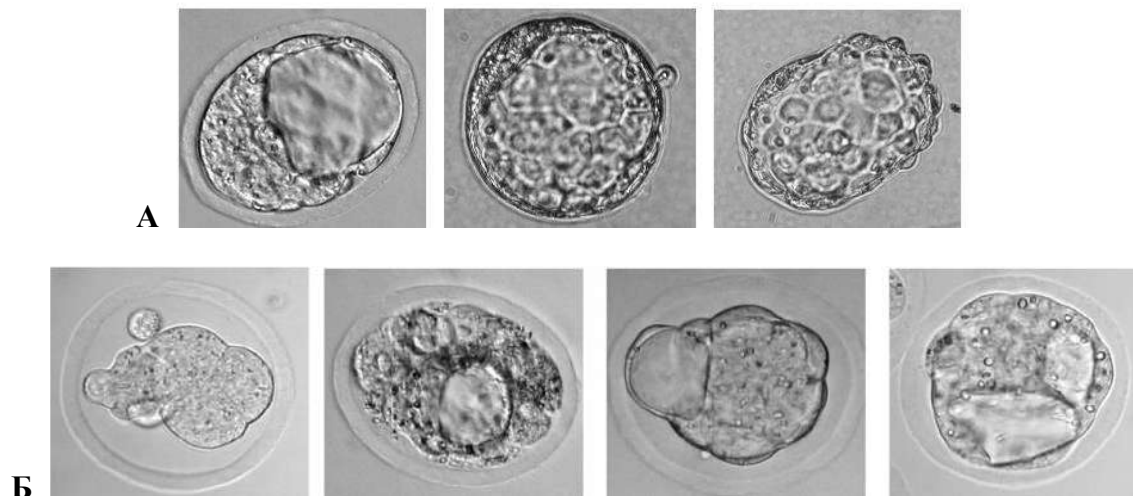
Важно! Если размораживание делают с целью проведения контроля за соблюдением условий криоконсервации и сохранности эмбрионов в криобанке (согласно п.5.2. СОП №4Р), то проводят только культивирование эмбрионов в СО₂-инкубатор.

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

СТРАНИЦА: 5/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 5Р



Оценка морфологии размороженных эмбрионов мыши развившихся до стадии бластоцисты после 48 часов культивирования

А – нормальные бластоцисты (средняя, поздняя, выклюнувшаяся), пригодны для трансплантации.

Б – аномальные бластоцисты (нарушение компактизации и кавитации, деградация клеток ВКМ, двойная область закладки бластоцеля), не пригодны для трансплантации.

4.3. Подготовка раствора для размораживания ооцитов хомяков

4.3.1. На весах отмерить 205,2 мг сахарозы. Перенести в 15мл пробирку и растворить её в 2мл ДФСБ. Тщательно перемешать.

Важно! Взвешивание сухих компонентов для приготовления раствора проводить с использованием прецизионных лабораторных весов согласно СОП № 18Т.

4.4. Размораживание ооцитов хомяков

4.4.1. В центр чашки Петри налить с помощью автоматической пипетки 0,5 мл готового раствора для размораживания.

4.4.2. Достать криопаетку с эмбрионами из криобанка с жидким азотом, на 30 сек погрузить в водяную баню, а после обработать снаружи дезинфицирующими салфетками.

4.4.3. С помощью одноразового лезвия отсечь край паетки со стороны запайки (выполнить по аналогии с паетками для эмбрионов, п.п. 4.2.4.-4.2.5. настоящей СОП).

4.4.4. Присоединить криопаетку к шприцу, используя силиконовый переходник. После чего отсечь противоположный край паетки на расстоянии не менее 1 см от столбика с ооцитами.

4.4.5. Осторожно, при помощи шприца вытолкнуть столбик с ооцитами в чашку Петри с раствором для размораживания и оставить на 10 минут.

Важно! Для точного отсчета времени нахождения эмбрионов в растворе, необходимо использовать электронный таймер.

4.4.6. С помощью стереомикроскопа оценить состояние ооцитов (увел. х60). При нахождении в растворе для размораживания, они должны сжаться и приобрести более плотную компоновку (см. ниже, рисунок А).

4.4.7. Спустя 10 минут, в одну лунку 4-луночного планшета налить 0,5мл культуральной среды М2, и, с помощью микропипетки, перенести в нее ооциты. Убрать в термостат с температурой 37°C на 5 минут.

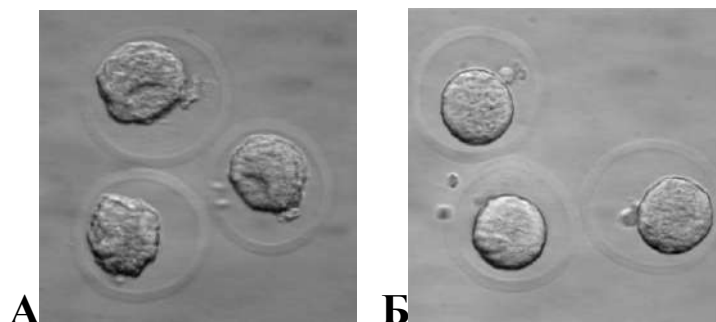
**ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»**

СТРАНИЦА: 6/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 09

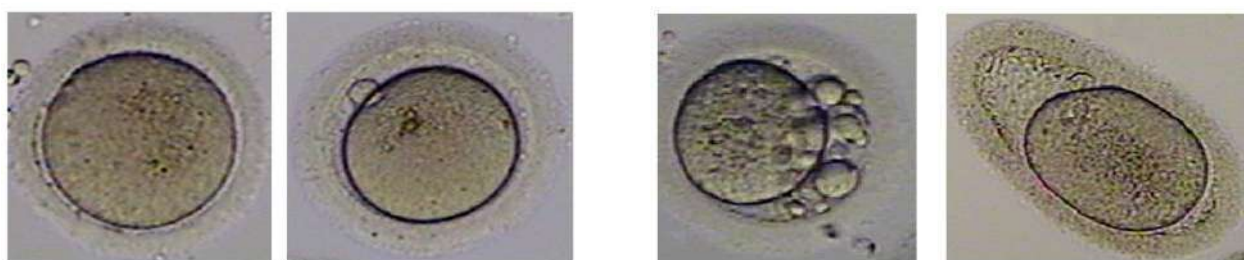
ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 5Р

4.4.8. По истечении 5 минут, с помощью стереомикроскопа оценить состояние ооцитов (увел. х60). Ооциты постепенно приобретают нормальную форму, становятся правильной круглой формы, возвращаясь к первоначальному состоянию (см. ниже, рисунок Б).



4.4.9. Далее, в 3 свободные лунки планшета налить ДФСБ, и в них трижды отмыть ооциты.

4.4.10. Провести оценку состояния полученных ооцитов. Хорошие ооциты (имеющие четкие границы клетки, прозрачные, без следов разрушения и посторонних вкраплений, с целой блестящей оболочкой) перенести в питательную среду на 37°C.



А

Б

Оценка морфологии размороженных ооцитов хомяков:

А – качественных ооцитов;

Б – некачественных ооцитов хомяка (дефрагментация, разрушение блестящей оболочки).

5. Примечания

5.1. Использованные иглы от шприцев и лезвия необходимо сбрасывать в контейнер Шарпа.

5.2. После размораживания можно использовать только ооциты/эмбрионы высокого качества по результатам проведенного морфологического анализа.

5.3. Все используемые растворы и культуральные среды должны быть комнатной температуры.

Конфиденциальный документ		Дата последней коррекции: 05.12.17	
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»		СТРАНИЦА: 1/5	
		КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09	
		ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 6Р	

НАЗВАНИЕ: **Нехирургическая трансплантация размороженных эмбрионов самкам-реципиентам**

ЦЕЛЬ: Установить общую процедуру трансплантации размороженных ранних эмбрионов лабораторным мышам в рог матки нехирургическим способом

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.
СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЖИДКИМ АЗОТОМ.

СОСТАВИЛ: Зернов А.С.		ПРОВЕРИЛ: Минин А.Н.		УТВЕРДИЛ: Телегин Р.В.	
Подпись: <i>Зернов</i>		Подпись: <i>Минин</i>		Подпись: <i>Телегин</i>	
Дата: 05.12.17		Дата: 05.12.17		Дата: 05.12.17	
Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:
УЧЕТН. БЕЗВАН. №1 ИНЖЕНЕР ПО ИНТЕРНУ ПЛАНОВ					

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 2/5

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 6Р

1. Охват

Данная инструкция предназначена для 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.
- 2.3. Институтская Программа по содержанию и использованию животных (Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН).
- 2.4. СО ПЛЖ 18-17 «Правила содержания и разведения лабораторных животных».
- 2.5. СОП № 8.1.X «Операция по вазэктомии у самцов мышей и крыс».
- 2.6. СОП № 5Р «Размораживание ооцитов/ранних эмбрионов».
- 2.7. СОП № 8.5.X «Пересадка доимплантационных эмбрионов на поздних стадиях развития в рог матки у лабораторных мышей».

3. Оборудование и средства

- 3.1. Автоматический CO₂ инкубатор (Nuairе);
- 3.2. Стереомикроскоп (Leica);
- 3.3. Оборудование и материалы для содержания лабораторных грызунов (клетки, стеллажи, бутылки, подстилка, корм и пр.);
- 3.4. Катетер гибкий для внутривенного вливания Flexicath, Apexmed (G 29);
- 3.5. Микропипетка стриппер (Stripper MXL3-STR, MidAtlantic Diagnostics);
- 3.6. Одноразовые стерильные капилляры для микропипетки стриппер (Ø 200 мкм);
- 3.7. Автоматическая пипетка (ER-10, Eppendorph);
- 3.8. Автоматическая пипетка (ER-1000, Eppendorph);
- 3.9. 4-луночный планшет (Nunc);
- 3.10. Чашка Петри 35 мм (Corning);
- 3.11. Одноразовые пластиковые носики для автоматической пипетки 200 мкл
- 3.12. Одноразовые пластиковые носики для автоматической пипетки 1000 мкл;
- 3.13. Среда культуральная M2 (Sigma);
- 3.14. Среда культуральная M16 (Sigma);
- 3.15. Одноразовые лезвия;
- 3.16. Идентификационные карточки;
- 3.17. Маркер перманентный;
- 3.18. Средства индивидуальной защиты (шапки, маски, перчатки, комбинезоны);
- 3.19. Лабораторные мыши необходимой линии.

4. Процедуры

4.1. Подготовка псевдобеременных самок-реципиентов к трансплантации

4.1.1. Использовать вазектомированных самцов, подготовленных согласно СОП №8.1.X.
Важно! Самцы предварительно должны быть протестированы на бесплодность.

4.1.2. В вечернее время (15⁰⁰-18⁰⁰) ссадить самок-реципиентов необходимой линии с вазектомированными самцами в соотношении 4♀:1♂.
Важно! Использовать только половозрелых самок.

4.1.3. В утреннее время (8⁰⁰-11⁰⁰) с помощью пластикового носика (200 мкл) проверить у самок наличие во влагалище копулятивной пробки. Наличие копулятивной пробки свидетельствует о наступившей псевдобеременности.

4.1.4. У самок-реципиентов время до трансплантации (период псевдобеременности) составляет 3 дня с момента обнаружения копулятивной пробки.

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

СТРАНИЦА: 3/5

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 6Р

Важно! Количество реципиентов должно быть вдвое больше, чем предполагаемое количество трансплантаций.

4.1.5. Самок-реципиентов с копулятивными пробками отсадить в отдельную клетку.

4.1.6. На идентификационной карточке маркером написать линию, количество, пол, дату рождения, дату обнаружения копулятивной пробки, дату предстоящей трансплантации.

4.2. Подготовка размороженных ранних эмбрионов к трансплантации

4.2.1. После 48 часов культивирования размороженных эмбрионов в CO₂-инкубаторе в среде M16 необходимо отобрать бластоцисты хорошего качества. Отбор проводить согласно СОП № 5Р.

Внимание! Все манипуляции с эмбрионами необходимо проводить под контролем стереомикроскопа (x20-x60).

4.2.2. Во все лунки 4-луночного планшета с помощью автоматической пипетки налить по 0,5 мл среды M2.

4.2.3. Качественные бластоцисты с помощью микропипетки перенести в первую лунку со средой M2. Далее повторить эту процедуру три раза для оставшихся лунок планшета.

4.2.4. Оставить бластоцисты в среде M2 до начала трансплантации.

4.3. Подготовка микроинъекторной системы для нехирургической трансплантации

4.3.1. Взять стерильный одноразовый гибкий катетер для внутривенного вливания (G 29, длина гибкого кончика 18мм).

4.3.2. Снять внешний защитный колпачок и удалить из катетера внутреннюю направляющую иглу.



4.3.3. Подсоединить катетер к автоматической пипетке ER-10.



4.3.4. С помощью автоматической пипетки налить в центр чашки Петри 100мкл среды M2.

4.3.5. С помощью микропипетки перенести бластоцисты из лунки 4-луночного планшета в чашку Петри со средой M2.

4.3.6. С помощью микроинъекторной системы набрать в кончик катетера 10мкл среды M2 с бластоцистами.

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

СТРАНИЦА: 4/5

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 6Р

Важно! В один рог матки можно трансплантировать не более 10 бластоцист.

4.3.5. Осторожно положить микроинъекторную систему на ровную горизонтальную поверхность.



4.3.6. Подготовить расширительную втулку. С помощью одноразового лезвия отрезать запаянный край защитного колпачка от катетера.

Важно! Общая длина втулки не должна превышать 0,5 см.

4.4. Нехирургическая трансплантация эмбрионов самкам-донорам.

4.4.1. Зафиксировать за хвост псевдобеременную самку-реципиента на сетчатой крышке таким образом, чтобы животное надежно зацепилось передними лапами за сетку. Задняя часть тела должна быть максимально приподнята.

4.4.2. Аккуратно ввести во влагалище расширительную втулку (см. рисунок ниже). Втулка должна полностью погрузиться внутрь.

4.4.3. Взять микроинъекторную систему с заполненным катетером со средой и бластоцистами и аккуратно ввести катетер через расширительную втулку в полость рога матки.

Важно! Вводить катетер необходимо медленно, поступательными движениями во избежание повреждения окружающих тканей.

4.4.4. Если при продвижении катетера он упрется в стенку матки, необходимо немного отклонить его в сторону.



4.4.5. Осторожно ввести среду с бластоцистами из катетера в полость рога матки, путем нажатия на кнопку автоматической пипетки.

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

СТРАНИЦА: 5/5

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 6Р

Важно! Не допускать попадания воздушных пузырьков в полость рога матки.

4.4.6. Плавно извлечь катетер наружу.

4.4.7. Извлечь расширительную втулку.

4.4.8. Отсадить самку-реципиента в чистую клетку.

4.4.9. Промыть катетер оставшейся средой М2 в чашке Петри, чтобы убедиться, что все эмбрионы попали в полость рога матки.

4.4.10. Если в катетере остались эмбрионы, необходимо повторно выполнить процедуры п.п. 4.3.5. – 4.4.8 данной СОП.

4.4.11. В некоторых случаях, в качестве альтернативного способа трансплантации эмбрионов в полость рога матки, допускается использование хирургического метода трансплантации эмбрионов (СОП № 8.5.X). Ответственность за выбор способа трансплантации несет ветеринарный врач.

5. Примечания

5.1. Вазэктомия— хирургическая операция, при которой производится перевязка или удаление фрагмента семявыносящих протоков, что приводит к стерильности (неспособности иметь потомство) при сохранении половых функций у самцов.

5.2. Копулятивная пробка – плотное образование, сформированное секретом эпителия влагалища самки, образующееся после спаривания с самцом.

5.3. Для трансплантации можно использовать только эмбрионы высокого качества по результатам проведенного морфологического анализа.

5.4. Все используемые растворы и культуральные среды должны быть комнатной температуры.

Конфиденциальный документ		Дата последней коррекции: 05.12.17	
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»		СТРАНИЦА: 1/5	
		КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09	
		ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 7Р	

<u>НАЗВАНИЕ:</u> Маркировка и учет единиц хранения в криохранилище				
<u>ЦЕЛЬ:</u> Установить общую процедуру проведения маркировки и учета всех единиц хранения в криобанке Питомника				
<u>ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:</u> Ответственность за проведение данной процедуры в соответствии с требованиями данной СОП лежит на научном сотруднике				
<u>ПРЕДПИСАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ:</u> СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЖИДКИМ АЗОТОМ.				
СОСТАВИЛ: Сернов А.С.		ПРОВЕРИЛ: Минаев А.И.		УТВЕРДИЛ: Ткачев Г.Б.
Подпись: Дата: 05.12.17		Подпись: Дата: 05.12.17		Подпись: Дата: 05.12.17
Место печати: УЧТЕН. ОБЪЕДИН. № 1 ИНЖЕНЕР ПО МЕСТУ ПОДПИСЬ	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 2/5

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 7Р

1. Охват

Данная инструкция предназначена для технолога, научного персонала и сотрудников группы биобезопасности.

2. Ссылки

2.1. Проект Приказа Минздрава России "Об утверждении требований к организации и деятельности биобанков и правил хранения биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинских клеточных продуктов".

2.2. Инструкция производителя к портативному принтеру BMP21 (Brady).

3. Оборудование и средства

3.1. Принтер портативный термотрансферный BMP21 (Brady);



3.2. Картридж для портативного принтера BMP21 (Brady);

3.3. Маркер криоустойчивый;

3.4. Алюминиевые держатели для паеток;

3.5. Криопаетки (BioCane);

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 3/5

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 7Р

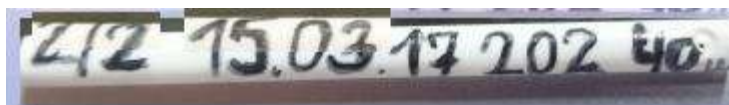
4. Процедуры

4.1. Маркировка криопаеток

4.1.1. С помощью криоустойчивого маркера на белом жакете криопаетки необходимо указать следующую информацию:

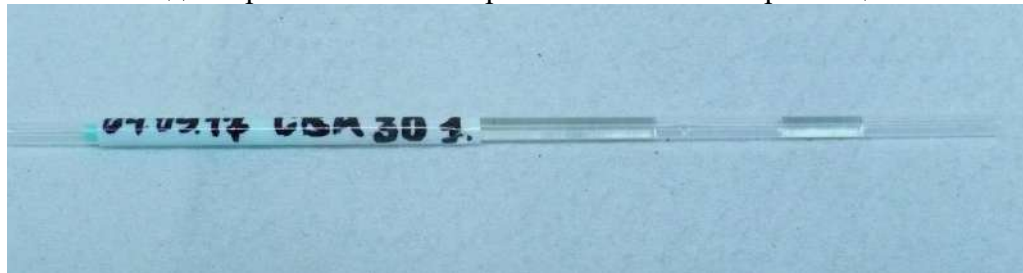
- порядковый номер криопаетки;
- дату замораживания;
- название криосохраняемой линии;
- количество эмбрионов/ооцитов.

Пример маркировки: 2/2 15.03.17 202 40



Расшифровка: 15 марта 2017 года было заморожено 2 криопаетки, в криопаетке №2 находится 40 эмбрионов мышей линии «202».

4.1.2. Жакет необходимо расположить на криопаетке ближе к краю с цветовой вкладкой.



Важно! Запись на жакете криопаетки должна быть выполнена в направлении от конца с цветовой вкладкой в сторону места запайки. Данное требование необходимо для улучшения визуализации и идентификации криопаеток в криохранилище.

4.1.3. Информацию с криопаетки необходимо продублировать в листе «Маркировка и учет криопаеток и гоблетов» (Приложение 1).

4.2. Маркировка держателей криопаеток (гоблет).

4.2.1. Маркировку гоблетов проводят с помощью криоустойчивого маркера и самоклеящихся этикеток.

4.2.2. Криоустойчивым маркером на верхней площадке гоблета написать название криосохраняемой линии и порядковый номер гоблета.



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

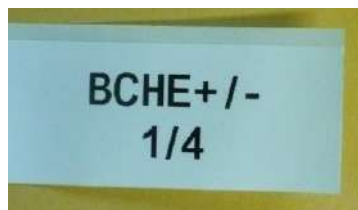
СТРАНИЦА: 4/5

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 7Р

4.2.3. На портативном принтере с помощью встроенной клавиатуры набить название линии и порядковый номер гоблета (см. инструкция к принтеру).

4.2.4. Напечатать самоклеющуюся этикетку.



4.2.5. Наклеить этикетку на верхнюю часть гоблета.



4.2.6. Информацию с гоблета необходимо продублировать в листе «Маркировка и учет криопакетов и гоблетов» (Приложение 1).

5. Примечания

5.1. Информация из листов «Маркировка и учет криопакетов и гоблетов» продублирована в системе электронных таблиц Google.

5.2. Доступ к файлу «Учет единиц хранения» осуществляется по ссылке: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1OeNUL8Qunlkt0pU7Pr8EdNACdiV2MPbWIkLa9t2Uk1s/edit?usp=sharing>

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

СТРАНИЦА: 5/5

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 7Р

Приложение 1.

Лист «Маркировка и учет криопаеток и гоблетов».

Код на гоблете	Код криопаетки		Цвет криопаетки	Контрольное размораживание		Генотип или № ядра	Учет			Примечания	
	Дата замораживания /п/п №	Кол-во эмбрионов		Дата	результат		приход	расход	Остаток на		
					Кол-во нормальных						Кол-во аномальных

Конфиденциальный документ		Дата последней коррекции: 10.12.17	
<p align="center">ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»</p>		СТРАНИЦА: 1/6	
		КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09	
		ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8Р	

НАЗВАНИЕ: **Общие правила работы с криохранилищем при проведении криоконсервации генетических ресурсов**

ЦЕЛЬ: Установить общую процедуру надлежащей работы с криохранилищем при проведении криоконсервации генетических ресурсов Питомника

ОТВЕТСТВЕННОСТЬ: Ответственность за проведение данной процедуры в соответствии с требованиями данной СОП лежит на инженере биобезопасности

ПРЕДПИСАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ:
СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЖИДКИМ АЗОТОМ

СОСТАВИЛ: Зернов А.С.		ПРОВЕРИЛ: Михаилов А.И.		УТВЕРДИЛ: Ткачев Р.В.	
Подпись: <i>Зернов</i>		Подпись: <i>Михаилов</i>		Подпись: <i>Ткачев</i>	
Дата: 10.12.17		Дата: 10.12.17		Дата: 10.12.17	
Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:
<p>УЧТЕН. ЗАЗЕМЛ. №1 ИНЖЕНЕР ПО БЕЗОПАСНОСТИ ПОДПИСЬ</p> <i>ЗРВ</i>					

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

СТРАНИЦА: 2/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8Р

1. Охват

Данная инструкция предназначена для технолога, научного персонала и сотрудников группы биобезопасности.

2. Ссылки

- 2.1. Инструкция производителя для криохранилища Thermo Scientific, BioCane 73.
- 2.2. СО ПЛЖ 02-17 «Порядок обеспечения микробиологической целостности производственных помещений Питомника».
- 2.3. СОП № 5Х «Быстрое замораживание ранних эмбрионов мыши».
- 2.4. СОП № 4Р «Замораживание ооцитов/ранних эмбрионов при сохранении генетических ресурсов».
- 2.5. СОП № 7Р «Маркировка и учет единиц хранения в криохранилище».
- 2.6. Проект Приказа Минздрава России "Об утверждении требований к организации и деятельности биобанков и правил хранения биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинских клеточных продуктов".

3. Оборудование и средства

- 3.1. Криохранилище BioCane 73 (1) с системой контроля уровня жидкого азота (2) и подставкой на колесиках Locator 8 (Thermo);



- 3.2. Криоперчатки (Thermo);
- 3.3. Криофартук (Thermo);
- 3.4. Защитные очки (Thermo);
- 3.5. Криолинейка (Thermo);
- 3.6. Заправочные сосуды Дьюара, 15л;
- 3.7. Маркер криоустойчивый для записи;
- 3.8. Алюминиевые держатели для паеток (гоблеты);

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 3/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8Р

- 3.9. Стаканы длительного хранения для криобанка;
- 3.10. Корнцанг;
- 3.11. Дезинфицирующие салфетки «Лизаксин»;
- 3.12. Дезинфицирующее средство «Лизоформин 3000», 0,25% водный раствор.

4. Процедуры

Внимание! Все манипуляции с криохранилищем/жидким азотом выполнять с использованием криоперчаток, криофартука и защитных очков!

4.1. Общие правила работы с криохранилищем при размещении генетического материала на длительное хранение

- 4.1.1. Подготовить необходимый для криосохранения генетический материал согласно СОП №4Р.
- 4.1.2. Разместить материал в алюминиевом держателе для паеток.
- 4.1.3. На держателе с помощью криоустойчивого маркера сделать необходимые пометки (СОП № 7Р).
- 4.1.4. Открыть крышку криохранилища, аккуратно потянув за ее ручку вертикально вверх. Крышку перевернуть и положить на стол.



Важно! Открывать крышку криохранилища можно только для загрузки/выгрузки генетического материала и для доливки/определения уровня жидкого азота.

- 4.1.5. Криохранилище оснащено 8 стаканами длительного хранения для накопления алюминиевых держателей паеток. Ручка каждого стакана имеет свою цветовую маркировку, а гнездо ручки пронумеровано цифрами от 1 до 8.

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 4/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8Р



4.1.6. За ручку извлечь нужный стакан длительного хранения.

4.1.7. С помощью корнцанга зафиксировать стакан на уровне горловины криохранилища.



Внимание! Запрещается полностью вынимать стакан из криохранилища.

4.1.8. Опустить алюминиевый держатель для паеток с материалом в стакан.

4.1.9. Убрать корнцанг и вернуть стакан на свое место.

4.1.10. Вернуть крышку криохранилища на место.

Важно! Необходимо плотно закрывать крышку во избежание быстрого испарения азота и образования инея и льда.

4.1.11. Сделать запись в листе «Маркировка и учет криопаеток и гоблетов» (СОП № 7Р) и в «Таблице размещения криопаеток с эмбрионами в криохранилище BioCane 73» (СОП № 5Х).

4.2. Контроль за условиями хранения генетического материала

4.2.1. Для контроля уровня жидкого азота в криохранилище используют систему с термочувствительным датчиком, настроенным на температуру минус 196°С. Система оснащена световой и звуковой сигнализацией.

4.2.2. При падении уровня азота в результате его естественного испарения и при нахождении датчика в парах азота (температура которых значительно выше температуры жидкого азота), происходит срабатывание аварийных сигнализаций контроллера.

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 5/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8Р

4.2.3. Необходимо незамедлительно принять меры по устранению этой внештатной ситуации и выполнить доливку азота в хранилище.

Важно! Во избежание подобных аварийных ситуаций, доливать азот в криохранилище необходимо не реже 1 раза в 15 дней.

4.2.4. Азот в криохранилище доливать из заправочных сосудов Дьюара.

4.2.5. При доливке уровень жидкого азота контролировать с помощью криолинейки.

4.2.6. Доливку азота в криохранилище необходимо выполнять силами двух человек.

4.2.7. После доливки сделать запись в «Карточке контроля за условиями хранения клеток» (Приложение 1), где указать дату доливки азота, оценку текущего уровня азота в хранилище на момент доливки, уровень азота после доливки, поставить личную подпись.

4.3. Санитарная обработка криохранилища

4.3.1. Криохранилище должно регулярно освобождаться от жидкого азота, высушиваться. Внутренняя поверхность криохранилища должна обрабатываться моющими и дезинфицирующими растворами.

4.3.2. Санитарная обработка криохранилища должна проводиться каждый раз после 25-кратного заполнения криохранилища жидким азотом.

Внимание! Запрещено использовать ацетон и другие растворители, а также огнеопасные и хлорсодержащие вещества.

4.3.3. Внешние поверхности протереть дезинфицирующими салфетками.

4.3.4. Чистку и дезинфекцию внутренних частей криохранилища проводить дезинфицирующим раствором.

4.3.5. Перенести материал в дублирующее криохранилище. Опорожнить криохранилище и дать время ему нагреться до комнатной температуры.

4.3.6. Залить внутрь дезраствор на 1 час.

4.3.7. После этого слить дезраствор и промыть проточной водой до исчезновения пены. Хорошо просушить.

5. Примечания

5.1. Криохранилище BioCape 73 вмещает 73 л жидкого азота, имеет 8 стаканов длительного хранения. Статическое время удержания жидкого азота составляет 121 день. Статическая скорость испарения жидкого азота 0,6 л/день.

5.2. Доступ к содержимому криохранилища должен быть разрешен только авторизованному персоналу.

5.3. Необходимо регулярно проводить технический осмотр состояния хранилища, проверять уровень азота, работу электроники, случаи срабатывания сигнализации и пр.

5.4. Криохранилище размещают на подставке с колесиками для обеспечения простоты перемещения при проведении санитарной обработки помещения и в случае экстренной эвакуации.

5.5. Датчик системы контроля уровня жидкого азота размещают на уровне верхней границы стакана длительного хранения в толще жидкого азота. Как только уровень азота упадет ниже этой границы, сработает аварийная сигнализация, при этом криосохраненный биоматериал останется в толще жидкого азота.

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

СТРАНИЦА: 6/6

КОД: 03А; 03Б; 03Г; 08; 09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8Р

Приложение 1.

Карточка контроля за условиями хранения клеток

Дата заливки азота	Оценка	Уровень азота в дьюаре	Подпись проверяющего

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 1/11

КОД: 08;03А;03Б;03Г;09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8.13.X

НАЗВАНИЕ: Моделирование структурной травмы спинного мозга у крыс

ЦЕЛЬ: Определение жесткого регламента проведения предоперационной подготовки и оперативного приема при моделировании структурной травмы спинного мозга у крыс

ОТВЕТСТВЕННОСТЬ: Ответственность за проведение данной процедуры в соответствии с требованиями данной СОП лежит на курирующем ветеринарном враче

ПРЕДПИСАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ:

СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЖИВОТНЫМИ.

СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ЭЛЕКТРООБОРУДОВАНИЕМ.

СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С КОЛЮЩЕ-РЕЖУЩИМИ ИНСТРУМЕНТАМИ.

СОБЛЮДАТЬ ТЕХНИКУ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С СУХОЖАРОВЫМ СТЕРИЛИЗАТОРОМ.

СОСТАВИЛ: Минаков А.И.		ПРОВЕРИЛ: Ершов А.С.		УТВЕРДИЛ: Телегин Р.Б.	
Подпись: Дата: 08.09.17		Подпись: Дата: 08.09.17		Подпись: Дата: 08.09.17	
Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:	Место печати:
УЧТЕН. БАЗЕЛЕН. И.И. ИНЖЕНЕР ПО КАЧЕСТВУ ПОДПИСЬ					

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 08.09.17.
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 2/11
	КОД: 08;03А;03Б;03Г;09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8.13.X

1. Охват

Данная инструкция предназначена для ветеринарного и научного персонала.

2. Ссылки

- 2.1. The Mouse in Biomedical Research, V. III. Ch. 13 – Bi methodology and Surgical Techniques// 2nd Edition, Academic Press, 2007.
- 2.2. John J. Bogdanske, Scott Hubbard-Van Stelle, Margaret Rankin Riley, Beth M. Schiffman. Suturing Principles and Techniques in Laboratory Animal Surgery: Manual and DVD. CRC Press, 2013.
- 2.1. Linqiu Zhou, Parviz Kambin, Kenneth F. Casey, Francis J. Bonner, Evan O'Brien, Zhenhai Shao & Shihuan Ou // Mechanism research of cryoanalgesia. 1995, Neurological Research, 17:4, 307-311.
- 2.2. База данных MEDLINE (www.ncbi.nlm.nih.gov).
- 2.3. The Laboratory Rat, M.A. Suckow. Elsevier, 2006.
- 2.4. Институтская Программа по содержанию и использованию животных (Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН).
- 2.5. Инструкция производителя костного цемента «Белладент»;
- 2.6. СОП № 1В «Методы фиксации лабораторных мышей, крыс и хомяков».
- 2.7. СОП № 2В «Введение веществ лабораторным животным (мышам, крысам, хомякам)».
- 2.8. СОП № 5В «Признаки боли и стресса у лабораторных животных».
- 2.9. СОП № 1Х «Анестезия и анестезия лабораторных животных».
- 2.10. СОП № 2Х «Общие принципы хирургии лабораторных грызунов».
- 2.11. СОП № 6Х «Газовая анестезия мелких лабораторных грызунов».

3. Оборудование и материалы

- 3.1. Остроконечный офтальмологический скальпель 5 мм (BD BEAVER NEEDLE BLADE);
- 3.2. Ножницы глазные остроконечные универсальные (Cilita);
- 3.3. Пинцет глазной изогнутый (Cilita);
- 3.4. Пинцет глазной остроконечный (Cilita);
- 3.5. Иглодержатель микрохирургический (Cilita);
- 3.6. Ранорасширитель микрохирургический (Cilita);
- 3.7. Векорасширитель глазной детский (Cilita);
- 3.8. Костные кусачки Люэра;
- 3.9. Стоматологический распатор с режущей прямоугольной рабочей частью;
- 3.10. Стоматологический одноугловой экскаватор;
- 3.11. Стоматологический микромотор (STRONG 210/108NE);
- 3.12. Прямая насадка к микромотору (STRONG AT-II);
- 3.13. Бор шаровидный с алмазным напылением, Ø рабочей части 2 мм, хвостовик НР Ø 2,35 мм, зернистость 514 (НП ООО «Система»).
- 3.14. Ультразвуковая моющая машина;
- 3.15. Весы лабораторные (Sartorius);
- 3.16. Операционный столик с водяным подогревом (VetTech Solutions);
- 3.17. Электрический подогреваемый реабилитационный столик.
- 3.18. Хирургический стерiomикроскоп (Optika SZN-T, Zoom 0,67x-4,5x, ITALY)
- 3.19. Система для ингаляционной анестезии с адсорбером отработанных газов (VetTech Solutions);
- 3.20. Температурный датчик ректальный;
- 3.21. Электрическая бритва (3М);
- 3.22. Термокоагулятор;

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 08.09.17.
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 3/11
	КОД: 08;03А;03Б;03Г;09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8.13.X

- 3.23. Термостат;
- 3.24. Кризонд оригинальной конструкции;



- 3.25. Фреза металлическая тонкостенная, Ø 1,6 мм оригинальной конструкции;



- 3.26. Хирургические тупферы из целлюлозы (Surgi);
- 3.27. Шприцы 1 мл; 2 мл;
- 3.28. Контейнер Шарпа;
- 3.29. Пакеты для медицинских отходов Класс Б – Желтые;
- 3.30. Драпировочная пленка Op-Site;
- 3.31. Маркер хирургический;
- 3.32. Шовный материал Prolene 6-0, Викрил 4-0/5-0;
- 3.33. Хирургический клей ИВИСЕЛ с системой смешивания и доставки;
- 3.34. Пленка коллагеновая изолирующая;
- 3.35. Костный цемент (Белладент);
- 3.36. Алюспрей для послеоперационной обработки ран;
- 3.37. Ветранквил (Seva);

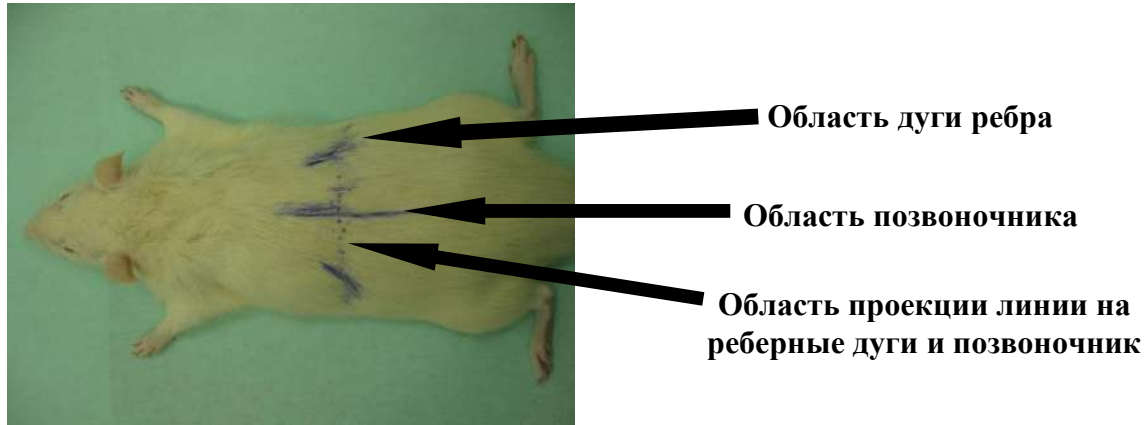
Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 08.09.17.
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 4/11
	КОД: 08;03А;03Б;03Г;09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8.13.X

- 3.38. Аэрран (изофлюран) (Ceva);
- 3.39. Кожный антисептик (Sterisol АВ);
- 3.40. Офтагель (глазной гель)
- 3.41. Физиологический раствор (НПО Микроген ФГУП);
- 3.42. Раствор Рингера-локка (НПО Микроген ФГУП);
- 3.43. Байтрил 2,5% (Baer);
- 3.44. Норокарп (Norbrook Laboratories Limited);
- 3.45. Стерильные салфетки из нетканого материала;

4. Процедуры

4.1. Предоперационные мероприятия:

- 4.1.1. В день операции животное перевести в операционную комнату 208 в чистой клетке. Перед началом операции животное взвесить на лабораторных весах для расчета объема медикаментозных средств.
- 4.1.2. Выполнить премедикацию и газовую анестезию животного согласно СОП № 1Х и СОП № 2В.
- 4.1.3. После наступления хирургического наркоза выполнить разметку будущей области оперативного вмешательства.
- 4.1.4. Оперативный доступ производят в области перехода грудного отдела позвоночника в поясничный, на первом поясничном позвонке.
- 4.1.5. Путем пальпации, необходимо под кожей найти позвоночник и дуги последних ребер, и с помощью маркера визуализировать их.



- 4.1.6. Провести линию, соединяющую реберные дуги с проекцией позвоночника, и, с помощью электрической бритвы, в области пересечения подготовить операционное поле согласно СОП № 2Х.

Важно! Для предотвращения высыхания роговицы, перед размещением животного на операционном столике, нанести глазной гель на роговицу глаз.

Важно! Все операционные хирургические процедуры и манипуляции проводить с использованием операционного стереомикроскопа.

4.2. Ляминотомия и гемисекция спинного мозга.

- 4.2.1. С помощью скальпеля на 2-2,5 см рассечь кожу вдоль позвоночника в месте пересечения поперечной плоскости сразу за последним ребром и проекции позвоночного столба.
- 4.2.2. Осторожно препарировать кожу от подкожной клетчатки вокруг области разреза.

ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 5/11

КОД: 08;03А;03Б;03Г;09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8.13.X

4.2.3. Используя ранорасширитель микрохирургический развести кожу в разные стороны.



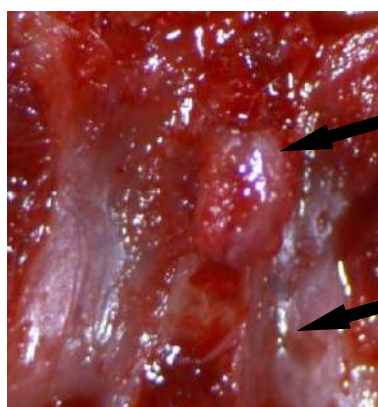
4.2.4. Глазными остроконечными универсальными ножницами рассечь поверхностную фасцию и подкожную жировую клетчатку – визуализируется краниальное схождение сухожилий дорсальной группы мышц позвоночного столба к остистым отросткам позвонков (на рисунке точкой отмечен позвонок для ламинэктомии).



4.2.5. С помощью распатора аккуратно скелетировать остистый отросток первого поясничного L1 позвонка, находящийся сразу же (краниальнее) перед схождением сухожилий дорсальной группы мышц.

Важно! Избегать обильных и длительных кровотечений. Для остановки крови использовать электрический коагулятор и хирургические тупферы.

4.2.6. Скелетировать дорсальную дужку первого поясничного L1 позвонка.



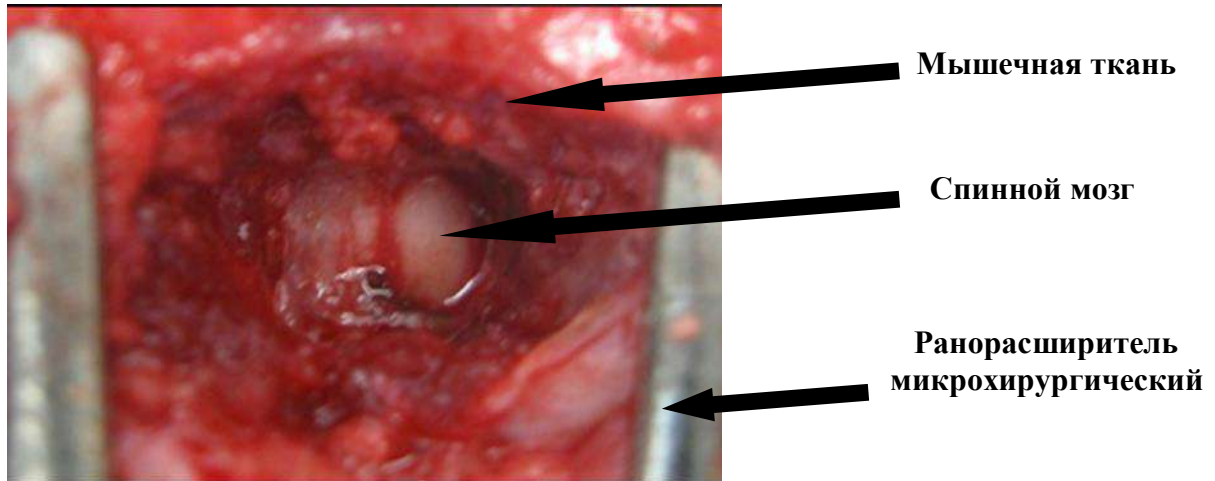
Остистый
отросток

Дужка
позвонка

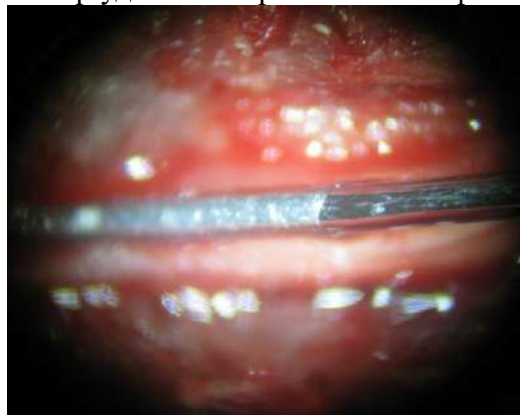
Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 08.09.17.
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 6/11
	КОД: 08;03А;03Б;03Г;09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8.13.X

4.2.7. Используя ранорасширитель микрохирургический раздвинуть близлежащие слои мышечных тканей.

4.2.8. Костными кусачками Люэра скусить остистый отросток первого поясничного позвонка, после чего стоматологическим бором, на максимальных оборотах, лёгкими гладящими движениями, избегая сквозного прободения позвоночного канала, произвести ламинэктомию.



4.2.9. Посредством пинцетов и остроконечного микрохирургического скальпеля осторожно, не травмируя подлежащий спинной мозг, вскрыть твердую мозговую оболочку. Излившийся ликвор удалить стерильными салфетками.



4.2.10. Во избежание кровотечения дорсальную артерию спинного мозга необходимо лигировать шовным материалом (Prolene 6-0, Ethicon, США) или коагулировать электрокаутером.



ФИБХ РАН
НПП «ПИТОМНИК
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»

СТРАНИЦА: 7/11

КОД: 08;03А;03Б;03Г;09

ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8.13.X

4.2.11. Заполнить емкость криозонда жидким азотом, предварительно поместив его в ёмкость с жидким азотом.

Внимание! Во время работы с жидким азотом использовать защитные очки и перчатки.

4.2.13. Осторожно прикоснуться медным проводником криозонда к поверхности спинного мозга, не оказывая чрезмерного давления. Удерживать в таком положении 3 минуты.



4.2.14. Спустя указанное время, быстро убрать криозонд и выполнить унилатеральную гемисекцию спинного мозга в области криозамораживания, используя вращающуюся фрезу.

Важно! Фреза должна быть ориентирована перпендикулярно плоскости спинного мозга.



4.2.15. Изъятый фрагмент биоптата спинного мозга, при необходимости, по усмотрению ветврача, может быть использован для гистологического исследования.

4.2.16. Образовавшийся дефект обильно промыть раствором Рингера-Локка, предварительно подогретом в термостате до 37°C.

4.2.17. Изолировать область дефекта коллоидной плёнкой, герметизируя хирургическим клеем ИВИСИЛ.

4.2.18. Далее восстановить дефект дорсальной дужки позвонка с помощью костного цемента.

4.2.19. Послойно ушить мышцы и подкожную клетчатку, используя VICRYL 4-0.

4.2.20. Рану закрыть непрерывным внутрикожным швом, используя Prolene 6-0.

4.2.21. Для защиты операционной раны, кожу обработать специальной суспензией микропористого алюминия, образующего тонкий слой алюминиевого покрытия на поверхности кожи.



Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 08.09.17.
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	<u>СТРАНИЦА:</u> 8/11 <u>КОД:</u> 08;03А;03Б;03Г;09 <u>ТИП ДОКУМЕНТА:</u> СОП № 8.13.Х

4.5. Послеоперационные мероприятия

- 4.5.1. Прооперированное животное перевести на подогреваемый электрический столик в чистой клетке.
- 4.5.2. Для послеоперационной анальгезии использовать Норокарп, согласно СОП № 1Х.
- 4.5.3. Проводить регидратационную терапию (подкожное введение физиологического раствора) согласно СОП № 1Х.
- 4.5.4. Признаки боли контролируют согласно СОП № 5В. Если животное демонстрирует признаки умеренной или сильной боли, ветврач назначает курс анальгетиков.
- 4.5.5. Животных содержат на специализированной бумажной подстилке Arbocell performance, с добавлением материалов обогащения среды (поликарбонатные цилиндры). Внутри клеток ежедневно закладывают зерновую смесь «VitaCraft» и пакетики гидрогеля.
- 4.5.6. Заполнить «Лист записи хирургического вмешательства» согласно СОП № 2Х.

4.6. Температурный режим:

- 4.6.1. Для предотвращения возможного переохлаждения организма, связанного с наркотизацией, в течение операции животное находится на подогреваемом операционном столике.
- 4.6.2. Адекватность подогрева необходимо контролировать ректальным температурным датчиком. Температура тела должна находиться в пределах 36-37°C.
- 4.6.3. Сразу после завершения операции животное в клетке с чистой подстилкой перевести на подогреваемый электрический столик, а после выхода из наркоза – в комнату 214.

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 08.09.17.
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	<u>СТРАНИЦА:</u> 9/11 <u>КОД:</u> 08;03А;03Б;03Г;09 <u>ТИП ДОКУМЕНТА:</u> СОП № 8.13.Х

5. Примечания

5.1. Важность моделирования хирургической травмы спинного мозга у крыс обусловлена необходимостью изыскания эффективного (с образованием минимально возможного количества клеточного детрита) способа иссечения тканей спинного мозга при хирургическом лечении патологий, сопряженных со структурными дефектами. В работе был использован оригинальный способ резания вращающейся кромкой из замороженного состояния субстрата.

5.2. Внутривенное введение препаратов для премедикации до операции, внутривенное введение анальгезирующих и внутримышечное введение антибактериальных препаратов в постоперационный период проводят согласно СОП №2В.

5.3. Выбор объекта биомоделирования (самцы крыс SD возраста 4-5 мес. и веса более 350 гр.) обусловлен наличием для данного вида животных рейтинговой шкалы (Бассо, Битти и Бреснахан - BBB) клинической оценки локомоторного дефицита после спинальных травм (см. Приложение 1).

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 08.09.17.
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 10/11
	КОД: 08;03А;03Б;03Г;09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8.13.X

Приложение 1. Критерии оценки двигательных функций тазовых конечностей крыс по шкале Basso, Beattie, Bresnahan (BBB)

Сохранность функций тазовых конечностей оценивается в баллах. При минимальных двигательных нарушениях центрального генеза, уязвимыми, в первую очередь, оказываются наиболее удалённые от спинного мозга периферические области иннервации - дистальные участки конечности (страдает мелкая моторика пальцев) и хвост. Степень тяжести таких нарушений лёгкая, сопряжена с максимальной сохранностью положения тела и функций тазовой конечности и имеет, согласно шкале BBB, максимальную оценку в баллах.

При оценке лёгких нарушений двигательной иннервации тазовых конечностей диагностическое значение имеют следующие параметры:

1) Стабильность положения туловища.

Положение туловища	Присутствуют интенсивные движения в трёх суставах тазовой конечности, а также опора на подошвенную поверхность стопы и синергизм движений передних и задних конечностей, движения пальцев присутствуют, в момент начала движения, во время движения и при контакте с поверхностью положение лапы доминирующее – параллельно туловищу, хвост животного поднят
стабильное	20
нестабильное	19

2) Контакт с поверхностью.

Положение лапы при начале контакта с поверхностью	Присутствуют интенсивные движения в трёх суставах тазовой конечности, а также опора на подошвенную поверхность стопы и синергизм движений передних и задних конечностей, движения пальцев присутствуют, в момент начала движения, во время движения положение лапы доминирующее – параллельно туловищу
доминирующее – параллельно туловищу	18
изогнутое	17

3) Начало движения.

Положение лапы в момент начала движения	Присутствуют интенсивные движения в трёх суставах тазовой конечности, а также опора на подошвенную поверхность стопы и синергизм движений передних и задних конечностей, движения пальцев присутствуют.
доминирующее – параллельно туловищу	16
изогнутое	15

Конфиденциальный документ	Дата последней коррекции: 08.09.17.
ФИБХ РАН НПП «ПИТОМНИК ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ»	СТРАНИЦА: 11/11
	КОД: 08;03А;03Б;03Г;09
	ТИП ДОКУМЕНТА: СОП № 8.13.X

Приложение 1. (продолжение)

4) Адекватность поставы стопы и мелкая моторика.

Постав и моторика стопы	Присутствуют интенсивные движения в трёх суставах тазовой конечности, а также опора на подошвенную поверхность стопы и синергизм движений передних и задних конечностей
Движение пальцев присутствует	14
Ротация, опора на дорсальную поверхность стопы	13

Более тяжёлые нарушения проводимости отражаются на взаимодействии грудных и тазовых конечностей.

Синергизм движений передних и задних конечностей	Присутствуют интенсивные движения в трёх суставах тазовой конечности, а также опора на подошвенную поверхность стопы с переносом весовой нагрузки в динамике.
часто	12
эпизодично	11

Следующим этапом развития функциональной двигательной недостаточности является потеря опороспособности тазовой конечности.

Опора на подошвенную поверхность стопы с переносом весовой нагрузки	Присутствуют интенсивные движения в трёх суставах тазовой конечности - тазобедренном, коленном и заплюсневом.
присутствует в динамике	10
присутствует в статике	9
отсутствует	8

Последней утрачивается способность движения в крупных суставах тазовой конечности, от дистальных к проксимальным, что соответствует минимальной сохранности функций и оценивается по шкале ВВВ минимальными баллами.

Движения	В движении задействованы	
	2 сустава	3 сустава
	тазобедренный коленный	тазобедренный, коленный заплюсневый
интенсивные во всех трёх суставах	-	7
лёгкие + интенсивные только в двух суставах	3	6
лёгкие + интенсивные только в одном суставе	2	5
лёгкие	1	4
отсутствуют	0	-



Утверждаю
Первый заместитель директора
ФИБХ РАН
Ф.А. Мещеряков

«10» ОКТЯБРЯ 2017 г.

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов Питомника
СО ПЛЖ 19-17
Издание: 1

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17 Издание: 1	Система менеджмента качества Криосохранение генетических ресурсов Питомника	Стр. 2 из 22
----------------------------	---	--------------

СОДЕРЖАНИЕ

№ раздела, подраздела	Наименование раздела, подраздела	Стр.
1	2	3
1	Область применения	3
2	Нормативные ссылки	3
3	Определения	4
4	Общие положения	4
5	Требования при выборе и подготовке животных-доноров для криосохранения генетического материала	5
6	Проведение контроля качества криосохраняемого материала	6
7	Требования при выполнении замораживания эмбрионов/ооцитов	7
8	Требования при выполнении размораживания эмбрионов/ооцитов	8
9	Требования при выборе и подготовке животных-реципиентов для проведения трансплантации генетического материала	9
10	Требования к условиям хранения генетического материала	9
11	Маркировка и учет единиц хранения	10
12	Порядок оформления документов и регистрации данных	10
13	Требования к используемым материалам и оборудованию	10
14	Ответственность и полномочия персонала	11
Приложение А	Сокращения и их обозначения	12
Приложение Б	Схема криосохранения генетического материала	13
Приложение В	Таблица-график проведения одного цикла криоконсервации	14
Приложение Г	Таблица размещения криопакеток с эмбрионами в криохранилище	15
Приложение Д	Таблица учета и движения генетического материала	16
Приложение Е	Лист маркировки и учета криопакеток и гоблетов	17
Приложение Ж	Карточка контроля за условиями хранения генетического материала	18
Приложение И		19
Приложение К		20
	Листы регистрации изменений и учета копий документов СМК	22

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Издание: 1

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 3 из 22

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов Питомника

Введен впервые

Дата введения _____ 2017 г.

1. Область применения

Настоящий стандарт устанавливает требования к процессам подготовки доноров, сбора, замораживания, размораживания и трансплантации генетического материала (ранних эмбрионов/ооцитов), а также маркировки и учета единиц хранения и общие правила работы с криобанком при проведении криосохранения генетических ресурсов в Питомнике лабораторных животных ФИБХ РАН (далее – Питомник); а также определяет последовательность действий должностных лиц и задействованных структурных групп Питомника в соответствии с требованиями ИСО 9001:2015.

Данный стандарт распространяется на следующие структурные группы Питомника: административную, контроля качества производства, ветеринарную, технологии производства, биобезопасности.

2. Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие нормативные документы:

- ИСО 9000:2015 «Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь»;
- ИСО 9001:2015 «Системы менеджмента качества. Требования»;
- Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных (NRC, 2011);
- The COST Manual of Laboratory Animal Care and Use: Refinement, Reduction, and Research. Management of Genetically Modified Rodents (CRC Press, 2010);
- Guidelines on Euthanasia (AVMA, 2013);
- Рекомендации по мониторингу здоровья колоний грызунов и кроликов (FELASA, 2014);
- Программа по содержанию и использованию животных;
- Инструкция по обращению с биологическими отходами;
- СанПиН 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», 2014;
- Приказ Минздрава России от 30 августа 2012 года № 107н «О порядке

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Издание: 1

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 4 из 22

использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению»;

- Приказ Минздрава России "Об утверждении требований к организации и деятельности биобанков и правил хранения биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинских клеточных продуктов" (от 13.09.2017) в соответствии с ч.3 ст.37 Федерального закона от 23 июня 2016 г. №180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».
- СО ПЛЖ 02-17 «Порядок обеспечения микробиологической целостности производственных помещений Питомника»;
- СО ПЛЖ 20-17 «Менеджмент рисков. Анализ и оценка»;
- СО ПЛЖ 12-17 «Управление средствами измерений».

3. Определения

В настоящем стандарте используются определения, данные в ИСО 9000:2015. Сокращения и их обозначения, используемые в настоящем стандарте, приведены в Приложении А.

4. Общие положения

4.1. Цель - определение порядка криосохранения генетических ресурсов Питомника, проведение контроля качества сохраняемого материала, соблюдение условий хранения, и определение порядка действий соответствующих структурных групп Питомника. Криосохранение оплодотворенных эмбрионов, яйцеклеток и спермы обеспечивает их сохранение без ухудшения качества на протяжении длительного времени, и позволяет гарантированно предотвратить изменения генетического фона, что особенно важно для линий ГМЖ. Криосохранение позволяет снизить численность не востребуемых колоний животных, что соответствует правилам биоэтики (Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных). В случаях возникновения ЧС и возможной утраты животных коллекционного фонда, криобанк обеспечивает высокую однородность и сохранность генетического материала (СО ПЛЖ 20-17) с возможностью последующего восстановления утраченных линий.

4.2. В качестве генетических ресурсов для криосохранения используют мышинные доимплантационные эмбрионы на стадии 8-бластомеров, ооциты хомяков на стадии метафаза II и сперма хомяков.

4.3. Схема проведения криосохранения генетического материала ПЛЖ представлена в Приложении Б.

4.4. Криосохранение генетических ресурсов проводят только после составления и утверждения плана работ (Приложение В).

4.5. Формирование выборки доноров, в зависимости от их генетического статуса (аутбредный, инбредный, геномодифицированный), проводят согласно утвержденной схеме (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП).

4.6. Все манипуляции с животными проводятся исключительно в «чистых» помещениях

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Издание: 1

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 5 из 22

Питомника высококвалифицированными специалистами (СанПиН 2.2.1.3218-14).

4.7. Координацию работ и организацию четкого взаимодействия структурных групп ПЛЖ при криосохранении генетических ресурсов осуществляет заведующий Питомником.

5. Требования при выборе и подготовке животных-доноров для криосохранения генетического материала

5.1. Для криосохранения генетических ресурсов используют только здоровых животных (по результатам лабораторного контроля состояния здоровья (Программа по содержанию и использованию животных) согласно профилю FELASA (Рекомендации по мониторингу здоровья колоний грызунов и кроликов FELASA, 2014) и на основании клинического осмотра (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «В» СОП)). Ответственность за подготовку животных-доноров несет ветеринарный врач ПЛЖ.

5.2. Для криосохранения эмбрионов/ооцитов инбредных линий животных используют самок-доноров I и II поколения, полученных от животных коллекционного фонда, а также самих животных коллекционного фонда. Генетический материал от III поколения допускается использовать только для контроля условий хранения с целью проведения контрольного размораживания.

5.3. Для криосохранения эмбрионов геномодифицированных линий животных допускается использовать самок-доноров любого поколения, при условии, что животное генетически охарактеризовано по результатам проведенного генотипирования (The COST Manual of Laboratory Animal Care and Use, 2010).

5.4. Смешивать ооциты/эмбрионы, полученные от разных поколений животных, не допускается. Необходимо вести строгий учет генетического материала, заполняя лист «Маркировки и учета криопакеток и гоблетов» (Приложение Е).

5.5. В зависимости от генетического статуса линии (аутбредная, инбредная, геномодифицированная) на длительное хранение размещают определенное количество эмбрионов/ооцитов (согласно СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП): для инбредных линий - 250 шт., для аутбредных линий - 500 шт., для ГМЖ гомозиготных линий - 250 шт., для ГМЖ гетерозиготных линий - 300 шт.

5.6. Параллельно, для каждой партии замороженных эмбрионов/ооцитов, делают дополнительно контрольную криопакетку, содержащую до 15 эмбрионов/ооцитов, которая служит индикатором соблюдения условий хранения и используется для контрольного размораживания.

5.7. С целью снижения числа используемых животных и увеличения выхода ооцитов/эмбрионов в пересчете на одно животное, в ПЛЖ используют гормональную обработку самок-доноров, согласно утвержденной схеме (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП).

5.8. При проведении гормональной обработки доноров необходимо строгое соблюдение временных интервалов между введениями гормональных препаратов и вводимых дозировок гормонов (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП). Гормональную обработку проводит научный персонал или персонал по уходу за лабораторными животными, после специального инструктажа. Использованные одноразовые материалы и колюще-режущие предметы необходимо с осторожностью утилизировать согласно «Инструкции по обращению с биологическими отходами».

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Издание: 1

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 6 из 22

5.9. Для проведения одного цикла работ по криосохранению эмбрионов/ооцитов используют не менее 10, но не более 20 самок-доноров.

5.10. Для оплодотворения самок-доноров используют только проверенных половозрелых самцов из коллекционного фонда соответствующей линии.

5.11. Оплодотворенных самок-доноров до момента вымывания эмбрионов/ооцитов размещают в отдельной клетке, делают соответствующую маркировку, и содержат в условиях согласно «Программе по содержанию и использованию животных».

5.12. Для получения эмбрионов/ооцитов животных-доноров подвергают эвтаназии согласно требованиям AVMA Guidelines on Euthanasia и Программы по содержанию и использованию животных. Эвтаназию проводит научный персонал или персонал по уходу за лабораторными животными, после специнструктажа (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «В» СОП). Утилизацию трупов животных выполняют согласно «Инструкции по обращению с биологическими отходами».

5.13. Промежуток времени между эвтаназией животных-доноров и замораживанием эмбрионов/ооцитов не должен превышать 90 минут.

5.14. Вымывание и сбор эмбрионов/ооцитов проводят с соблюдением асептических условий (согласно СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП; СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Х» СОП), с использованием стерильных расходных материалов и инструментов (ПРИЛОЖЕНИЕ И, ПРИЛОЖЕНИЕ К).

6. Проведение контроля качества криосохраняемого материала

6.1. Оценку качества получаемого генетического материала (эмбрионов/ооцитов) проводит научный персонал, выполняющий программу криосохранения.

6.2. При выборе эмбрионов/ооцитов необходимо руководствоваться требованиями СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП, согласно которым для криохранения используют только эмбрионы/ооциты высокого качества по результатам проведенного морфологического анализа. Эмбрионы/ооциты, не соответствующие установленным критериям, для процедуры криосохранения не используют.

6.3. Манипуляции с эмбрионами/ооцитами и оценку их качества необходимо выполнять под контролем стереомикроскопа, способным обеспечить х60 кратное увеличение.

6.4. От общего числа полученных эмбрионов 1/10 часть, отобранную случайным образом, необходимо поставить на контрольное культивирование. Необходимо для определения правильности проведения процедуры вымывания и оценки сохранности жизнеспособности эмбрионами (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП).

6.5. При соблюдении стабильных условий хранения, срок хранения замороженных эмбрионов не регламентирован (приказ Минздрав РФ от 30 августа 2012 года № 107н). В ПЛЖ контрольное размораживание необходимо выполнять один раз в год. Для этого используют одну контрольную криопаетку с эмбрионами/ооцитами из любой партии, замороженной годом ранее относительно текущего периода выполнения размораживания.

6.6. Контрольно размороженные эмбрионы/ооциты должны соответствовать установленным требованиям согласно (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП).

6.7. В случае несоответствия качества размороженного генетического материала установленным требованиям, необходимо принять меры по определению причины случившегося.

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Издание: 1

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 7 из 22

6.8. При выявлении нарушений условий хранения, несоблюдении сроков дозаправки емкости криохранилища жидким азотом, срабатывании автоматической системы контроля уровня жидкого азота и других ЧС, сначала необходимо устранить причину случившегося, а потом выполнить контрольное размораживание и провести культивирование эмбрионов (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП).

7. Требования при выполнении замораживания эмбрионов/ооцитов

7.1. Все манипуляции с генетическим материалом (эмбрионы/ооциты) выполняет научный персонал, в асептических условиях под контролем стереомикроскопа, способного обеспечить х60 кратное увеличение.

7.2. В ПЛЖ для криосохранения различного генетического материала используют два подхода: эмбрионы мышей сохраняют методом витрификации (прямым погружением в жидкий азот), а ооциты хомяков - методом программного замораживания (прямым погружением в охлажденный ректификат).

7.3. Подробное пошаговое описание каждой процедуры отображено в СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП.

7.4. Для криосохранения эмбрионов/ооцитов используют специальные пластиковые криопакетки, устойчивые к действию низких температур (ПРИЛОЖЕНИЕ И).

7.5. Приготовление стоковых растворов криопротекторов необходимо выполнять в асептических условиях, с применением коммерческих реактивов (ПРИЛОЖЕНИЕ И), за день до проведения процедуры замораживания (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП). Необходимо строго соблюдать концентрацию готовых растворов криопротекторов.

7.6. Взвешивание сухих компонентов растворов криопротекторов необходимо проводить только с использованием прецизионных лабораторных весов (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Т» СОП).

7.7. Главным условием при проведении процедуры криосохранения эмбрионов/ооцитов является строгое соблюдение временных интервалов нахождения сохраняемого материала в растворах криопротекторов. На всех этапах криоконсервации необходимо использовать электронный таймер/секундомер.

7.8. На завершающем этапе подготовки генетического материала к криоконсервированию необходимо обращать пристальное внимание на запайку криопакетки. Особенно это критично при выполнении программного замораживания, где процесс замораживания происходит в охлажденном ректификате (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП).

7.9. Общее время выполнения процедуры подготовки криопакеток с эмбрионами/ооцитами к замораживанию не должно превышать 20 минут.

7.10. Криопакетки с эмбрионами/ооцитами при размещении в криохранилище должны быть полностью погружены в толщу жидкого азота. Не допускается хранение криопакеток с эмбрионами/ооцитами в парах азота.

7.11. Необходимо вести строгий учет генетического материала, внося все данные в «Таблицу размещения криопакеток с эмбрионами в криохранилище» и «Таблицу учета и движения генетического материала» (ПРИЛОЖЕНИЕ Г, ПРИЛОЖЕНИЕ Д).

7.12. Генетический материал одного вида (полученный от одной линии животных) равными частями размещают на хранение в два физически разделенных криохранилища, для повышения сохранности на случай непредвиденных ситуаций и ЧС.

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Издание: 1

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 8 из 22

8. Требования при выполнении размораживания эмбрионов/ооцитов

8.1. Размораживание генетического материала ПЛЖ проводят в двух случаях: 1) контрольное размораживание - с целью проведения контроля за соблюдением условий криоконсервации и сохранности эмбрионов в криохранилище; 2) восстановительное размораживание - с целью восстановления единиц хранения коллекционного фонда для последующего разведения.

8.2. В ПЛЖ контрольное размораживание проводят 1 раз в год. После размораживания эмбрионы подвергаются культивированию в CO₂-инкубатор с последующей морфологической оценкой. Информацию о качестве эмбрионов заносят в «Лист маркировки и учета криопаеток и гоблетов» (ПРИЛОЖЕНИЕ Е).

8.3. Восстановительное размораживание проводят при возникновении потребности в той или иной линии животных коллекционного фонда (обновление имеющейся линии свежим генетическим материалом, восстановление не востребуемых линий и стоков, пр.). После размораживания и культивирования в CO₂-инкубаторе, эмбрионы трансплантируют подготовленным самкам-реципиентам (см. п.9 настоящего СО), и делают необходимые записи в таблицах (ПРИЛОЖЕНИЕ Г, ПРИЛОЖЕНИЕ Д, ПРИЛОЖЕНИЕ Е).

8.4. При размораживании все манипуляции с эмбрионами/ооцитами выполняет научный персонал, в асептических условиях, под контролем стереомикроскопа (х60 кратное увеличение).

8.5. Во всех случаях размораживание криопаетки с эмбрионами/ооцитами, проводят быстрым способом (путем погружения в водяную баню при температуре 37С на 30 секунд) согласно СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП.

8.6. При отборе эмбрионов/ооцитов после восстановительного размораживания необходимо руководствоваться требованиями СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП, согласно которым отбирают только эмбрионы/ооциты высокого качества по результатам проведенного морфологического анализа. Эмбрионы/ооциты, не соответствующие установленным критериям, для процедуры трансплантации не используют.

8.7. Приготовление стоковых растворов для оттаивания необходимо выполнять в асептических условиях, с применением коммерческих реактивов (ПРИЛОЖЕНИЕ З) за день до проведения процедуры размораживания (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП). Необходимо строго соблюдать концентрацию готовых растворов.

8.8. Взвешивание сухих компонентов растворов для оттаивания необходимо проводить только с использованием прецизионных лабораторных весов (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Т» СОП). Использованные одноразовые материалы и колюще-режущие предметы необходимо с осторожностью утилизировать, согласно «Инструкции по обращению с биологическими отходами».

8.9. Основным условием при проведении процедуры размораживания криосохраненных эмбрионов/ооцитов является строгое соблюдение временных интервалов нахождения сохраняемого материала в растворах для оттаивания. На всех этапах размораживания необходимо использовать электронный таймер/секундомер (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП).

8.10. При проведении восстановления единиц хранения коллекционного фонда, размораживание проводят за 2 суток до предполагаемой даты трансплантации самкам-

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Издание: 1

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 9 из 22

реципиентам (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП).

9. Требования при выборе и подготовке животных-реципиентов для проведения трансплантации генетического материала

9.1. Для реализации восстановительного размораживания всегда готовят самок-реципиентов, которым проводят трансплантацию размороженного генетического материала (эмбрионы/ооциты).

9.2. Для трансплантации генетических ресурсов используют только здоровых животных (по результатам лабораторного контроля состояния здоровья (Программа по содержанию и использованию животных) согласно профилю FELASA (Рекомендации по мониторингу здоровья колоний грызунов и кроликов FELASA, 2014) и на основании клинического осмотра (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «В» СОП)). Ответственность за подготовку животных-доноров лежит на ветеринарном враче ПЛЖ.

9.3. В качестве реципиентов используют половозрелых гибридных псевдобеременных самок первого поколения, полученных от скрещивания линейных животных (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «У» СОП; СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Х» СОП).

9.4. Количество самок-реципиентов всегда готовят вдвое большее, чем предполагаемое число трансплантаций.

9.5. Сбор и подготовку генетического материала (эмбрионы/ооциты) выполняет научный персонал или ветврач, в асептических условиях, под контролем стереомикроскопа (x60 кратное увеличение)

9.6. Трансплантацию генетического материала (эмбрионы/ооциты) самкам-реципиентам выполняют нехирургическим методом (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП). Запись о проведенных процедурах фиксируют в таблице (ПРИЛОЖЕНИЕ Д).

9.7. Полученных в результате трансплантации животных подвергают генетическому и микробиологическому контролю в аккредитованных лабораториях.

10. Требования к условиям хранения генетического материала

10.1. Генетический материал размещают в криохранилище в толще жидкого азота. Контроль за уровнем азота в криохранилище выполняют двумя способами: визуальным - с помощью криолинейки, во время доливки жидкого азота (не реже 1-го раза в 15 дней) и автоматизированным - с помощью системы контроля за уровнем жидкого азота в хранилище.

10.2. После проведения доливки жидкого азота из заправочных сосудов Дьюара сделать запись в «Карточке контроля за условиями хранения генетического материала» (ПРИЛОЖЕНИЕ Ж).

10.3. Криохранилище располагается в отдельном специально оборудованном помещении, обеспечивающем ограничение доступа для неавторизованного персонала (Приказ Минздрава России "Об утверждении требований к организации и деятельности биобанков и правил хранения биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинских клеточных продуктов").

10.4. Генетический материал одного вида (полученный от одной линии животных) равными частями размещают на хранение в два физически разделенных криохранилища, для улучшения сохранности.

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Издание: 1

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 10 из 22

10.5. В случае внештатных/чрезвычайных ситуаций в ПЛЖ, в результате которых может возникнуть угроза потери генетического материала, необходимо принять меры по эвакуации криохранилища согласно СО ПЛЖ 20-17.

10.6. В качестве альтернативных средств для надежного сохранения материала выполняют передачу генетического материала ПЛЖ в авторизованные центры криохранения (например, в Центр генетических ресурсов лабораторных животных, ИЦиГ СО РАН).

11. Маркировка и учет единиц хранения

11.1. Маркировочное оборудование должно обеспечивать печать этикеток высокой стойкости, сохранность маркировки в условиях низких температур (Приказ Минздрава России "Об утверждении требований к организации и деятельности биобанков и правил хранения биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинских клеточных продуктов").

11.2. В ПЛЖ для маркировки учета единиц хранения используют следующие материалы:

- криоустойчивый маркер для маркировки паеток и гоблетов, который сохраняется на поверхности материалов при температуре жидкого азота.
- самоклеящиеся этикетки высокой стойкости с термотрансферным способом нанесения информации для маркировки гоблетов (клеевая основа соответствует санитарно-гигиеническим требованиям).

11.3. Маркировка паеток и гоблетов выполняется в соответствии с требованиями СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «Р» СОП.

11.5. Учет единиц хранения осуществляется путем внесения информации о каждой единице в систему регистрации. Система регистрации продублирована на бумажном (ПРИЛОЖЕНИЕ Г, ПРИЛОЖЕНИЕ Е) и электронном носителях (электронная таблица Google).

12. Порядок оформления документов и регистрации данных

12.1. Регистрация данных по проведению одного цикла криоконсервации генетических ресурсов (все планируемые работы с животными-донорами, животными- реципиентами, а также культуральные работы) отражается в ПРИЛОЖЕНИИ В.

12.2. В таблице учета и движения генетического материала (ПРИЛОЖЕНИЕ Д) отражается информация о полученном материале и этапах проведения замораживания-размораживания (ПРИЛОЖЕНИЕ Г).

12.3. При закладке криопаеток с генетическим материалом (эмбрионы/ооциты) в криохранилище и после проведения контрольного/восстановительного размораживания необходимо вносить сведения в «Лист маркировки и учета криопаеток и гоблетов» (Приложение Е).

12.4. Аккредитованная лаборатория выполняет биологический контроль на отсутствие специфических мышинных вирусов, бактерий и микоплазм (по профилю FELASA) и оформляет результаты исследований в виде серологического и бактериологического отчетов.

12.5. Результаты исследований генотипа полученных лабораторных животных оформляются в виде отчета о проведенном генотипировании сторонней организацией на бланке организации.

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 11 из 22

Издание: 1

13. Требования к используемым материалам и оборудованию

13.1. Все используемые материалы должны быть стерильными, не токсичными, апирогенными, с актуальным сроком хранения.

13.2. Термостабильные материалы стерилизуют перегретым паром под давлением в автоклаве (СО ПЛЖ 02-17, п.2, раздел «С» СОП), а внешнюю упаковку термостабильных материалов обрабатывают 10% раствором перекиси водорода с добавлением детергента.

13.3. При криосохранении генетического материала используют только стерильные коммерческие буферы, культуральные среды и пластик (ПРИЛОЖЕНИЕ И), внешняя упаковка которых не должна иметь дефектов и повреждений.

13.4. Используемое оборудование, требующее регулярной поверки, должно иметь действующий срок поверки согласно СО ПЛЖ 12-17.

14. Ответственность и полномочия персонала

14.1 Ответственность за координацию работ и организацию четкого взаимодействия структурных групп Питомника при разработке новой продукции возлагается на заведующего Питомником.

14.2 Ответственность за организацию мониторинга здоровья животных и проведение трансплантации размороженного генетического материала возлагается на ветеринарного врача.

14.3 Ответственность за организацию и проведение работ по гормональной подготовке доноров, а также за последующий уход, возлагается на персонал по уходу за лабораторными животными и ветврача.

14.4. Ответственность за организацию и проведение работ по вымыванию, замораживанию, размораживанию и трансплантации генетического материала, а также за контролем условий хранения, возлагается на научного сотрудника.

14.5 Полномочия персонала, осуществляющего выполнение мероприятий, направленных на выявление и обеспечение запросов потребителей, проведение соответствующих работ, определены должностными инструкциями.

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Издание: 1

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 12 из 22

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

Сокращения и их обозначения

РАН	Российская академия наук
ПЛЖ	Питомник лабораторных животных
ИСО	Международная Организация по Стандартизации
СО	Стандарт организации
ЭТ	Эмбриотрансфер
СОП	Стандартная операционная процедура
ГМЖ	Геномодифицированные животные
СанПин	Санитарно-эпидемиологические правила и нормы
ЧС	Чрезвычайная ситуация
«В»	Ветеринария
«Р»	Криосохранение генетических ресурсов
«С»	Санитария
«Т»	Техника
«У»	Уход
«Х»	Хирургия
SPF	Свободные от специфицированной патогенной микрофлоры
RF	Быстрое замораживание в жидком азоте
SuperOva	Гормональная стимуляция доноров
I гормон	Гормон сывороточный гонадотропин жеребых кобыл
II гормон	Гормон человеческий хорионический гонадотропин
OVA	Общее количество вымытых эмбрионов
ET-FT	Пересадка заморожено–оттаянных эмбрионов
ET-FTC	Пересадка заморожено–оттаянных и культивированных
FELASA	Federation for Laboratory Animal Science Associations

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

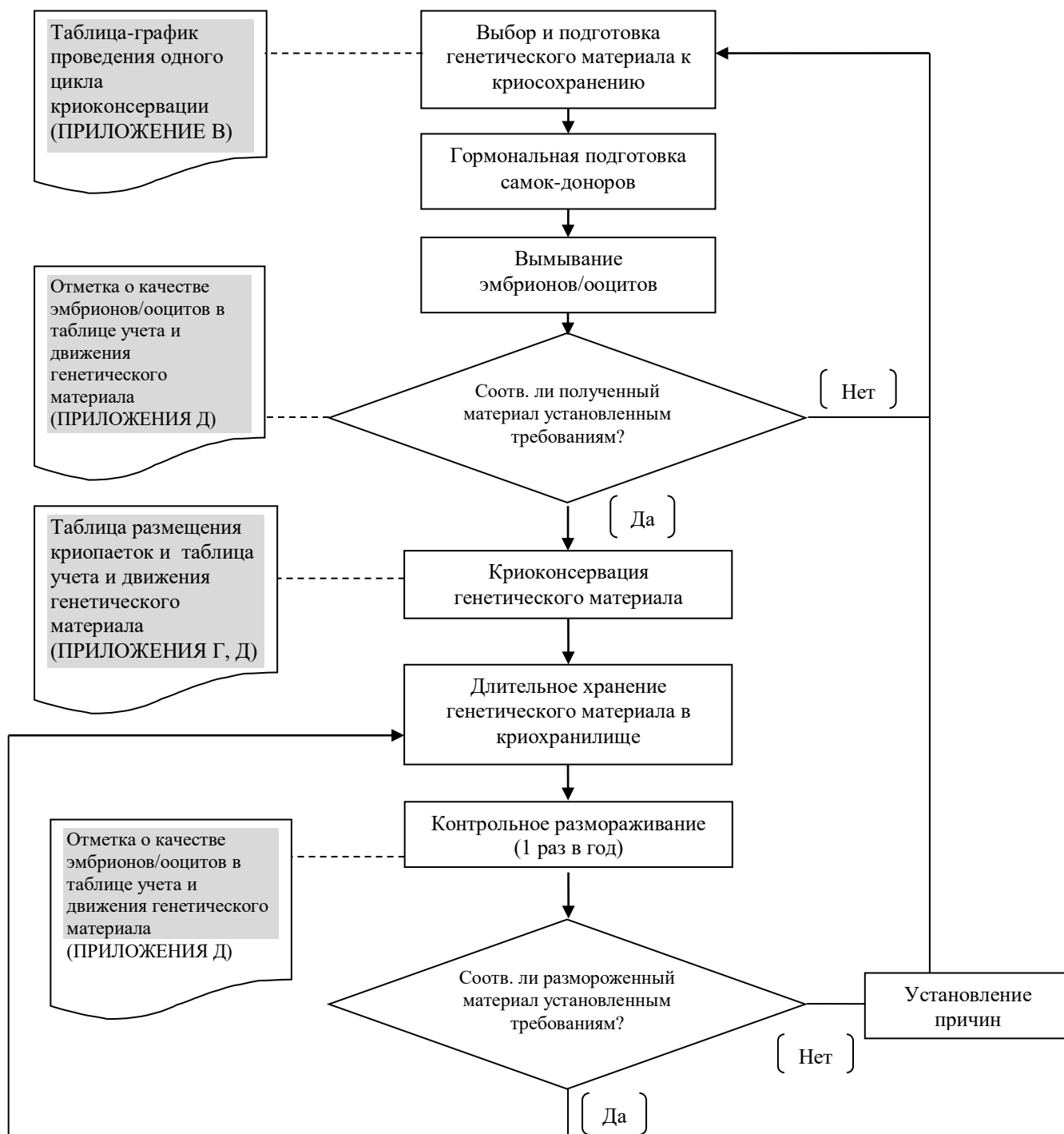
СО ПЛЖ 19-17

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 13 из 22

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Схема криосохранения генетического материала



Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Издание: 1

Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника

Стр. 14 из 22

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица-график проведения одного цикла криоконсервации

Быстрое замораживание

2017

Начало вымывания и осмотр пробок – 09:00

Дата/день Вид Линия	24.08 Чт	25.08 Пт	26.08 Сб	27.08 Вс	28.08 Пн	29.08 Вт	Примечания

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17
Издание: 1

**Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника**

Стр. 15 из 22

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Таблица размещения криопаеток с эмбрионами в криохранилище

№ гобле та	Стакан № (цвет:)				Расход / дата	Примечания
	цвет/ пп.№	Дата заморажива ния	Линия	Кол-во эмбрионов		

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН		
СО ПЛЖ 19-17 Издание: 1	Система менеджмента качества Криосохранение генетических ресурсов Питомника	Стр. 16 из 22

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Таблица учета и движения генетического материала

ДОНОРЫ _____ () S _____ ET-FT _____ Дата _____			РЕЦИПИЕНТЫ Дата _____ Синхронизация: _____						Примечания	Результат ЭТ				
Эмбрионы до заморозки	Код паетки (кол-во эмбр-ов)	Эмбрионы после размораживания		№ операции	Линия	Место ЭТ	Эмбрионы	ЭТ						
		Кол-во	Норма					Яичник			Супра- ренин	Матка	Общее качество	
O V A	Норма													
		_____/1 ()					ЛР / ЛЯ							
				1			ПР / ПЯ							
							ПР / ПЯ							
							ПР / ПЯ							

- OVA** – дается общее количество вымытых эмбрионов. **Норма** – Общее количество эмбрионов находящихся на соответствующей стадии развития.
- Код паетки (кол-во эмбр-ов)** – пишется код, соответствующий записи в тетради (ком. 208) и количество эмбрионов в каждой паетке.
- Кол-во** – указывается, сколько эмбрионов осталось после процедуры размораживания. **Норма** – сколько эмбрионов достигли стадии бластоцисты (в случае с культивированием) или сколько нормальных 8-клеточных эмбрионов было после разморозки (без культивирования).
- Место ЭТ** – ЛР, ПР – левый, правый рог, ЛЯ, ПЯ – левый, правый яйцевод (ненужное вычеркнуть).
- Эмбрионы** - например (**ET-FT6 -8к-5**) – означает, что пересажено 6 шт, 8кл. заморожено –оттаянных эмбриона, отличного качества.
- Яичник, Матка** - дается оценка для каждого пункта по 5-ти бальной шкале.
- Супраренин** – использовали (+) или не использовали (-).
- Общее качество ЭТ** – если стриппер вошел плавно и столбик с эмбрионами выдавился беспрепятственно – 5, далее по убыванию.
- Синхронизация -- например: **«4/3»** – означает, что у Д - 4-й день эструса, а у Р – 3-й. ЭТ асинхронно с отставанием 1 день.

Принятые сокращения: **ET-FT** – пересадка заморожено –оттаянных эмбрионов. **ET-FTC** – пересадка заморожено –оттаянных и культивированных эмбрионов. **RF** – быстрое замораживание. **S + / S –** – эмбрионы, полученные после суперовуляторной обработки (*описать подробно на обратной стороне листа*) или БЕЗ суперовуляции.

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН		
СО ПЛЖ 19-17 Издание: 1	Система менеджмента качества Криосохранение генетических ресурсов Питомника	Стр. 18 из 22

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Карточка контроля за условиями хранения генетического материала

Дата заливки азота	Оценка	Уровень азота в дьюаре	Подпись проверяющего

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17

Издание: 1

**Система менеджмента качества
Криосохранение генетических ресурсов
Питомника**

Стр. 19 из 22

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Список расходных материалов и реактивов

№	Название	кат# №	Производитель
1	Криопаетки		BioCane
2	Чашка Петри, 60 мм	430589	Corning
3	Чашка Петри, 100 мм	430591	Corning
4	4-луночный планшет	176740	Nunc
5	Центрифужные пробирки, 50 мл	312354	Corning
6	Центрифужные пробирки, 15 мл	134235	Corning
7	Пробирки типа Эппендорф, 1,5 мл	233455	Corning
8	Одноразовые наконечники на 1000 мл	532153	Eppendorph
9	Одноразовые наконечники на 200 мл	253555	Eppendorph
10	Контейнер Шарпа		Клиндез
11	Пластиковые капилляры для микропипетки (Ø 200 мкм)	MTX-200	Origio
12	Шприцы инсулиновые с несъемной иглой	G29	SFM
13	Катетер гибкий для внутривенного вливания Flexicath	G 29	Apexmed
14	Алюминиевые держатели для паеток (гоблет)	343234	CryoBioSystem
15	Маркер криоустойчивый для записи	245235	CryoBioSystem
16	Физиологический раствор	400 мл	Фарммед
17	Картридж для портативного принтера BMP21	BMP21-Neylon-21	Brady
18	Драпировочная пленка	Op-Site	Sinohero
19	Дезинфицирующие салфетки «Лизаксин»	-	Sigma
20	трипсина	T-2345	Sigma
21	среда M2	MR-015-D	Millipore
22	Дезинфектант	Лизоформин 3000	Lisoform
23	среда M16	MR-016-D	Millipore
24	Кожный антисептик «Sterisol»		Клиндез
	Гормон сывороточный гонадотропин жеребых кобыл (ГСЖК), лиофил., 1000 МЕ	Hor-272	Prospecbio
26	Гормон человеческий хорионический гонадотропин (чХГ), лиофил., 1500 МЕ	Hor-250-A	Prospecbio
27	DPBS	S-D6429-0.5	Sigma
28	BSA	A3311-10g	Sigma
29	Глицерин, >99%	G5516-100ml	Sigma
30	Пропиленгликоль, >99%	P2637-100ml	Sigma
31	Сахароза, >99%	S0389-500G	Sigma
32	Одноразовые лезвия	N15	Paragon

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17 Издание: 1	Система менеджмента качества Криосохранение генетических ресурсов Питомника	Стр. 20 из 22
----------------------------	--	---------------

ПРИЛОЖЕНИЕ К

(обязательное)

Список оборудования

№	Название	Модель	Производитель
1	Автоматический CO ₂ инкубатор	NU-5510 E	Nuaire
2	Инвертированный микроскоп	CKX41SF2	Olympus
3	Программный замораживатель	Bio-Cool 2	FTS Systems
4	Биноккулярная лупа (Olympus)	Биноккулярная лупа (Olympus)	Биноккулярная лупа (Olympus)
5	Биноккуляр	МБС-10	Россия, ЛЗОС
6	Микропипетка-стриппер	Stripper MXL3-STR	MidAtlantic Diagnostics
7	Криохранилище с системой контроля уровня жидкого азота и подставкой на колесиках Locator 8	BioCane 73	Thermo
8	Автоматическая пипетка	ER-1000	Eppendorph
9	Автоматическая пипетка	ER-200	Eppendorph
10	Автоматическая пипетка	ER-10	Eppendorph
11	Ножницы остроконечные прямые	H-1392	ПТО Медтехника
12	Ножницы глазные остроконечные вертикально изогнутые	H-1372	ПТО Медтехника
13	Ножницы роговичные по Кастровъехо	H-1324	ПТО Медтехника
14	Пинцет хирургический общего назначения	П-2934	ПТО Медтехника
15	Пинцет глазной прямой	П-2391	ПТО Медтехника
16	Пинцет большой анатомический 250 мм	П-1293	ПТО Медтехника
17	Ножницы остроконечные прямые	H-1349	ПТО Медтехника
18	Ножницы глазные остроконечные вертикально изогнутые	H-1328	ПТО Медтехника
19	Шкаф с ламинарным потоком воздуха	L-202-cdnee	BioSafe
20	Принтер портативный термотрансферный BMP21	BMP21	Brady
21	Прецизионные лабораторные весы	4566723	Sartorius
22	Программный замораживатель, блок управления и блок замораживания	BioCool-II, FTS	
23	Электронный таймер	-	Brady
24	Настольный сухожаровой стерилизатор инструментов		Brady

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17 Издание: 1	Система менеджмента качества Криосохранение генетических ресурсов Питомника	Стр. 21 из 22
----------------------------	---	---------------

Заведующий Питомником

Научный сотрудник

Инженер по качеству

Руководитель по СМК

Руководитель группы технологии производства

Телегин Г.Б. «04» октябрь 2017 г.

Чернов А.С. «02» октябрь 2017 г.

Соломина Г.А. «09» октябрь 2017 г.

Цубин А.С. «09» октябрь 2017 г.

Широкова Л.А. «09» октябрь 2017 г.

Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН

СО ПЛЖ 19-17 Издание: 1	Система менеджмента качества Криосохранение генетических ресурсов Питомника	Стр. 22 из 22
----------------------------	--	---------------

Лист регистрации изменений

Номер измене- ния	Номер листа				Номер докумен та	Подпись	Дата внесения измене- ния	Дата введения измене- ния
	изменен -ного	заменен -ного	нового	аннулир ованног о				

Лист учета копий документов СМК

№ учтенного экз.	Дата получения	Организация и/или лицо, получившее копию	Подпись	Лицо выдавшее копию документа	Подпись

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ «ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА и Ю.А. ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» (ИБХ РАН)

«УТВЕРЖДАЮ»
ВРИО директора ИБХ РАН
доктор химических наук
академик



А.Г. Габибов

**ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ
биоресурсной коллекции**

**«КОЛЛЕКЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ SPF СТАТУСА ДЛЯ
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ, БИМЕДИЦИНСКИХ И
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ»**

Москва – 2017

Содержание

1. Характеристика биоресурсной коллекции	3
2. Общая технологическая схема	4
3. Перечень используемых СОП	14

1. ХАРАКТЕРИСТИКА БИОРЕСУРСНОЙ КОЛЛЕКЦИИ

Наименование биоресурсной коллекции: Коллекция лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований.

Назначение: предоставление исследователям стандартизованных лабораторных животных для получения надежных и воспроизводимых результатов медико-биологических экспериментов.

Состав: коллекция содержит 37 единиц хранения аутбредных, инбредных и геномодифицированных мелких лабораторных грызунов (мыши, крысы, хомяки), включая 13 единиц ранних эмбрионов мышей в криохранилище.

Упаковка: Живые животные содержатся в стандартных клетках в барьерных зонах с контролируемыми микробиологическими и климатическими условиями. Ранние эмбрионы мышей и ооциты хомяков замораживают в пластиковых криопаятках.

Хранение: Хранение осуществляют при температуре минус 196°С в жидком азоте. Контроль за условиями хранения осуществляют с помощью автоматической системы контроля уровня жидкого азота в криохранилище. Для криохранилища составляют опись хранящихся в нем образцов генетического материала с указанием необходимой информации.

Срок хранения: бессрочное хранение ранних эмбрионов мышей и ооцитов хомяков в криохранилище с 2011 года по настоящее время.

2. ОБЩАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА

Таблица – Основные стадии технологического процесса (ТП).

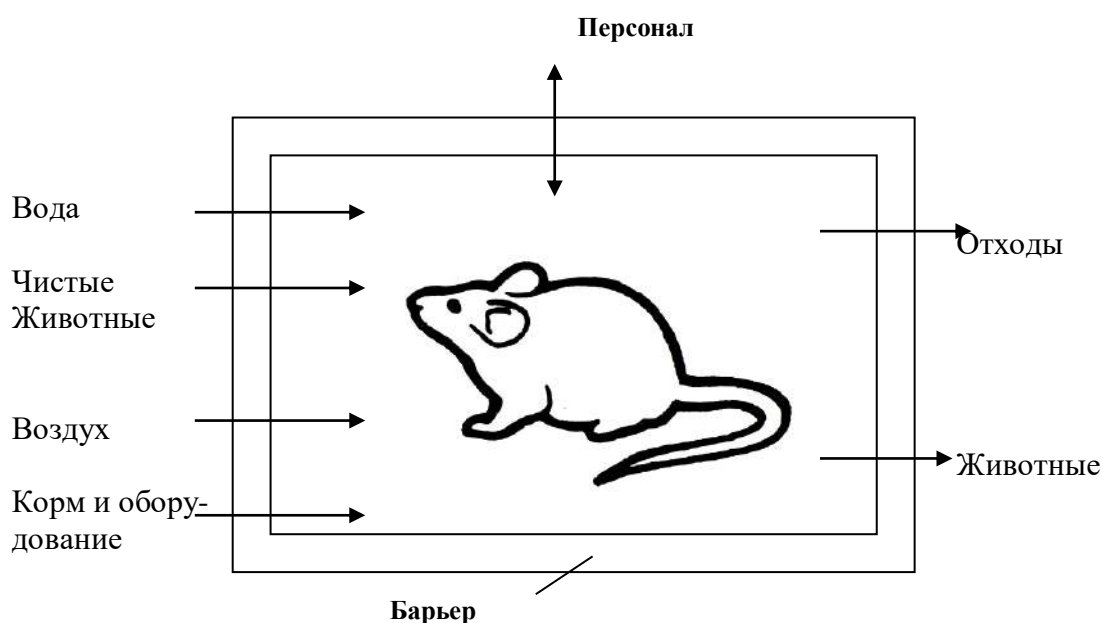
	Наименование стадий ТП	Перечень используемых операций	Используемые СОП
1	ТП – 1. Порядок обеспечения микробиологической целостности производственных помещений Питомника	Подготовка и дезинфекция материалов и оборудования, применяемых на «чистой территории» в небольших количествах; Стерилизация материалов в автоклаве и сухожаровоздушном стерилизаторе; Уборка и дезинфекция производственных помещений; Уборка и дезинфекция помещений, находящихся за пределами чистых производственных зон.	СОП 1С, СОП 2С, СОП 3С, СОП 4С, СОП 5С, СОП 6С, СОП 8С, СОП 9С, СОП 10С, СОП 12С, СОП 15С, СОП 17С, СОП 20С, СОП 22С, СОП 28С, СОП 30С, СОП 32С, СОП 35С, СОП 40С, СОП 42С, СОП 5Д, СОП 6Д, СОП 7Д, СОП 10Д.
2	ТП – 2. Управление процессами производства.	Управление техническим состоянием оборудования; Управление параметрами производственной среды; Управление сырьем, вспомогательными материалами перед использованием и в процессе производства; Управление технологическими процессами.	СОП 1Т, СОП 2Т, СОП 3Т, СОП 4Т, СОП 5Т, СОП 6Т, СОП 7Т, СОП 8Т, СОП 9Т, СОП 11Т, СОП 12Т, СОП 13Т, СОП 14Т, СОП 15Т, СОП 16Т, СОП 17Т, СОП 18Т, СОП 19Т, СОП 20Т, СОП 21Т, СОП 22Т, СОП 23Т, СОП 25Т, СОП 26Т.
3	ТП – 3. Контроль качества в процессе производства и поставки продукции	Проведение контроля производственной среды; Проведение технологического контроля; проведение контроля продукции в процессе производства; проведение контроля продукции в процессе поставки; проведение работ с несоответствующей продукцией.	СОП 1КК, СОП 2КК, СОП 3КК, СОП 4КК, СОП 5КК, СОП 6КК, СОП 7КК, СОП 8КК, СОП 9КК, СОП 10КК, СОП 11КК, СОП 12КК.
4	ТП – 4. Управление несоответствующей продукцией	Управление несоответствующей продукцией при входном контроле; управление несоответствующей продукцией в процессе производства; управление несоответствующей	СОП 1КК, СОП 2КК, СОП 3КК, СОП 4КК, СОП 5КК, СОП 6КК, СОП 7КК, СОП 8КК, СОП 9КК, СОП 10КК, СОП 11КК, СОП 12КК,

Приложение 11 Техпаспорт. 4

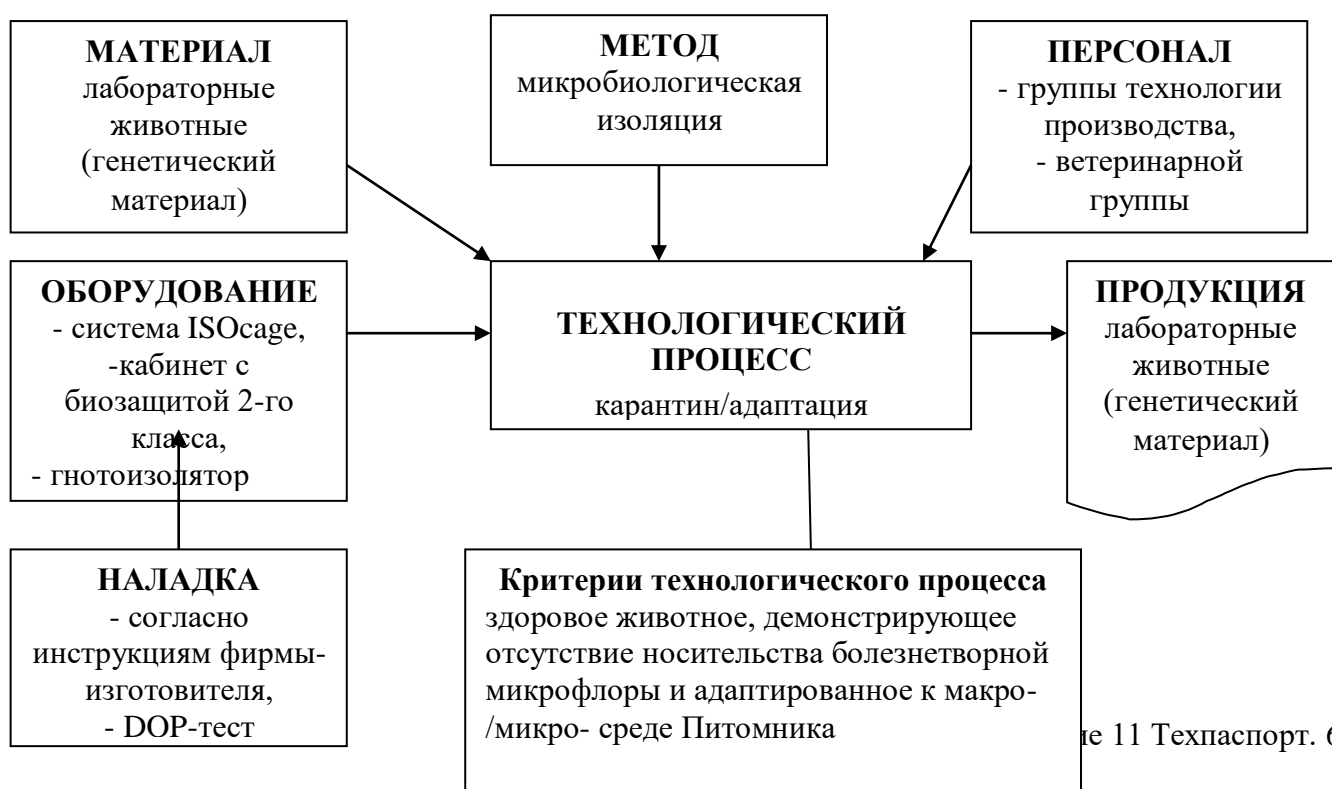
		готовой продукцией в процессе разведения, экспедиции и поставки; Анализ причин и разработка мер по предупреждению несоответствий.	1К, 5К, 8К, 9К, 11К.
5	ТП – 5. Правила содержания и разведения лабораторных животных	Разведение линейных мышей и крыс в племенном ядре; Разведения линейных мышей и крыс в товарном стаде; Разведения нелинейных мышей, крыс и хомяков в племенном ядре; Разведения нелинейных мышей, крыс и хомяков в товарном стаде; Содержание лабораторных мышей, уход за ними в племенном ядре и в товарном стаде; Содержание лабораторных крыс, уход за ними в племенном ядре, товарном стаде и экспедиции; Содержание лабораторных хомяков, уход за ними в племенном ядре, товарном стаде и экспедиции; Содержание иммунодефицитных мышей в IVC. Содержание мышей в изоляторах ISO cage.	СОП 3У, СОП 4У, СОП 5У, СОП 6У, СОП 7У, СОП 9У, СОП 10У, СОП 11У, СОП 12У, СОП 16У, СОП 18У, СОП 19У, СОП 1В, СОП 2В, СОП 3В, СОП 4В, СОП 5В, СОП 6В, СОП 7В, СОП 8В, СОП 9В, СОП 10В, СОП 11В, СОП 12В, СОП 13В, СОП 14В, СОП 15В.
6	ТП – 6. Криосохранение генетических ресурсов Питомника	Выбор и подготовка животных-доноров для криосохранения генетического материала; Контроль качества криосохраняемого материала; Выполнение замораживания эмбрионов/ооцитов; Выполнение размораживания эмбрионов/ооцитов; Выбор и подготовка животных-реципиентов для проведения трансплантации генетического материала; Условия хранения генетического материала; Маркировка и учет единиц хранения.	СОП 1Р, СОП 2Р, СОП 3Р, СОП 4Р, СОП 5Р, СОП 6Р, СОП 7Р, СОП 8Р.

Технологические схемы поддержания и развития биоресурсной коллекции лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований.

1. Схема движения основных потоков людей и материалов по различным блокам и зонам Питомника

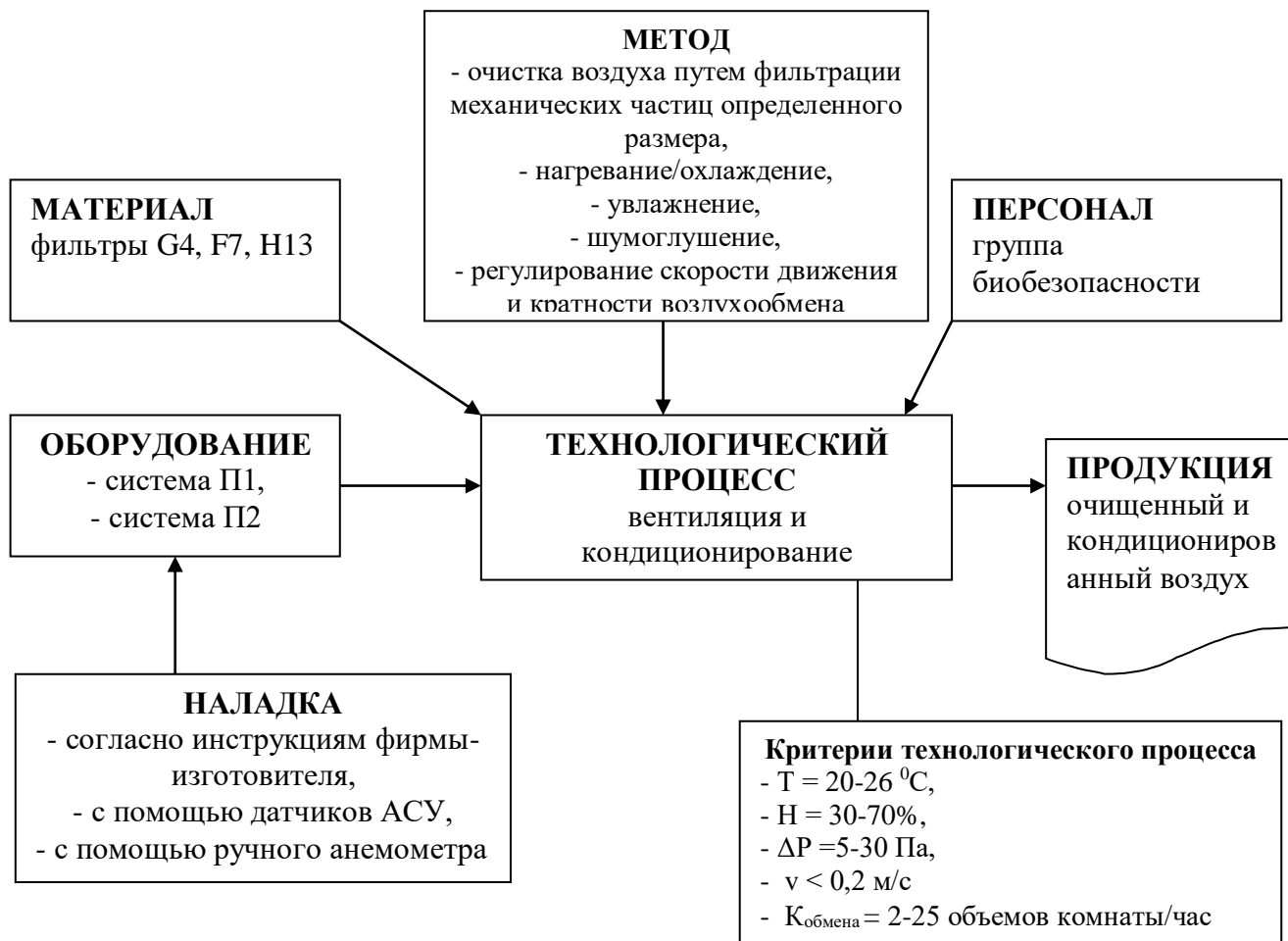


2. Схема приема животных, карантинирование/адаптация

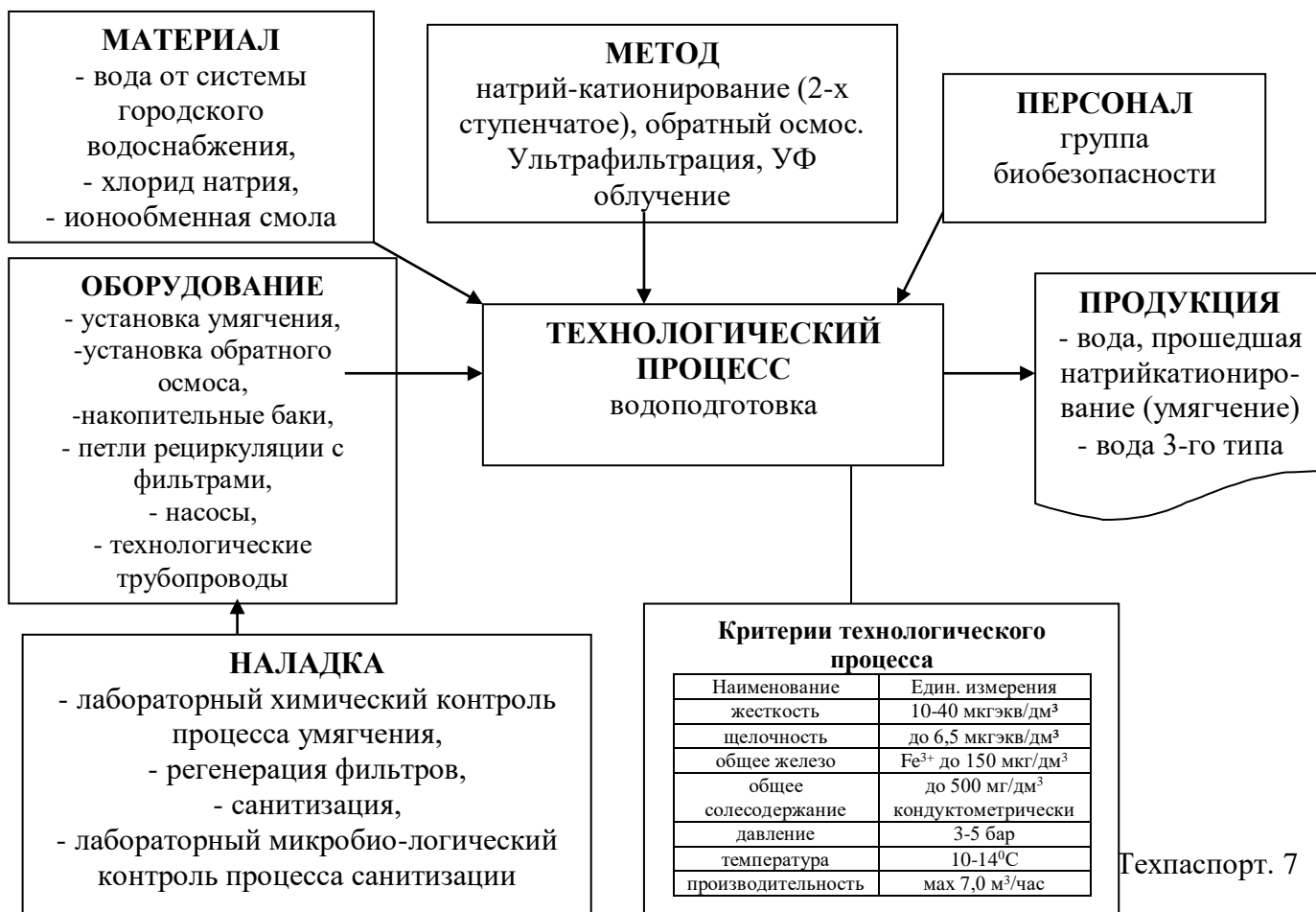


е 11 Техпаспорт. 6

3. Схема вентиляции и кондиционирования

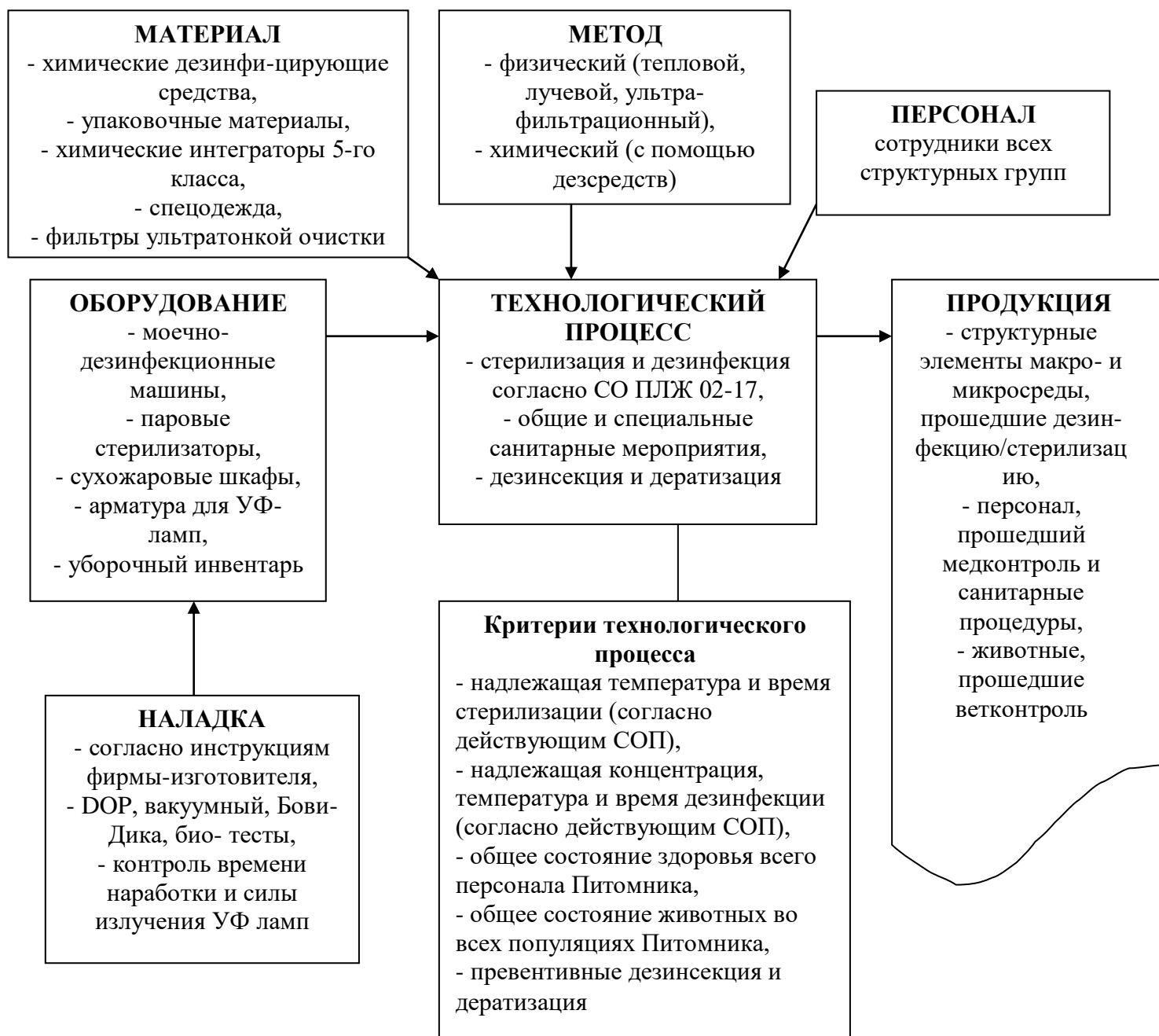


4. Схема водоподготовки

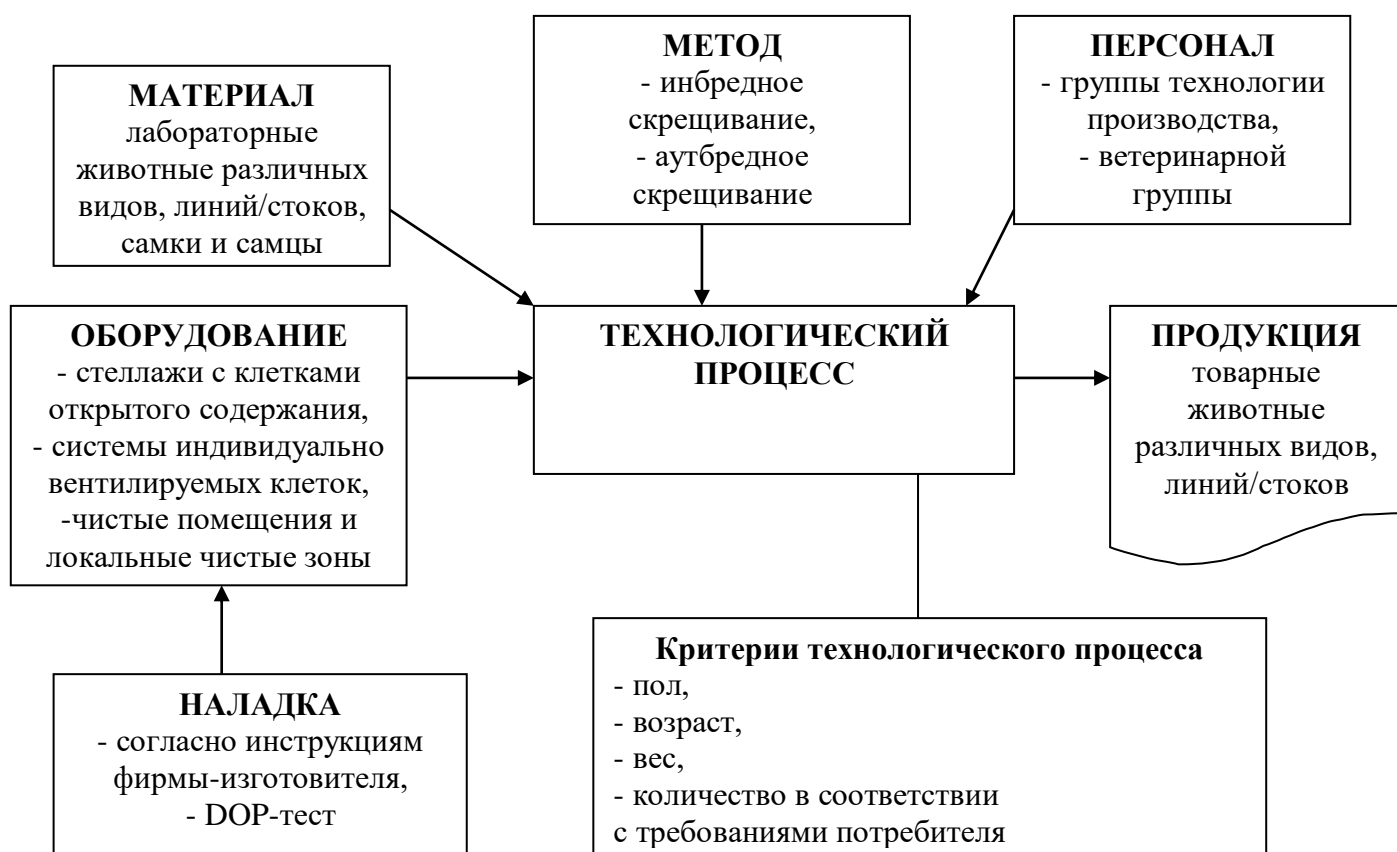


Техпаспорт. 7

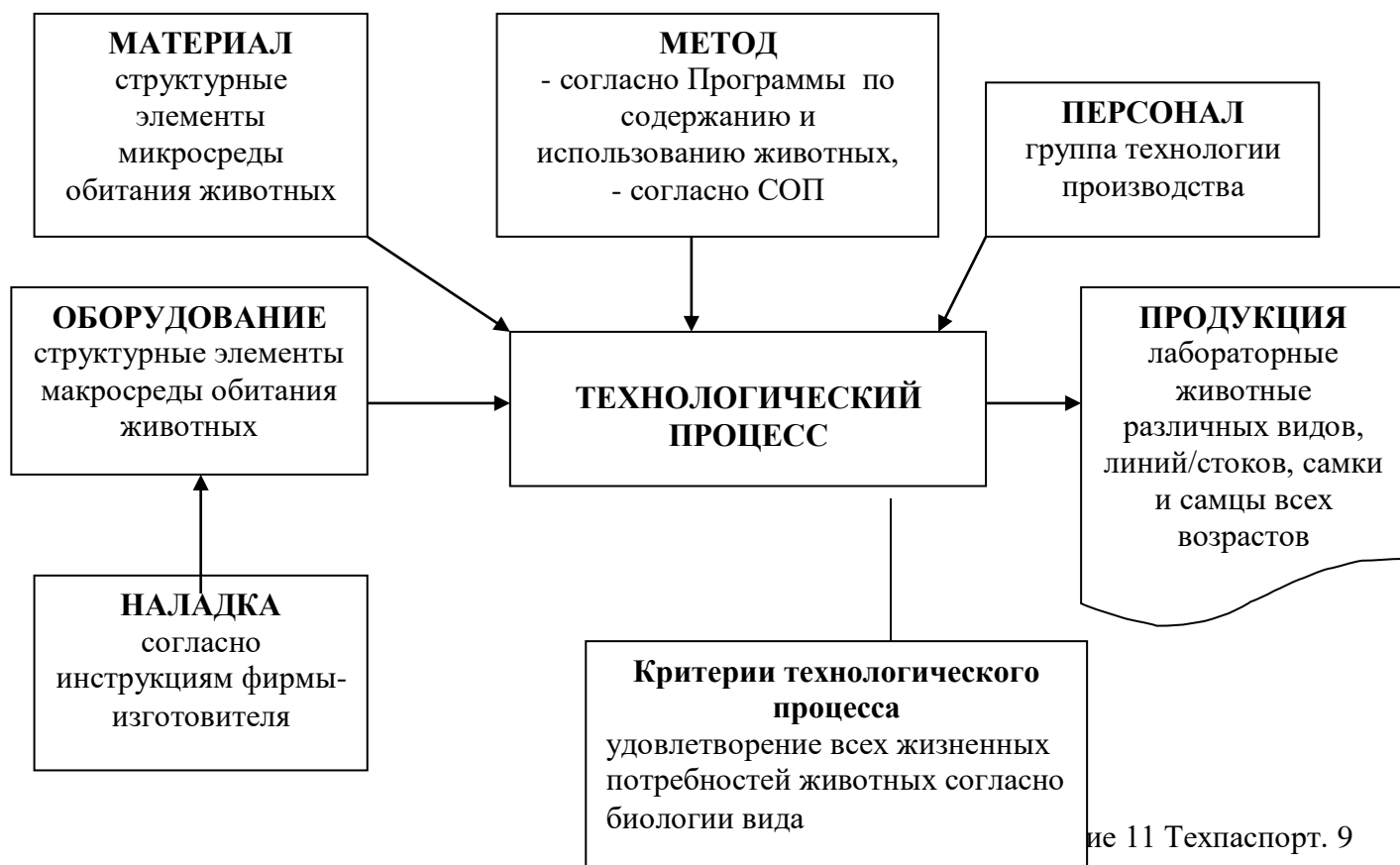
5. Схема стерилизации, дезинфекции, санитарии



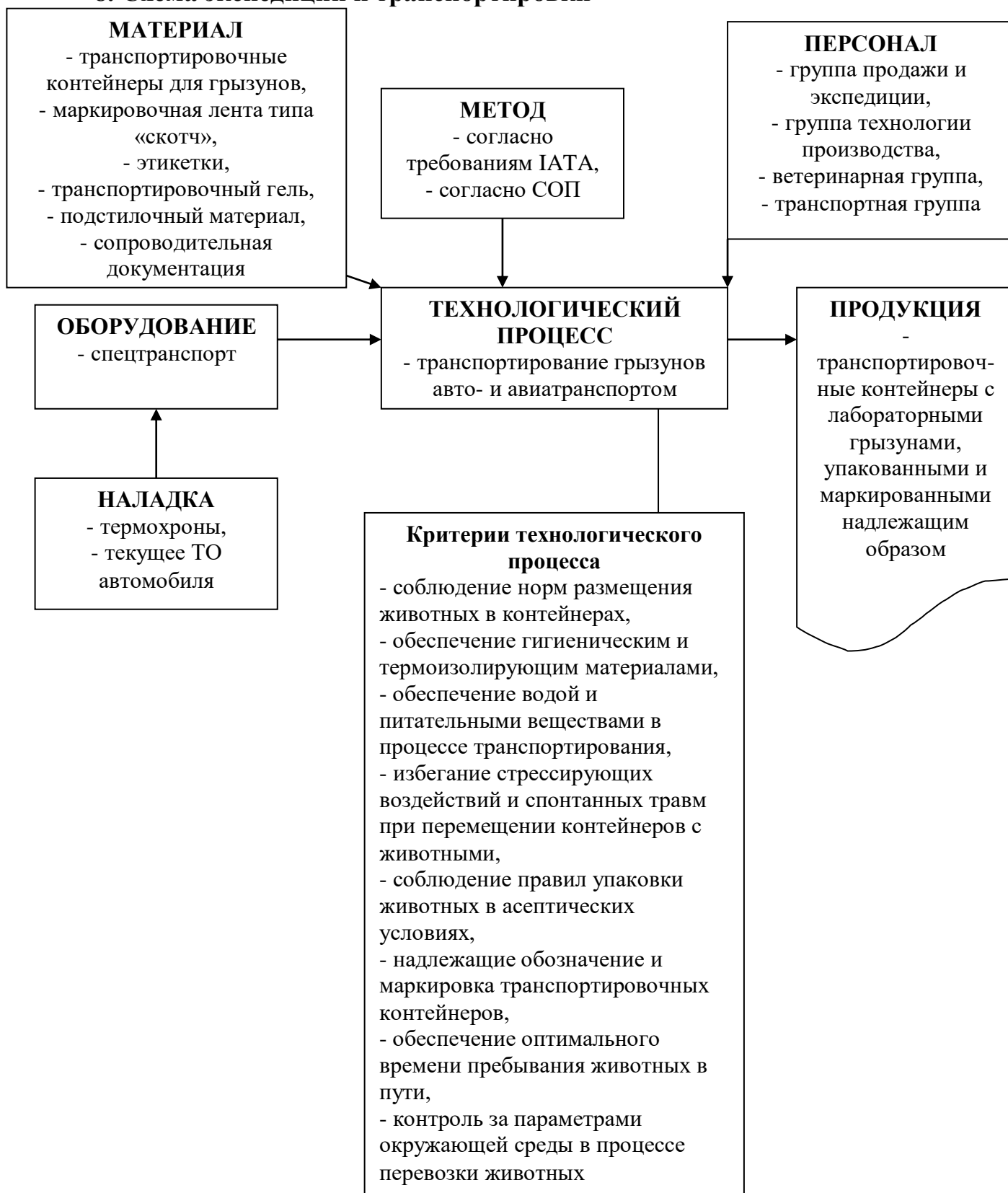
6. Схема разведения



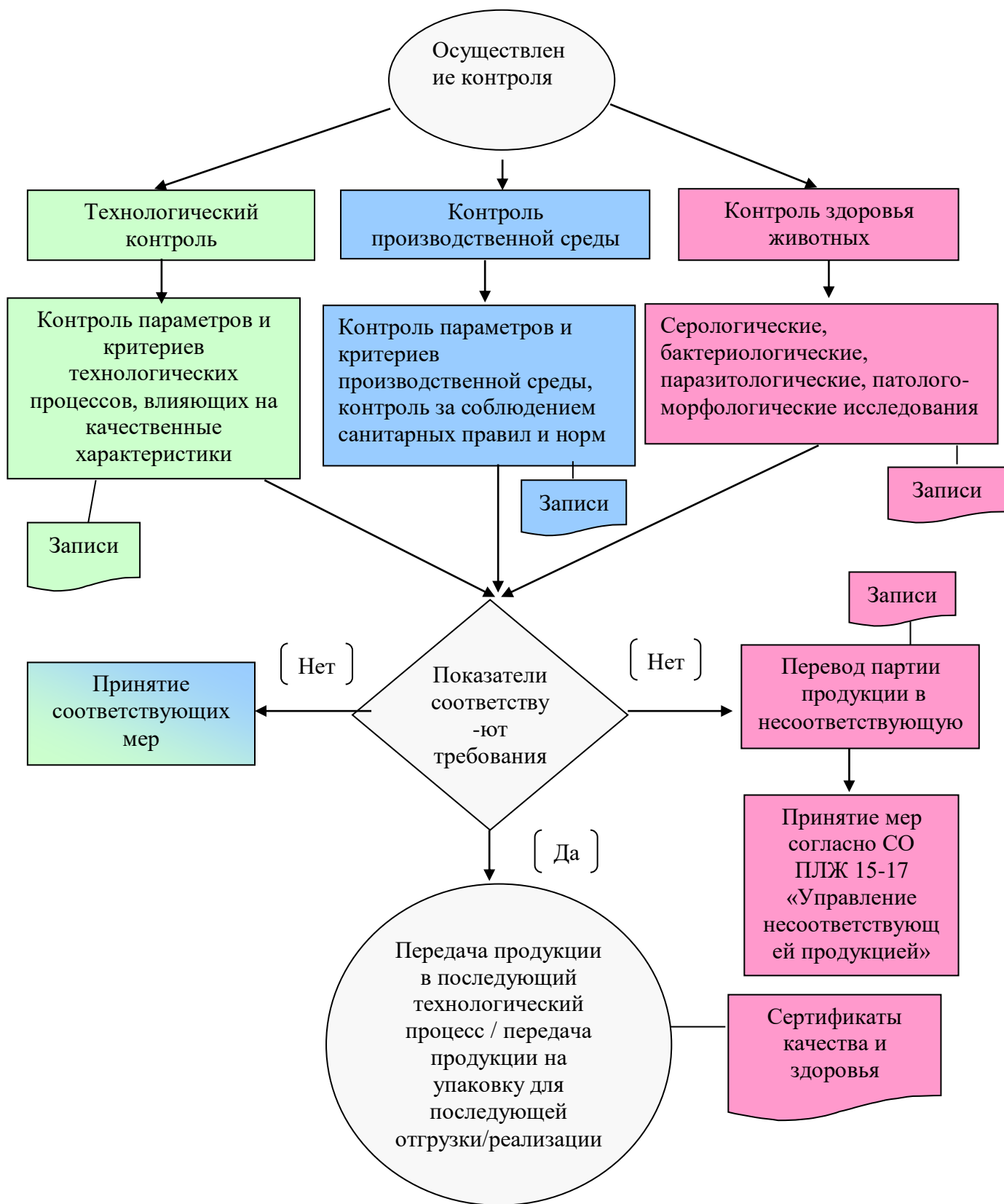
7. Схема ухода и содержания



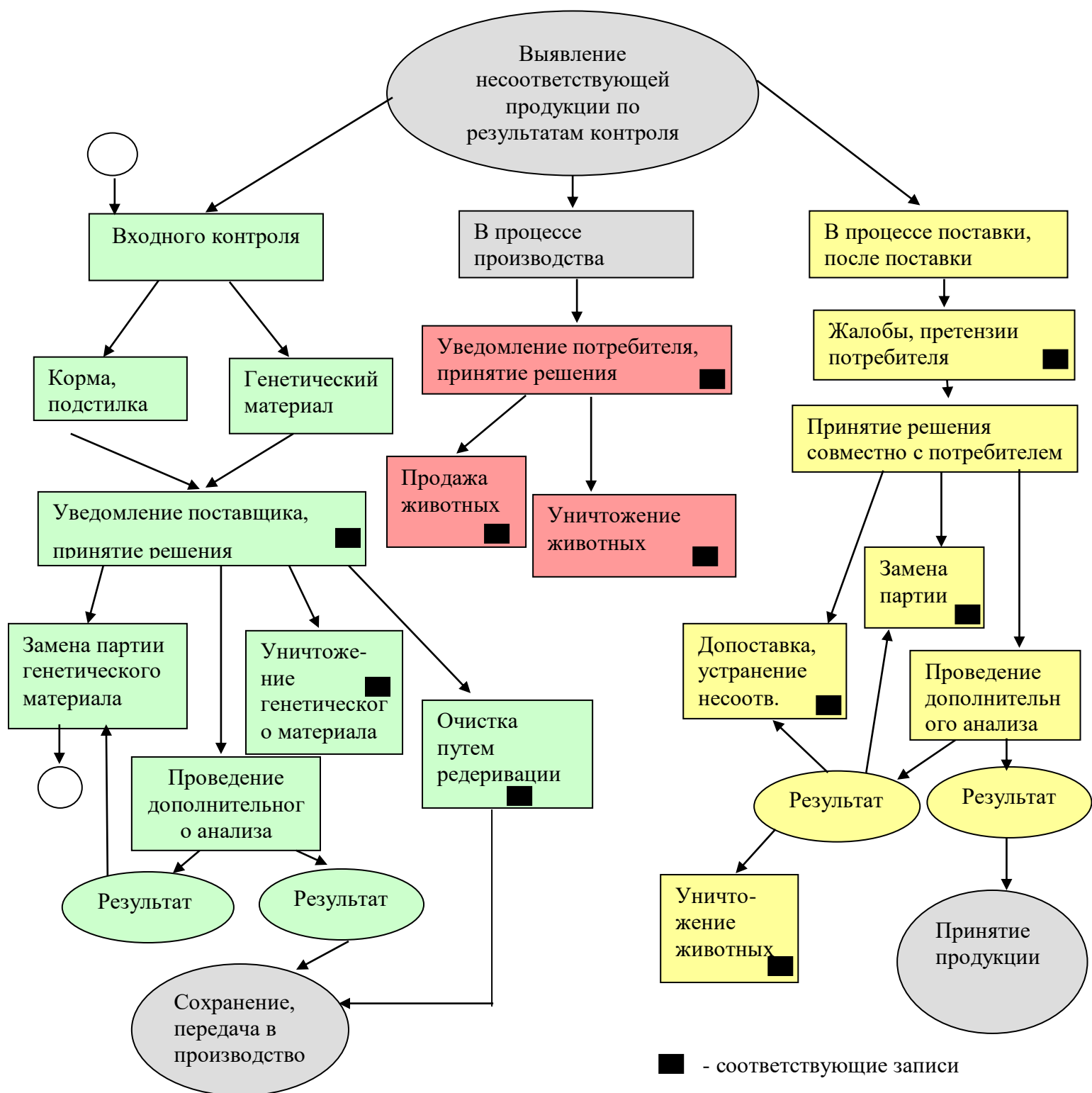
8. Схема экспедиции и транспортировки



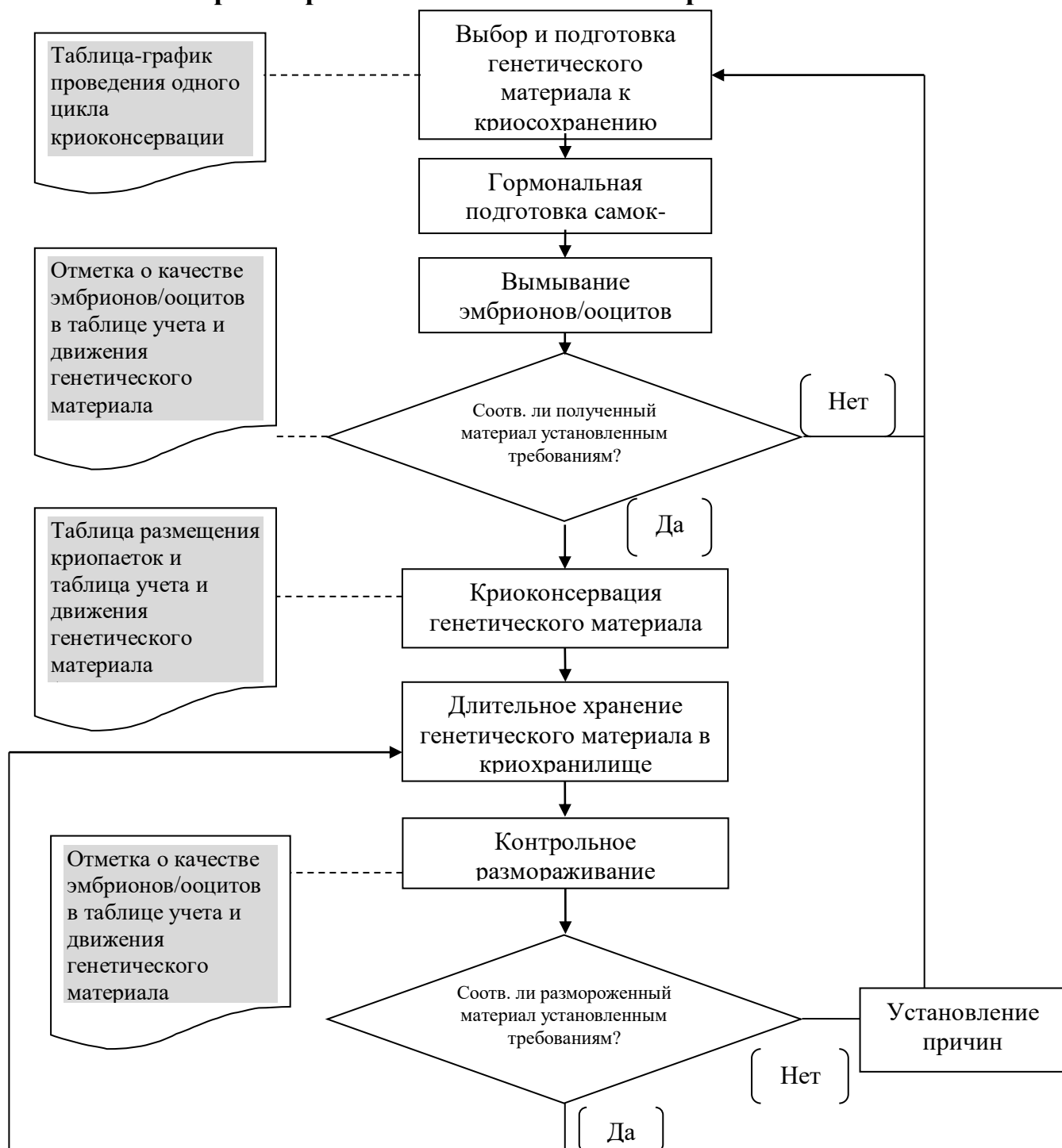
9. Схема контроля качества в процессе производства лабораторных животных



10. Схема управления несоответствующей продукцией



11. Схема криосохранения генетического материала



3. ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОП

Технологический процесс поддержания и развития биоресурсной коллекции «Коллекция лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований» предусматривает использование следующих СОП:

Раздел	№ п/п	Название СОПа	Принятые сокращения
Санитария	1.	Выдача использованных материалов из «чистой зоны» через «грязный» шлюз	1С
	2.	Правила обращения с отходами в Питомнике	2С
	3.	Уборка помещений общего назначения	3С
	4.	Санитарная смена индивидуально-вентилируемых клеток (ИВК) в колониях иммунодефицитных мышей Nude	4С
	5.	Уборка моечно-стерилизационного блока	5С
	6.	Процедура общей очистки, дезинфекции и стерилизации ИВК-стеллажей	6С
	7.	Уборка и дезинфекция помещений климатического оборудования и технических помещений	8С
	8.	Уборка и дезинфекция подвальных помещений и бойлерной	9С
	9.	Санитарная обработка клеток	10С
	10.	Уборка комнат содержания животных	12С
	11.	Уборка «чистого» коридора и автоклавной	15С
	12.	Уборка «грязного» коридора	17С
	13.	Уборка санпропускника	20С
	14.	Техника прохождения за барьер	22С
	15.	Санитарные правила использования предметов личной гигиены женщин	28С
	16.	Подготовка дезинфицирующего раствора на водной основе для уборки помещений производственных зон Питомника	30С
	17.	Санитарная обработка системы SDS (танк SDS 200л с насосом), рециркуляционной петли и точек отбора системы очистки воды RiOs 16 (MILLIPORE)	32С
	18.	Генеральная уборка лифтовых шахт	35С
	19.	Подготовка и стерилизация паром текстильных материалов для «чистой» зоны	40С
	20.	Использование и обслуживание бесконтактной установки для проведения уборки и дезинфекции технологических помещений и поверхностей фирмы «Вермоп» (Германия)	42С
Дезинфекция	21.	Бесфосфатное жидкое чистящее средство «Neodisher FLA» с дезинфицирующим эффектом	5Д
	22.	Neodisher A8 - порошкообразное щелочное моющее средство с дезинфицирующим действием	6Д

	23.	Neodisher N – жидкое кислотное моющее и нейтрализующее средство, обладающее бактерицидным воздействием	7Д
	24.	Использование 6% перекиси водорода с 0,5% детергента как универсального противомикробного средства при аэрозольной стерилизации	10Д
Техника	25.	Последовательность операций, выполняемых при работе на передаточном окне (УФ-шлюз) GERMICID STERIL – 665 LD /Югославия/	1Т
	26.	Последовательность операций, выполняемых при работе на проходном сухожаровом стерилизаторе СТС – 225 /Югославия/	2Т
	27.	Последовательность операций, выполняемых при работе на бельевом сушильном барабане Т5290 Electrolux /Швеция/	3 Т
	28.	Последовательность операций, выполняемых на машине для мойки бутылок и поилок 9EW, станции опорожнения бутылок 9ES и станции заполнения бутылок 9EF /Италия/	4 Т
	29.	Последовательность операций, выполняемых при работе на проходном пароводяном стерилизаторе TIS 181018-2 /Германия/	5 Т
	30.	Последовательность операций, выполняемых при работе на универсальной моечной машине 650GP (9LAV65) /Италия/	6 Т
	31.	Последовательность операций, выполняемых при работе на проходном пароводяном стерилизаторе TIS – S – A / S 2000/ Германия/	7 Т
	32.	Последовательность операций, выполняемых при работе с установкой производства пара WIMA DAMPFGENERATOREN E-283/3 /Германия/	8 Т
	33.	Подготовка кабинета биологической безопасности (класс 2) к работе с клетками ISOcage и использование панели УФ-дезинфекции	9Т
	34.	Последовательность операций, выполняемых при работе на установке производства сжатого воздуха ENERGOINWEST E4NK1040/NK1010/R816A/Югославия/	11 Т
	35.	Правила использования комбинезона химической защиты Тайкем F, DuPont.	12Т
	36.	Последовательность операций, выполняемых при работе с универсальным пылесосом TASKI / Швейцария /	13 Т
	37.	Последовательность операций, выполняемых при работе на агрегатах водоохлаждения TERMOFRIZ - SPLIT /Югославия/	14 Т
	38.	Правила использования фильтрующего противогАЗа	15 Т

	39.	Подготовка и использование регистраторов температурного мониторинга «Термохрон» (Maxim Integrated)	16Т
	40.	Последовательность операций, выполняемых при работе на стиральной машине W4105H /Elctrolux Швеция/	17Т
	41.	Установка и использование весов электронных прецессионных «Sartorius Laboratory ED 3202S-OCE, -RCE» с принтером данных YDP-20-OCE	18Т
	42.	Инструкция по эксплуатации установки умягчения воды IOD	19Т
	43.	Методика определения общей жесткости воды при эксплуатационном химконтроле	20Т
	44.	Использование прибора Hawodent hd650 для запечатывания термосвариваемых бумажных пакетов	21Т
	45.	Последовательность операций, выполняемых на цифровом мультиметре для измерения освещенности в помещении	22Т
	46.	Инструкция по эксплуатации установки дозирования комплексоната (УДК ЭКО-1-8.1.25) в систему горячего водоснабжения	23Т
	47.	Последовательность операций, выполняемых при изготовлении малых и больших транспортировочных контейнеров для лабораторных животных	25Т
	48.	Последовательность операций, выполняемых при работе с кислородным концентратором Охуplus / Франция.	26Т
Уход	49.	Определение пола у мелких лабораторных грызунов	3У
	50.	Правила разведения лабораторных животных	4У
	51.	Программа наблюдения на лабораторными грызунами (мыши, крысы, хомяки) с целью снижения агрессии при содержании	5У
	52.	Ежедневный обход комнат содержания животных	6У
	53.	Дежурство в выходные и праздничные дни	7У
	54.	Комплектация и монтаж аксессуаров на клетку для содержания лабораторных грызунов	9У
	55.	Плановый отъем мышей, крыс, хомяков от матерей	10У
	56.	Кормление лабораторных мышей, крыс и хомяков	11У
	57.	Поение лабораторных мышей, крыс и хомяков	12У
	58.	Выполнение заказов	16У
	59.	Упаковка и выдача животных за пределы Института	18У
	60.	Упаковка и выдача животных из индивидуально вентилируемых клеток (ИВК) за пределы Института	19У

Контроль качества	61.	Правила составления стандартных операционных процедур	1КК
	62.	Применение индикаторов-интеграторов 5 класса 3М Comply SteriCage для паровой стерилизации	2КК
	63.	Бактериологический контроль эффективности работы парового стерилизатора	3КК
	64.	Применение устройства для качественного прилегания респиратора FT-10 (сладкий раствор) и респиратора FT-30 (горький раствор)	4КК
	65.	Отбор проб и составление среднего образца гранулированного корма для анализа в контрольной лаборатории	5КК
	66.	Мониторинг работоспособности стойки системы индивидуально-вентилируемых клеток IVC	6КК
	67.	Контроль качества предстерилизационной подготовки клеток, поильных бутылок и аксессуаров	7КК
	68.	Контроль надлежащей работы автоклавов	8КК
	69.	Экспресс-тест контроля чистоты поверхностей с помощью люминометра Hi-Lite2 (Millipore, Germany)	9КК
	70.	Контроль функциональных свойств хирургического инструмента и гильотины	10КК
	71.	Контроль за эффективностью работы бактерицидных (ультрафиолетовых) установок в технических помещениях и санпропускниках	11КК
	72.	Применение индикаторов паровой стерилизации химических одноразовых «МедИС»	12КК
Ветеринария	73.	Методы фиксации лабораторных мышей, крыс и хомяков	1В
	74.	Введение веществ лабораторным животным (мыши, крысы, хомяки)	2В
	75.	Отбор биоматериала у лабораторных животных (мыши, крысы, хомяки)	3В
	76.	Клинический осмотр лабораторных мышей, крыс, хомяков	4В
	77.	Признаки боли и стресса у лабораторных животных	5В
	78.	Эвтаназия эмбрионов, плодов и новорожденных мышей, крыс и хомяков	6В
	79.	Эвтаназия мелких лабораторных грызунов в CO ₂ -боксе Bioscape	7В
	80.	Отбор биологического материала у лабораторных грызунов для микробиологических и паразитологических исследований	8В
	81.	Групповая и индивидуальная идентификация лабораторных животных	9В
	82.	Выбор животных и подготовка проб биологического материала для проведения мониторинга здоровья в Питомнике	10В
	83.	Обращение с беглыми животными	11В

	84.	Эвтаназия лабораторных мышей, крыс и хомяков методом декапитации	12В
	85.	Регистрация параметров электрокардиограммы (ЭКГ) у мелких лабораторных грызунов	13В
	86.	Измерение артериального давления у мелких лабораторных грызунов	14В
	87.	Техника патологоанатомического вскрытия мелких лабораторных грызунов	15В
Карантин	88.	Размещение животных на карантин/адаптацию	1К
	89.	Передача мышей, подозреваемых на носительство патогенов, в изолятор	5К
	90.	Подготовка помещения биологической изоляции к работе	8К
	91.	Транспортировка использованных микроизоляторов в моечно-стерилизационный блок для санитарной обработки	9К
	92.	Уход за животными в биологической изоляции	11К
Криосохранение генетических ресурсов	93.	Выбор и подготовка генетического материала к криосохранению	1Р
	94.	Гормональная подготовка реципиентов при проведении криоконсервации генетических ресурсов	2Р
	95.	Вымывание ооцитов/эмбрионов при проведении криоконсервации генетических ресурсов Питомника	3Р
	96.	Замораживание ооцитов/эмбрионов	4Р
	97.	Размораживание ооцитов/эмбрионов	5Р
	98.	Трансплантация ооцитов/эмбрионов	6Р
	99.	Маркировка и учет единиц хранения при криохраниении	7Р
	100.	Общие правила работы с криохранилищем при проведении криоконсервации генетических ресурсов	8Р