

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11

УТВЕРЖДАЮ

№ госрегистрации 115011660024

Директор ИФАВ РАН,

член-корреспондент РАН,

Инв. №



С.О.Бачурин

«25» июня 2015 г.

**«МЕТОДИКИ ВЕДЕНИЯ И РАЗМНОЖЕНИЯ ЛИНИЙ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ,
СОДЕРЖАЩИХ РЕГУЛИРУЕМЫЕ СРЕ-РЕКОМБИНАЗЫ, С ОБЯЗАТЕЛЬНЫМ
РЕГУЛЯРНЫМ АНАЛИЗОМ КОПИЙНОСТИ ТРАНСГЕННОЙ КАССЕТЫ
МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ»**

СТП-14.621.21.0008.04-2015

Ответственный исполнитель

Заведующий лабораторией,

к.б.н.

С.Г. Ключков

«25» июня 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

СОДЕРЖАНИЕ

1. Наименование методики измерений	3
2. Назначение методики измерений и область применения	3
3. Нормативные ссылки	3
4. Погрешность измерений	4
5. Требования к показателям точности измерений	4
6. Условия измерений	4
7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам при выполнении данной методики	4
7.1. Реактивы	4
4. DyNAmo HS SYBR Green supermix (Finnzymes, Финляндия)	4
7.2. Материалы	4
7.3. Оборудование	4
8. Операции, связанные с выполнением данной методики	5
8.1. Процедуры, выполняемые для поддержания колонии трансгенных мышей	5
8.2. Стимуляция активности CRE-рекомбиназы	10
8.3. ПЦР в реальном времени	10
9. Обработка и оформление результатов измерений	11
10. Требования безопасности, охраны окружающей среды	11
11. Требования к квалификации операторов	11

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.04-2015 устанавливает методику «Методика ведения и размножения линий трансгенных мышей, содержащих регулируемые CRE-рекомбиназы, с обязательным регулярным анализом копийности трансгенной кассеты методом ПЦР в реальном времени»

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуры, выполнение которых необходимо для разведения и поддержания трансгенных линий мышей, содержащих регулируемые CRE-рекомбиназы. Основными областями применения данной методики являются биологические науки (Разведение и поддержание популяции трансгенных животных)

3. Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты и документы:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

СТП – 1.42.02 – 2002 Стандарты предприятия. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию, обозначению и порядку введения

ГОСТ 1.5—2001 Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по

межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

4. Погрешность измерений

Не устанавливаются.

5. Требования к показателям точности измерений

Не устанавливаются.

6. Условия измерений

Не устанавливаются.

7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам при выполнении данной методики.

7.1. Реактивы

1. тамоксифен (Sigma #T5648) (Sigma Aldrich, Германия)
2. 100% этанол.
3. Масло семян подсолнечника (Sigma Aldrich, Германия)
4. DyNAmo HS SYBR Green supermix (Finnzymes, Финляндия)

7.2. Материалы

1. тонкостенные 48-луночные ПЦР-планшеты (Bioplastics, Нидерланды)

корм опилки

7.3. Оборудование

1. StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США)

Виварий

8. Операции, связанные с выполнением данной методики

8.1. Процедуры, выполняемые для поддержания колонии трансгенных мышей

1. Подготовка помещений для содержания животных, включающая контроль за санитарным состоянием помещения, доступностью чистых клеток, подстила, корма, воды а также своевременное техническое обслуживание оборудования, размещенного в виварии.

2. Мониторинг здоровья животных, включающий рутинный осмотр, изоляцию животных с повреждениями и последующее наблюдение за ними.

3. Маркировка трансгенных животных при помощи ушных клипс и получение биопсийного материала.

4. Проведение бридингов для поддержания численности колонии. Транскрипция CreERT2-рекомбиназы проходит только в присутствии тамоксифена, поэтому методика разведения трансгенных животных, содержащих в своем геноме последовательность, кодирующую CreERT2, полностью совпадает с методикой разведения для нетрансгенных животных.

8.1.1 Условия и требования по содержанию животных

1. Двери комнат содержания животных должны быть всегда плотно закрыты, как в отсутствие, так и в присутствии персонала.

2. На двери комнаты содержания животных должна быть табличка «Информационная карта комнаты», в которой указано: номер комнаты, вид и линия животных, количество, дата получения, исследование, руководитель, ответственные по уходу и контролю здоровья. Если животные не в исследовании, необходимо указать их предназначение, например - «сток»

3. Заходить в комнату с животными необходимо в соответствующей одежде. Если это комнаты в барьерной зоне – комплекте одежды, одеваемой после прохождения санпропускника (душа). Если это комнаты конвенционального содержания, необходимо надеть поверх одежды халат, перчатки, маску.
4. Все рутинные процедуры по уходу за животными, также как и манипуляции с этими животными в исследовании выполняются одним и тем же персоналом (лаборантами).
5. Манипуляции с животными выполняются в паре: один выполняет, второй контролирует правильность выполнения
6. Световой период в комнатах с 08:00 до 20:00. Все основные процедуры по уходу и манипуляции выполняются в первой половине дня (с 09:00). Некоторые манипуляции могут выполняться в другое время суток, если того требует утвержденный протокол исследования.
7. Проверка состояния здоровья животных, наличия корма и воды (кормление и поение), проверка параметров окружающей среды (температуры и влажности) осуществляется ежедневно.
8. Санитарные мероприятия в комнате содержания животных осуществляются в соответствии с принятыми протоколами по обработке и содержанию комнат, в которых содержатся животные.
9. Контроль и записи параметров окружающей среды делаются ежедневно.
10. Все процедуры по уходу и манипуляции должны производиться с соблюдением принципов гуманного обращения, чтобы минимально воздействовать на животных: не шуметь, стараться не пылить. В комнатах содержания животных нельзя есть, пить, курить, включать музыку, громко разговаривать. Основным руководством, в котором

изложены принципы обращения с лабораторными животными, является «Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных».

11. Обо всех отклонениях здоровья животных необходимо незамедлительно докладывать ветеринарному врачу лаборатории и руководителю исследования.
12. В комнатах содержания животных не должен находиться ненужный инвентарь. Все использованные и ненужные материалы, лишние клетки и аксессуары, остатки корма и питья должны выноситься.
13. Все бланки записей по рутинному уходу за животными хранятся в комнате содержания животных в папке. Заполненные бланки лаборант должен сдать ветеринарному врачу лаборатории.
14. Выполнение процедур по исследованию документируется в соответствующих формах-бланках. Заполненная форма-бланк ежедневно сдается руководителю исследования.
15. Записи в формах-бланках по рутинному уходу и манипуляциям должны вестись аккуратным понятным почерком; все необходимые ячейки и колонки должны быть заполнены.

Осмотр животных:

1. Рутинный осмотр общего состояния животных выполняется ежедневно. В соответствии с протоколом исследования такой осмотр может проводиться чаще.
2. Наблюдение ведётся за животными, находящимися в клетке на стеллаже; животное не вынимается из клетки.

3. При проведении общего осмотра отмечают наличие отклонений общего вида животного и его поведения:

- a. Ненормальные позы,
- b. Аномалии в поведении и походке,
- c. Вокализацию,
- d. Изменение в дыхании,
- e. Состояние шерсти,
- f. Наличие выделений из глаз и/или носа
- g. Наличие диареи
- h. Бледность
- i. Признаки истощения
- j. Состояние подстила (наличие крови или ненормального стула),
- k. Признаки отказа от пищи.

4. «Типичные» признаки отклонения во внешнем виде, могут быть связаны с нарушениями условий содержания и ухода:

- a. Переросшие резцы: животные постоянно должны грызть твёрдые пеллеты корма, чтобы стачивать постоянно растущие резцы;
- b. «Стрижка» – общая проблема поведения, когда самец – доминант выдирает или выгрызет шерсть у подчинённого животного обычно в области головы или поясницы;
- c. Покачивание головой и движение по кругу: иногда связано с инфекцией внутреннего уха;

5. Признаки боли или страдания:

- a. Ненормальный внешний вид: торчащая шерсть грязного вида, красно-коричневые выделения носа и глаз, повреждение роговицы глаза;

- b. Ненормально сгорбленная поза, опущенная голова, скошенные лицевые мышцы, вытянутый живот, нежелание двигаться;
 - c. Сильная вокализация, ненормальная реакция взятия в руки;
 - d. Избегание стимулов – убегание, кусание, агрессивность;
 - e. Констипация – полное отсутствие фекалий в подстилке;
 - f. Диарея;
 - g. Гиперсаливация
 - h. Кровопотеря
 - i. Депрессия, летаргия – неподвижность, замедленная реакция;
 - j. Аномальная подвижность и реактивность – постоянное перемещение, прыжки;
 - k. Самоповреждение – кусание, постоянное облизывание одного места, царапание, отгрызание;
 - l. Открытые раны, язвы;
 - m. Затруднённое дыхание;
 - n. Паралич;
 - o. Переломы;
 - p. Быстрая потеря веса, истощение, сниженное потребление корма;
 - q. Стереотипии, качание головы и движение по кругу;
 - r. Опухоли, сильные отёки.
6. Любое отклонение в состоянии здоровья животного необходимо документировать в форме «Отклонения в здоровье животного».
7. При наличии признаков боли и страдания необходимо немедленно проинформировать ветеринарного врача и/или руководителя исследования для принятия решения о судьбе животного.

Документация:

Персонал, обнаруживший отклонения в здоровье животного, делает необходимы записи в форме «Отклонения в здоровье животного».

Руководитель исследования совместно с ветеринарным врачом принимает решение о необходимых действиях по отношению к животным (принятие решения об эвтаназии, дополнительное наблюдение, при необходимости – лечение). Сделать записи о принятых решениях и действиях. Заполненная форма прикладывается в папку данных по исследованию.

8.2. Стимуляция активности CRE-рекомбиназы

Для приготовления раствора тамоксифена, пригодного для бнутрибрюшинного введения, необходимо растворить 1 г тамоксифена в 10 мл 100% этанола, затем добавить 90 мл масла семян подсолнечника. Полученную суспензию перемешивать в течении нескольких часов, до тех пор, пока тамоксифен окончательно не растворится. Стоковый раствор хранить в течении 4 недель при -20 °С.

Трансгенным животным, содержащим в своем геноме последовательность, кодирующую (CreERT2) CRE-рекомбиназу, конъюгированную с измененным лигандсвязывающим доменом эстрогенового рецептора человека, вводят раствор тамоксифена в дозе 40мг/кг внутривбрюшинно 2 раза в день в течении 5 дней.

8.3. ПЦР в реальном времени

Количественную ПЦР в реальном времени проводят на установке StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием набора DyNAmo HS SYBR Green supermix (Finnzymes, Финляндия) и ROX в качестве референсного красителя. В реакцию необходимо отобрать по 1-5 мкг ДНК на каждый образец. Реакции проводят в тонкостенных 48-луночных ПЦР-планшетах (Bioplastics, Нидерланды) в трипликах. В качестве внутреннего контроля используется уровень экспрессии гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Программа для амплификации включает «горячий старт» (10 мин при 95°C) затем 40 циклов:

15 сек при 95°C и 60 сек при 60°C; определение кривой плавления производилось с шагом 0,3°C. Программное обеспечение StepOne v2.0 (Applied Biosystems, США).

9. Обработка и оформление результатов измерений

Не производится.

10. Требования безопасности, охраны окружающей среды

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования, изложенные в технической документации к приборам.

11. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки