

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ

Klinika chorob přežvýkavců a prasat

**Praktický manuál *in vitro*
produkce embryí u skotu**

M. Andrlíková
a kolektiv

Praktický manuál ***in vitro* produkce embryí u skotu**

MVDr. Michaela Andrlíková

Mgr. Zuzana Čierniková

MVDr. Vojtěch Kos

prof. MVDr. Miloslava Lopatářová, CSc.

MVDr. Beáta Marková

MVC. Veronika Stařecká

Mgr. Lenka Vránová

doc. MVDr. Svatopluk Čech, PhD.

Manuál byl vytvořen za finanční podpory projektu IVA, 2018FVL/1680/24.

OBSAH

| | |
|--|----------|
| 1. Úvod | 4 |
| 2. Základní pojmy | 5 |
| 3. Schéma produkce embryí <i>in vitro</i> | 6 |
| 4. Postup produkce embryí <i>in vitro</i> | 7 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|-------|---------------------------------|
| COC's | cumulus oocyte complexes |
| ET | embryo transfer |
| IVC | <i>in vitro</i> kultivace |
| IVF | <i>in vitro</i> fertilizace |
| IVM | <i>in vitro</i> maturace |
| IVP | <i>in vitro</i> produkce embryí |
| OPU | ovum pick-up |

1. Úvod

Pojem produkce embryí *in vitro* (IVP) obecně označuje proces získávání embryí mimo tělo matky. Zahrnuje *in vitro* maturaci (IVM) a *in vitro* fertilizaci (IVF) oocytů a *in vitro* kultivaci (IVC) embryí. Metoda produkce embryí *in vitro* byla původně u skotu prováděna za účelem výzkumu a využívala oocyty získané po superstimulaci. Oocyty získávané z preovulačních folikulů nebo vejcovodu 20 – 24 hodin po začátku říje, které již prodělaly maturaci *in vivo*, jsou přímo připraveny k IVF a IVC. Oocyty se také získávají z jatečných vaječníků, avšak tyto vyžadují navíc maturaci *in vitro*. První tele vyprodukované ze systému IVM-IVF-IVC se narodilo 1987. V dnešní době má metoda IVP velký význam v oblasti výzkumu, kde jsou jako zdroj oocytů využívány především jatečné vaječnky. V zahraničí je IVP v poslední době nedílnou součástí šlechtitelských programů v chovu skotu a je běžně využívána v komerční sféře společně s transferem embryí. Zde jsou přednostně využívány oocyty odebírané od živých dárců. V našich podmínkách se IVP běžně v praxi neprovádí.

2. Základní pojmy

Vysvětlení základních pojmů

COC's: oocyty s kumulárními buňkami (cumulus oocyte complexes)

IETS: International Embryo Technology Society

IFOT: Intrafollicular oocyte transfer, speciální technika transferu maturovaných oocytů do preovulačního folikulu.

Mikromanipulátor: Speciální manipulátor, který se s nasazenou skleněnou kapilárou používá k manipulaci s oocyty a embryi.

OPU: Ovum pick-up, způsob získávání oocytů z folikulů od živých dárců. Provádí se transvaginální aspirací folikulů pod ultrazvukovou kontrolou.

Slicing: Jeden ze způsobů získávání oocytů z jatečných vaječnicků. Principem je rozřezání povrchu vaječnicků pomocí žiletkového nože sestaveného z několika žiletek.

Swim-up: Způsob přípravy spermií pro IVF. Principem metody je vycestování pohyblivých spermií do média.

4-well: čtyřjamková kultivační miska

Kultivační média

Pro IVP produkci embryí je možno použít média komerčně vyrobená, anebo připravená ve vlastní laboratoři dle přesných receptů. Z důvodu finanční náročnosti komerčních médií uvádíme použití médií připravených ve vlastní laboratoři. Návod počítá s oběma způsoby zisku oocytů: z jatečných vaječnicků (slicing) a od živých dárců (ovum pick-up, OPU).

Seznam použitých médií

Dulbecco's PBS: Pufrovaný roztok používaný k aspiraci oocytů metodou OPU.

Slicing médium: Pufrovaný roztok používaný při slicing u ovaríí.

Wash médium: Promývací roztok používaný k oplachu oocytů a embryí mezi jednotlivými kroky IVP.

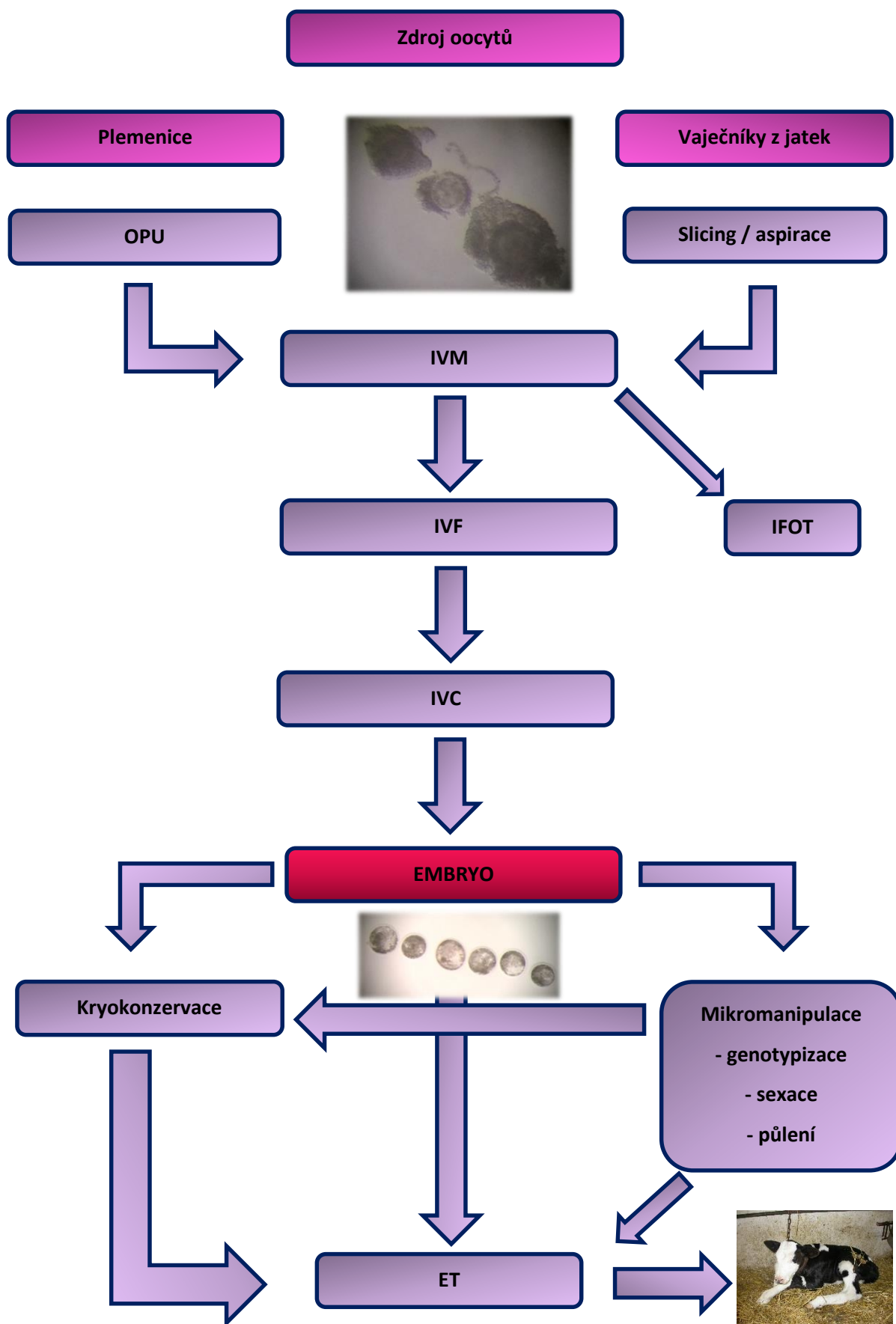
Maturační médium: Médium, v němž dochází ke zrání oocytů, které se stávají kompetentní pro fertilizaci.

Fertilizační médium: Médium, v němž probíhá oplození oocytů.

Kultivační médium: Médium používané pro zrání embryí.

Kapacitační médium: Médium, v němž probíhá kapacitace spermií a swim-up.

3. Schéma produkce embryí *in vitro*.



4. Postup produkce embryí *in vitro*.

DEN -2, PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Příprava zásobních roztoků

Říjové sérum krav (OCS) (Připravit dostatečně dopředu.)

- Pro výrobu OCS („oestrus cow serum“) se odebere krev od minimálně 3 říjících se krav do zkumavek na sérum.
- Inkubace odebrané krve ve vodní lázni (39 °C, 60 min).
- Další inkubace (4 °C, 60 min).
- Centrifugace 20 min při 500G.
- Přepipetování séra do zkumavek a inaktivace ve vodní lázni (30 min, 56 °C).
- Získané OCS rozpipetovat do 2 ml mikrozkušavek a skladovat při -20°C.

Každá šarže OCS se otestuje v procesu IVP na oocytech z ovárií získaných z jatek. Pouze šarže s prokázanou účinností se dále využívá v procesu IVP.

Gentamycin – zásobní roztok

Gentamycin 50 mg
NaCl 0,9 % 1 ml

Neomezená doba skladování při teplotě 4°C.

FSH – zásobní roztok

Stimufol (pFSH = 500 µg) 1 dávka
NaCl 0,9 % 10 ml

V 10 ml NaCl 0,9 % rozpustíme 1 dávku prášku Stimufol. Rozpipetujeme po 100 µl do mikrozkušavek a skladujeme při teplotě -20 °C. Používáme vždy nově rozmrazenou mikrozkušavku.

Na-pyruvát – zásobní roztok

Na-pyruvát 11 mg
NaCl 0,9 % 5 ml

Rozpipetujeme po 330 µl do mikrozkušavek a skladujeme při teplotě -20 °C. Používáme vždy nově rozmrazenou mikrozkušavku.

Média pro odběr oocytů:

Transportní médium - převoz vaječníků z jatek (NaCl 0,9 % + Penicilin a Streptomycin)

| | 1L H ₂ O _{bidest.} | 5L H ₂ O _{bidest.} |
|-----------------------|--|--|
| NaCl | 9,000 g | 45,000 g |
| Penicilin G | 0,060 g | 0,300 g |
| Streptomycin sulphate | 0,131 g | 0,655 g |

Média pro slicing:

PBS – stock solution – zásobní roztok (100x)

| | 500 ml H ₂ O _{bidest.} | 1 000 ml H ₂ O _{bidest.} |
|--|--|--|
| Na-pyruvate | 1,80 g | 3,60 g |
| Streptomycin sulphate | 2,37 g | 4,74 g |
| D-glucose x H ₂ O | 54,99 g | 109,98 g |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 6,65 g | 13,30 g |
| Penicilin G | 3,00 g | 6,00 g |

Rozpustit každé zvlášť. Uchovávat při -20 °C. Spotřebovat v průběhu 3 měsíců. Ideálně je rozpipetovat po 10 ml do 15 ml falkonek.

PBS – prášek (příprava na 1L) PBS prášek (Applichem A0964) možno zakoupit.

| | |
|--|--------|
| NaCl | 8,00 g |
| KCl | 0,20 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,15 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,20 g |
| celkem | 9,55 g |

PBS – slicing solution – čerstvé

| | 1L H ₂ O _{bidest.} | 5L H ₂ O _{bidest.} |
|-------------------------------------|--|--|
| H ₂ O _{bidest.} | 990,00 ml | 4 950,00 ml |
| PBS – prášek | 9,55 g | 47,75 g |
| Stock solution (100x) | 10,00 ml | 50,00 ml |

Rozpustit PBS a stock solution zvlášť v dostatečném množství H₂O, smíchat dohromady, uchovávat při 4 °C, spotřebovat během jednoho týdne.

V den slicingu přidat 5,3 mg Heparinu prášku (nebo roztok 2 IU/ml => 0,2 ml / 500 ml roztoku) a 0,5 g BSA (Fraction V) do 500 ml „slicing solution“.

Před použitím nahřát na 38 °C – 39 °C.

Média pro ovum pick-up:

DULBECCO'S PBS

(složení roztoku na 1 litr)

Roztok A:

| | | |
|---|------|--|
| NaCl..... | 8,00 | g |
| KCl..... | 0,20 | g |
| Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O | 2,90 | g (nebo bezvodý Na ₂ HPO ₄1,15 g) |
| KH ₂ PO ₄ | 0,20 | g |
| Red. H ₂ O..... | ad | 791,40 ml |

Roztok B:

| | | |
|--|------|--|
| CaCl ₂ bezvodý..... | 0,10 | g |
| MgCl ₂ . 6H ₂ O..... | 0,10 | g (nebo bezvodý MgCl ₂ 0,047 g) |
| Red. H ₂ O..... | ad | 200,00 ml |

Roztok C:

| | | |
|----------------------------|-----------|-------------------|
| Glukóza..... | 20,00 | g |
| Red. H ₂ O..... | ad 100,00 | ml = 20 % glukóza |

Roztok D:

| | | |
|----------------------------|-----------|----|
| Na pyruvát..... | 1,00 | g |
| Red. H ₂ O..... | ad 100,00 | ml |

Míchání finálního roztoku před použitím:

791,4 ml roztok A + 200 ml roztok B + 5 ml roztok C + 3,6 ml roztok D = 1000 ml

Každý roztok sterilizujeme zvlášť v autoklávu 20 minut při 120 °C. Uchováváme v lednici při 4°C, roztoky smícháme až před použitím v den provádění OPU.

Modifikované Parkerovo médium – MPM – zásobní roztok

roztok 1:

- Ca-laktát 60 mg
- H₂O_{bidest.} ad 10 ml

roztok 2:

- L-glutamin 10 mg
- NaHCO₃ 80 mg
- HEPES 140 mg
- Na-pyruvát 25 mg
- Gentamycin – zásobní roztok 110 µl
- TCM 199 (Gibco) ad 100 ml

MPM:

- roztok 1 10 ml
- roztok 2 100 ml

Ca-laktát rozpouštíme zvlášť.

Změřit osmolaritu (280 – 300 mOsm), každý roztok sterilně přefiltrovat a skladovat při 4 °C po dobu max. 4 týdnů.

DEN -1 (IVM), DEN ZISKU OOCYTŮ

Média pro promytí a maturaci oocytů:

Wash médium – čerstvé

MPM 9 ml
OCS 1 ml

Sterilně filtrovat do 15 ml falkonu.

Maturační médium (IVM-médium) – čerstvé

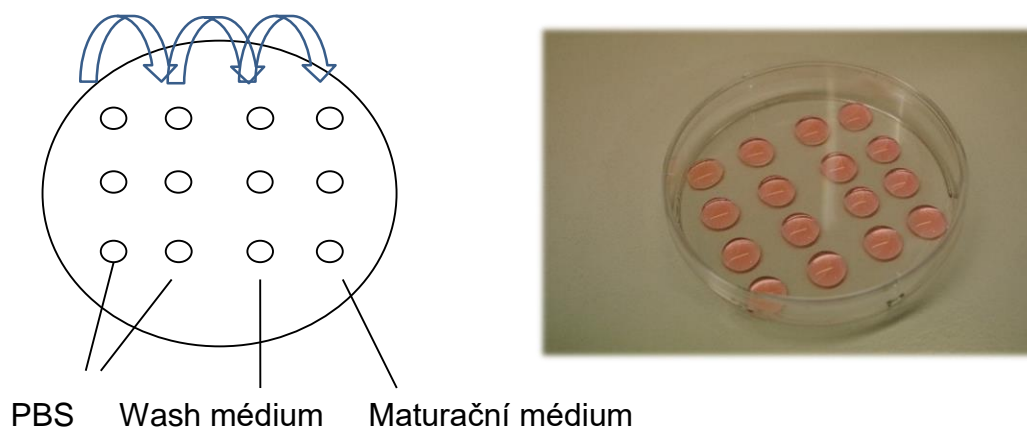
MPM 9 ml
OCS 1 ml
FSH – zásobní roztok 100 µl

Sterilně filtrovat do 15 ml falkonu.

Chronologický postup činnosti:

- Připravit aspirační, wash a maturační médium.
- Finální příprava aspiračního média (Dulbecco's PBS) pro OPU.
 - o Potřebný objem média závisí na počtu dárkyň (100 ml/zvíře).
 - o Do média přidat heparin (400 IU/100 ml) a nahřát ve vodní lázni na 38 °C.
 - o Přelit do 50 ml falkonu (potřebný pro vlastní aspiraci, 1 falkon vystačí na 4 zvířata).
 - o Zbytek roztoku nechat ve vodní lázni, bude použit pro zpracování aspirátu z OPU.
- Příprava wash média a IVM-média (50 ml a 15 ml zkumavka).
 - o Preinkubovat minimálně hodinu při 38,8 °C, 5,5 – 6 % CO₂ a atmosférické koncentraci kyslíku.
 - o OPU: Připravit malou Petriho misku s Dulbecco's PBS (2 ml), dát na vyhřívanou podložku.

Připravit velkou Petriho misku (kapky média PBS, wash a maturačního, počet kapek podle počtu dárců oocytů, obr. 1) a nechat v inkubátoru.

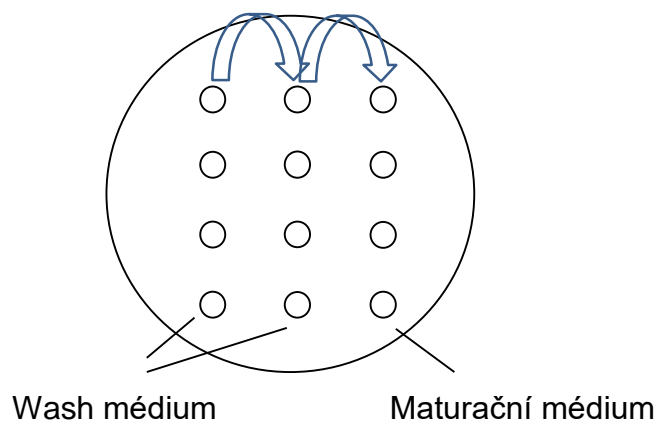


Obrázek 1: Uspořádání kapek (200 µl) k proplachování COC's.

Šipky znázorňují směr přesunu oocytů mezi kapkami.

- Slicing: Připravit malou Petriho misku s 2 ml wash média a dát do inkubátoru.

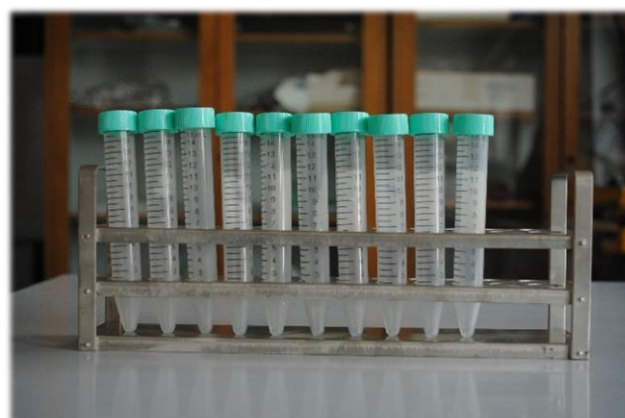
Připravit velkou Petriho misku dle obr. 2 (kapky média wash a maturačního, počet kapek podle počtu získaných oocytů) a nechat v inkubátoru.



Obrázek 2: Uspořádání kapek (200 μ l) k proplachování COC's.

Šipky znázorňují směr přenosu COC's mezi kapkami.

- 4-well destičky popsat „IVM“ a datem. Každou jamku naplnit 400 μ l maturačního média, médium převrstvit 400 μ l parafínovým olejem. Nechat preinkubovat.
- Připravit filtry pro vyhledání COC's získaných z OPU, Petriho misky velké a malé, injekční stříkačku 20 ml.
- Připravit vybavení pro slicing (miska, žiletkový nůž, pean, 800 ml kádinka, sítko, konické zkumavky 15 ml, stříkačka Janette 150 ml) (obr. 3).



Obrázek 3: Pomůcky pro slicing

Zpracování vaječníků (slicing)

Transport vaječníků z jatek do laboratoře probíhá v termosce v temperovaném (25 – 30 °C) **0,9 % NaCl s přídavkem Pen/Strep** (obr. 4).

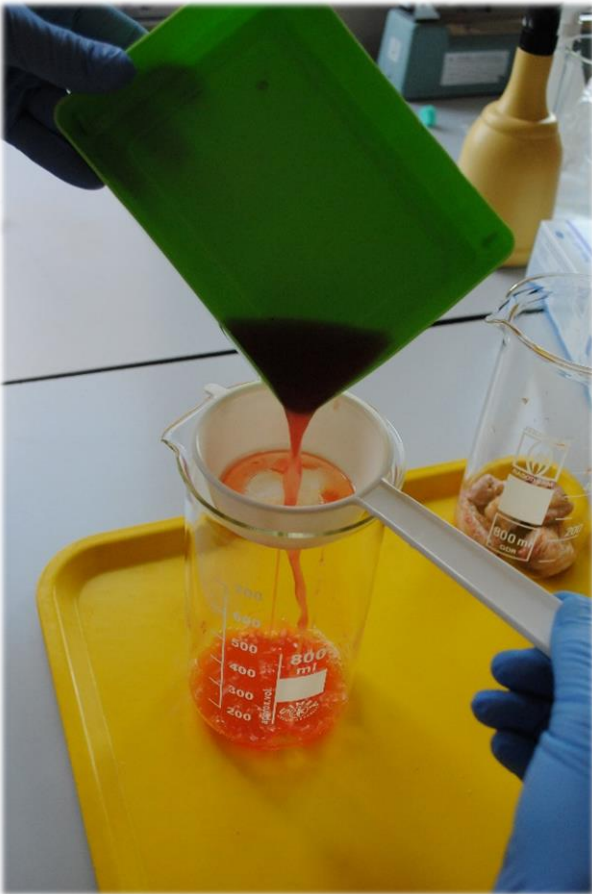
- V laboratoři vaječnky dvakrát omýt v 0,9 % NaCl s Pen/Strep.
- Následně provést „slicing“ v misce obsahující „**PBS slicing-solution**“.
 - o Vaječník uchopit peanem a ponořit do média. Povrch ze všech stran (mimo výrazné corpus luteum) rozřezat žiletkovým nožem (obr. 5).
 - o Opakovat s každým vaječníkem.
 - o Po zpracování každých cca 10 vaječníků oplachový roztok obsahující tkáňovou drť a oocyty přelit přes sítko do kádinky (500 ml) (obr. 6).
 - o Vypláchnout misku médiem a slít do kádinky.
- Oplachový roztok ponechat v kádince 10 – 15 minut sedimentovat (obr. 7).
- Supernatant odsát, tak aby zbylo přibližně 100 ml tekutiny. Krouživým pohybem rozvířit tekutinu a rozdělit do 8 – 10 konických zkumavek (15 ml) (obr. 8 a, 8 b, 9). Kádinku ještě vypláchnout cca 15 ml slicing média a dolít do konických zkumavek.
- Zkumavky ponechat 5 – 10 minut sedimentovat.
- Sediment ze zkumavky napipetovat Pasteurovou pipetou do velké Petriho misky a naředit „PBS slicing-médiem“ 1:1 (obr. 10, 11).
- Pod stereomikroskopem vyhledat oocyty odpovídající kvality (COC´s grade 1 a COC´s grade 2) a přenést do připravené Petriho misky s wash médiem (obr. 12).
- Vyhledané oocyty přenést do promývacích kapek (20 – 30 COC´s/kapka) a 2x promýt (obr. 2).
- COC´s přenést do 4-well s IVM-médiem a inkubovat 22 – 24 hodin (38,8 °C, 5,5 – 6 % CO₂, 100% vlhkost) (obr. 13).



Obrázek 4: Vaječnky v termosce pro transport



Obrázek 5: Rozřezání povrchu vaječníku



Obrázek 6: Přelití roztoku do kádinky



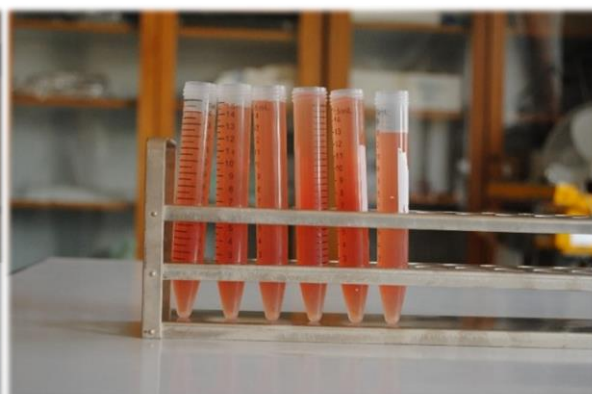
Obrázek 7: Sedimentace roztoku



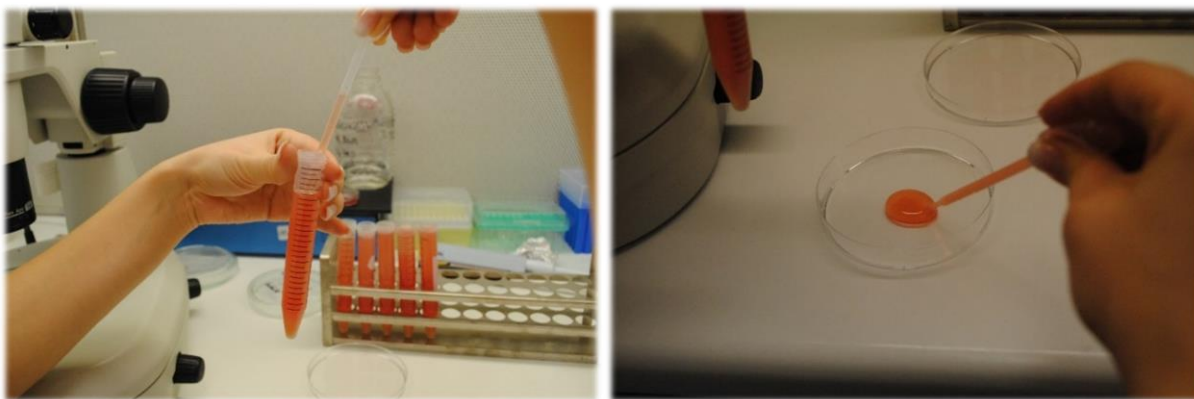
Obrázek 8 a: Odsátí supernatantu



Obrázek 8 b: Roztok před rozlitím do zkumavek



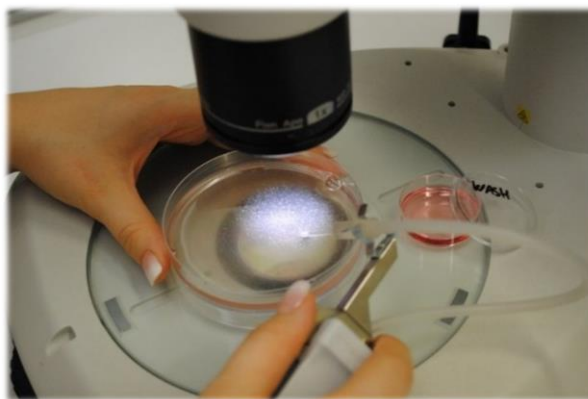
Obrázek 9: Rozlití roztoku do zkumavek



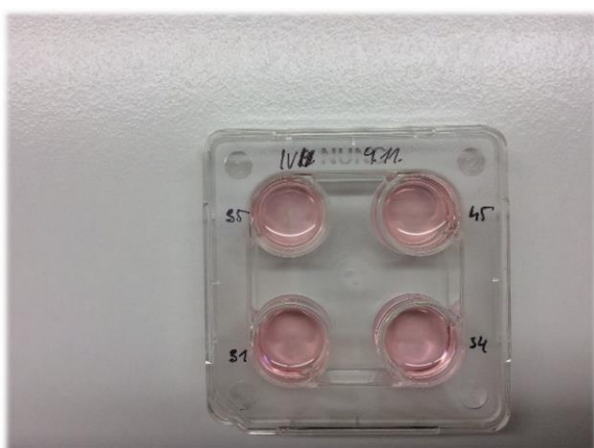
Obrázek 10: Pipetování sedimentu ze zkumavky na Petriho misku



Obrázek 11: Rozředění roztoku



Obrázek 12: Vyhledání COC's



Obrázek 13: Připravený 4-well s maturačním médiem

Ovum pick-up

Příprava instrumentária:

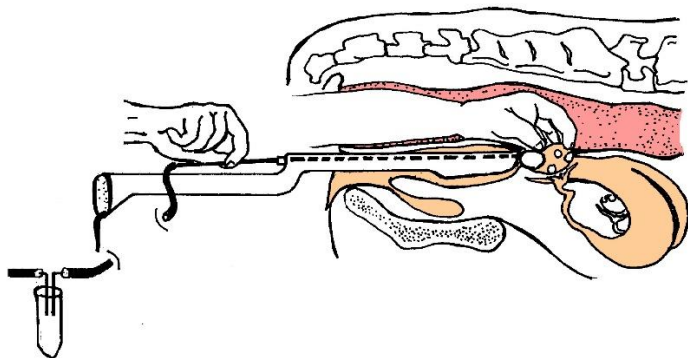
- Následující vybavení umístěno v přenosném kufru pro snadnou manipulaci.
 - o desinfekční přípravek na kůži
 - o lokální anestetikum (*procain*)
 - o injekční jehly (18G) a stříkačky (5 ml, 20 ml)
 - o rektální rukavice
 - o sonografický gel
 - o buničitá vata
 - o fyziologický roztok na oplach
 - o provázek na fixaci ocasu
- Na vozík nachystat:
 - o podtlakovou pumpu
 - o vyhřívací kontejner s falkony 50 ml (1 x OPU médium, 1 x nový pro každou dárkyni)
 - o sonografický přístroj
 - o držák s ultrazvukovou sondou (před použitím krýt rektální rukavicí viz obr. 14)
 - o vodič jehly
 - o aspirační jehly
 - o stojan s 50 ml falkony na proplach aspiračního systému (1 x prázdný, 1 x líh)

Příprava zvířete:

- Fixovat dárkyni ve fixačním zařízení.
- Vyholit a desinfikovat místo pro aplikaci epidurální anestezie (3,5 ml, 2 % *procain*).
- Vyvázat ocas tenkým provázkem.
- Vyprázdnit rektum.
- Očistit a desinfikovat perineální oblast.

Aspirace oocytů:

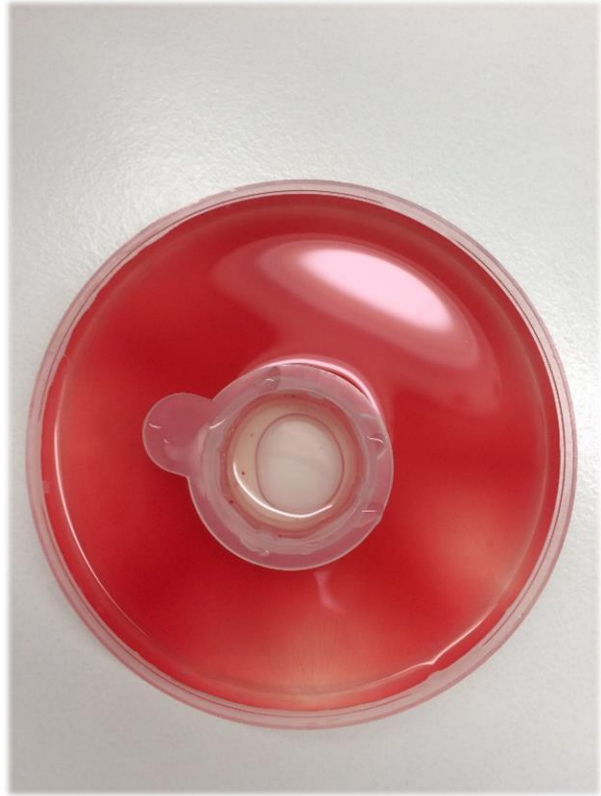
- Falkon označit ušním číslem zvířete.
- Před vlastní aspirací folikulů aspirovat na dno falkonu malé množství OPU média.
- Zasadit držák sondy do pochvy, druhou rukou fixovat vaječník *per rectum* (obr. 15).
- Aspirovat všechny folikuly >3 mm.
- Označit falkon počtem aspirovaných folikulů.
- Po aspiraci co nejrychleji přepravit falkon do laboratoře pro vyhledání a zpracování COC's.



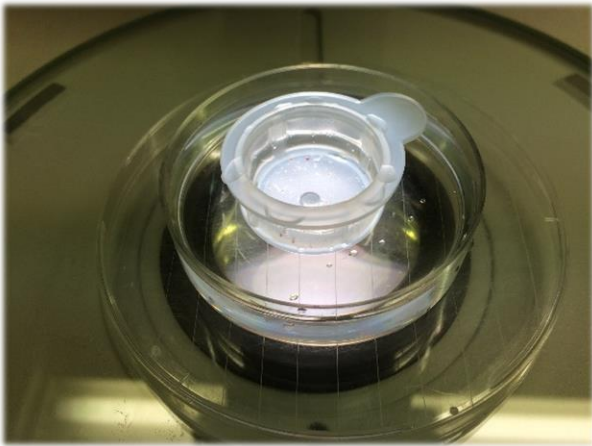
Obrázek 15: Schématické znázornění umístění ultrazvukové sondy proti fornix vaginae s manuální fixací vaječníku *per rectum* (autor V. Mlejnková)

Zpracování punktátu z OPU:

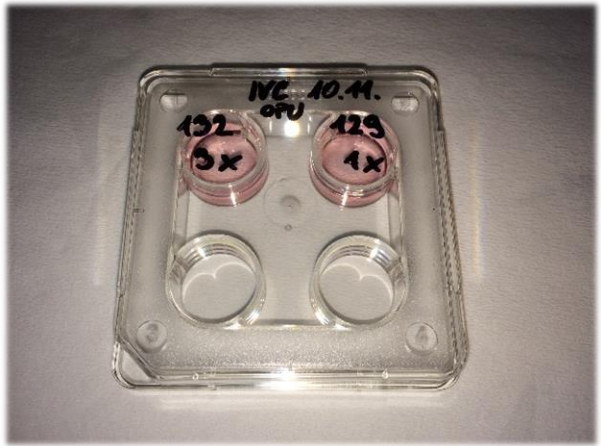
- Aspirát přelit přes filtr na velkou Petriho misku, filtrát (v sítku) promýt PBS médiem (obr. 16). Falkon propláchnout PBS médiem a přelit přes filtr.
- Filtr přemístit do malé Petriho misky a prolít PBS médiem (obr. 17).
- Vyhledat COC's na filtru a přenést do malé Petriho misky s PBS médiem. Klasifikovat kvalitu COC's.
- Promýt COC's ve čtyřech kapkách (PBS, wash médium, maturační médium) (obr. 1).
- COC's přemístit do 4-well a jamku popsat číslem zvířete (obr. 18).



Obrázek 16: Filtrace aspirátu s COC's



Obrázek 17: Promytý aspirát na filtru



Obrázek 18: Označený 4-well s COC's

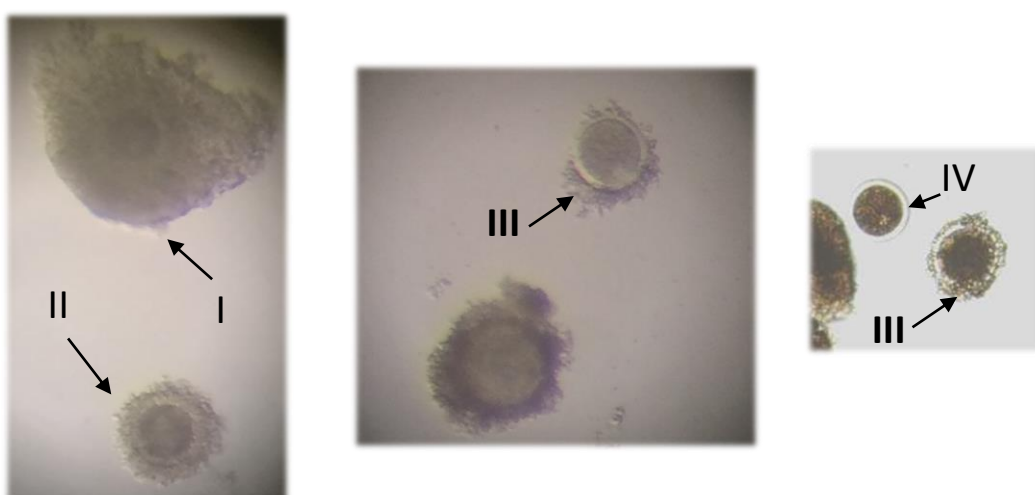
Klasifikace kumulus-oocytárních-komplexů (COC's)

Vyhledané COC's rozdělit podle morfologických kritérií do čtyř kvalitativních tříd (tab. 1 a obr. 19).

Pro IVP se použijí pouze COC's třídy I a II z vaječníků poražených zvířat, z *ex vivo* punkcí třídy I až III.

Tab. 1: Klasifikace COC's modifikovaná podle LEIBFRIEDA a FIRSTA (1979)

| Třída | Vlastnosti oocytu | Vlastnosti kumulárních buněk |
|-------|--|--|
| I | tmavá, rovnoměrně jemně granulovaná, kompaktní ooplasma | kompaktní, celý oocyt obklopující minimálně pětivrstevný kumulus |
| II | tmavá, rovnoměrně jemně granulovaná, kompaktní ooplasma | kompaktní, celý oocyt obklopující méně než pětivrstevný kumulus |
| III | rovnoměrně, kompaktně jemně granulovaná ooplasma, ale obsahující i větší granula | kumulární buňky obklopují minimálně polovinu <i>zony pellucidy</i> |
| IV | abnormálně velké či malé oocyty; silně deformované oocyty; ooplasma s velkými granuly; výrazné rozdíly v kompaktnosti ooplasmy | kumulus bez kumulárních buněk („nahý“) či s částečně nebo úplně expandovaným kumulem |



Obr. 19 Třídy COC's

DEN 0, In vitro fertilizace

Média pro fertilizaci oocytů:

Sperm Tyrode's laktát – zásobní roztok (Sperm TL – zásobní roztok)

| | |
|---|-------------|
| NaCl | 580,0 mg |
| NaHCO ₃ | 209,0 mg |
| NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O | 4,0 mg |
| HEPES | 238,0 mg |
| MgCl ₂ . 6 H ₂ O | 31,0 mg |
| CaCl ₂ . 2 H ₂ O | 38,4 mg |
| Phenol Red | 1,0 mg |
| Na-laktát (Sirup 60%) | 365,0 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 100,0 ml |

Po nastavení pH = 7,4 (HCl) a kontrole osmolarity (300 mOsm) zásobní roztok sterilně přefiltrovat a uchovávat při 4 °C po dobu max. 4 týdnů.

Tyrode's laktát – zásobní roztok (TL – zásobní roztok)

| | |
|---|-------------|
| NaCl | 666,0 mg |
| KCl | 23,5 mg |
| NaHCO ₃ | 210,3 mg |
| NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O | 4,7 mg |
| Penicillin | 6,5 mg |
| MgCl ₂ . 6 H ₂ O | 10,0 mg |
| CaCl ₂ . 2 H ₂ O | 39,7 mg |
| Phenol Red | 1,0 mg |
| Na-laktát (Sirup 60 %) | 186,0 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 100,0 ml |

Po kontrole osmolarity (280 – 300 mOsm) roztok sterilně přefiltrovat a uchovávat při 4°C po dobu max. 2 týdnů.

Následující média připravit čerstvá. Sterilně filtrovat do 15 ml falkonu.

Kapacitační médium (Hodnotu pH nastavit na 7,35 – 7,40 (HCl).)

| | |
|---------------------------------|---------|
| Na-pyruvát | 1,1 mg |
| BSA | 60,0 mg |
| Gentamycin – zásobní roztok... | 10,0 µl |
| Sperm TL – zásobní roztok | 10,0 ml |

Fertilizační médium

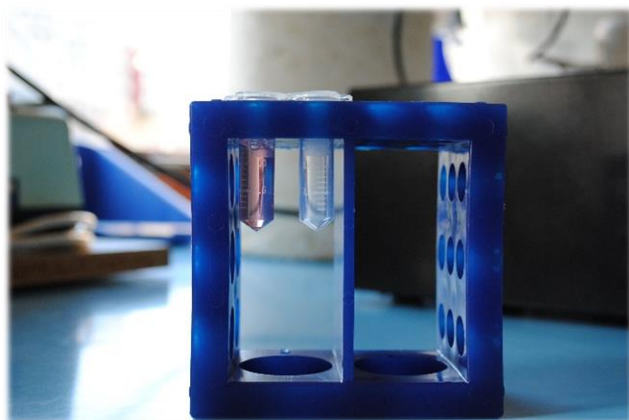
| | |
|------------------------------------|----------|
| BSA | 60,0 mg |
| Na – pyruvát – zásobní roztok..... | 100,0 µl |
| TL – zásobní roztok | 10,0 ml |

Heparinové médium

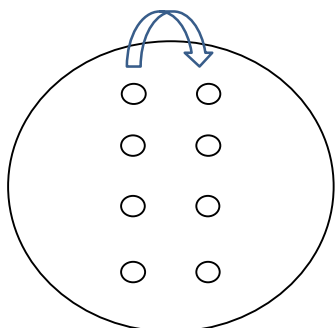
| | |
|---------------------------|--------|
| Heparin | 1,0 mg |
| Fertilizační médium | 5,0 ml |

Chronologický postup činnosti:

- Připravit kapacitační, fertilizační a heparinové médium.
- Připravit 2 ml ependorfky: na 1 pejetu 3 ependorfky (č. 1, 2 a 3), popsat jménem býka.
- Do ependorfky č. 1 napipetovat 1,6 ml kapacitačního média a ve stojánku umístit do inkubátoru (38,8 °C a 5,5 – 6 % CO₂, 100 % vlhkost) (obr. 20) preinkubovat minimálně 1 hodinu.
- Připravit velkou Petriho misku na promývání COC's (kapky fertilizačního média) (obr. 21), dát do inkubátoru.
- Připravit 4-well s fertilizačním médiem. Popsat „IVF“, ušním číslem a datem.
 - o Do každé jamky napipetovat 400 µl fertilizačního média + 20 µl heparinového média, převrstvit 400 µl oleje a minimálně 1 hodinu preinkubovat.
 - o Připravit 1 ml mikrozkuhavku s 95 µl H₂O a Bürkerovu komůrku pro výpočet koncentrace spermií.



Obrázek 20: Mikrozkuhavka s kapacitačním médiem

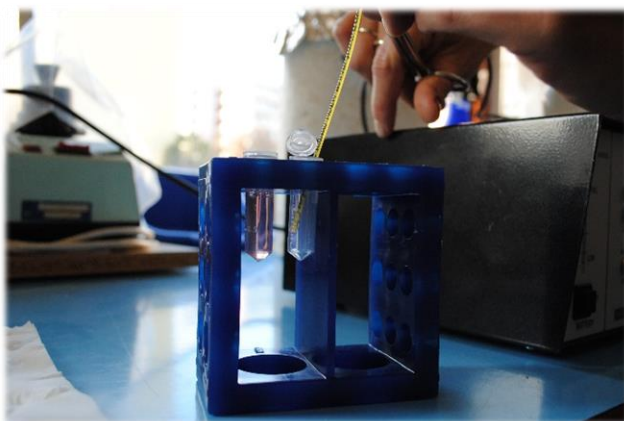


Obrázek 21: Petriho miska s kapkami IVF-média (200 µl) pro promývání COC's.

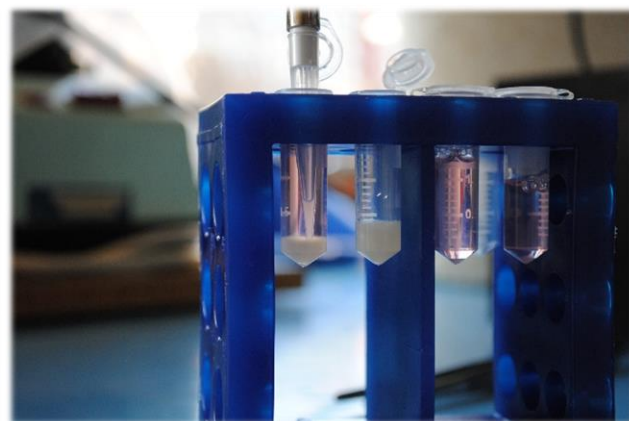
Šipka znázorňuje směr přesunu COC's mezi kapkami.

Příprava inseminační dávky:

- Vytáhnout pejetu z kontejneru, 8 s nechat na vzduchu odpařit kapalný dusík, vhodit do vodní lázně (39 °C, 20 s), pejetu otřít do sucha.
- Odstříhnout jeden konec pejety, ID nechat vytéct do ependorfky č. 2 odstřížením druhého konce pejety (obr. 22).
- Z jedné kapky pod mikroskopem zkontrolovat motilitu spermií.
- Kapacitační médium v ependorfce č. 1 podvrstvit 200 μ l inseminační dávkou (obr. 23).
- Otevřenou ependorfku umístit ve stojánku do inkubátoru.
- Nechat proběhnout swim-up 45 – 60 minut (38,8 °C a 5,5 – 6 % CO₂, 100 % vlhkost).



Obrázek 22: Příprava inseminační dávky



Obrázek 23: Podvrstvení kapacitačního média spermatem

Příprava COC's:

- Promýt oocyty ve 2 kapkách fertilizačního média (obr. 21) (na každou jamku s COC's je třeba 2 kapky).
- COC's přenést do 4-well s fertilizačním médiem. Misku vrátit zpět do inkubátoru.
- Nechat preinkubovat 30 minut před vlastní fertilitizací.

Centrifugace a fertilizace:

Po uplynutí času pro swim-up:

- Přepipetovat supernatant z ependorfy č. 1 do prázdné ependorfy č. 3.
- Centrifugovat 15 minut při 200G.
- Odebrat část supernatantu z ependorfy č. 3 (ponechá se objem supernatantu odpovídající trojnásobku objemu sedimentu spermií), resuspendovat sediment spermií.
- Vypočítat koncentraci spermií v Bürkerově komůrce, vypočítat potřebný objem suspenze na jednu jamku.
- Vypočítaný objem suspenze připipetovat do každé jamky (na každou jamku použít novou špičku).
- Koinkubovat spermie a COC's minimálně 19 a maximálně 21 hodin (38,8 °C, 5,5 – 6 % CO₂, 100 % vlhkost).

Výpočet koncentrace spermií a objemu suspenze potřebného pro fertilizaci:

- 20násobné ředění: 95 µl H₂O + 5 µl suspenze semene
- Koncentrace spermií potřebná pro fertilizaci:
- 1 000 µl 2 000 000 spermií
- 420 µl (v jamce 4-wellu) 840 000 spermií
- počet spermií ve velkém čtverečku x 3 200 = počet spermií v µl suspenze
- **µl suspenze na jamku = 840 000 : počet spermií v µl suspenze**

DEN 1, In vitro kultivace

Média pro kultivaci oocytů:

Phosphate buffered saline (PBS) (Filtrovat do sterilních lahví, skladovat při 4°C.)

| | |
|--|-------------|
| NaCl | 8,000 g |
| KCl | 0,200 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,150 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,200 g |
| CaCl ₂ . 2 H ₂ O | 0,133 g |
| MgCl ₂ . 6 H ₂ O..... | 0,100 g |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 1 000 ml |

Vortexové médium- (Modifikované PBS (m-PBS))

| | |
|---------------------|----------|
| roztok 1: PBS | 1 000 ml |
| A-A solution | 100 µl |

| | |
|-----------------------|-------|
| m-PBS: roztok 1 | 10 ml |
| BSA | 10 mg |

Sterilně filtrovat do 15 ml falkonu. Inkubovat v inkubátoru se zavřeným vrškem.

CR-1 médium – zásobní roztok

| | |
|---|--------------|
| NaCl | 1263,30 mg |
| KCl | 44,72 mg |
| NaHCO ₃ | 420,04 mg |
| Hemikalciium-laktát | 109,10 mg |
| Na-pyruvát | 8,80 mg |
| Phenol Red | 2,00 mg |
| L-glutamin | 29,22 mg |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 200,00 ml |

Hemikalciium-laktát nutno nejprve rozpustit v jednom dílu H₂O_{bidest.} a následně pomalu nalít za stálého míchání k druhému už rozpuštěnému dílu. Jinak dojde k jeho vysrážení! Po změření osmolarity (265 – 270 mOsm) roztok sterilně přefiltrovat a skladovat při 4 °C po dobu max. 2 týdnů.

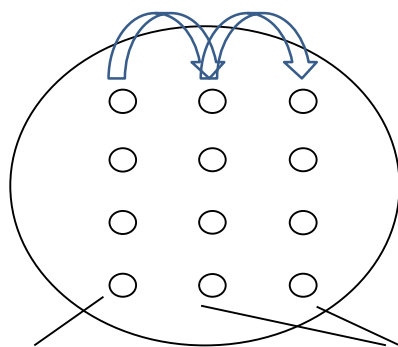
Kultivační médium – CR-1 médium – čerstvé

| | |
|----------------------------------|-----------|
| CR-1 – zásobní roztok | 9,50 ml |
| MEM | 100,00 µl |
| BME (50x) | 200,00 µl |
| OCS | 0,50 ml |
| Gentamycin - zásobní roztok | 10,00 µl |

Sterilně filtrovat do 15 ml falkonu. Před použitím minimálně 1 hodinu inkubovat v komůrce.

Chronologický postup činnosti:

- Připravit vortexové a kultivační médium.
- 15 ml falkon s 1ml vortex médiem umístit do inkubátoru (38,8 °C, 5,5 – 6 % CO₂, 5 % O₂, 100 % vlhkost).
- Připravit malou Petriho misku na výplach falkonu po vortexování.
- Připravit velkou Petriho misku na promývání zygot (kapky média, vortexové, kultivační) (obr. 24), dát do inkubátoru.
- Připravit 4-well s kultivačním médiem. Popsat „IVC“, ušním číslem a datem.
 - o Do každé jamky napipetovat 400 µl kultivačního média, převrstvit 400 µl oleje a minimálně 1 hodinu preinkubovat.



Vortexové médium

Kultivační médium

Obrázek 24: Petriho miska s kapkami média (200 µl) pro promývání zygot před kultivací. Šipka označuje směr přesunu zygot mezi kapkami.

Vortexování a kultivace:

Každou jamku vortexujeme samostatně.

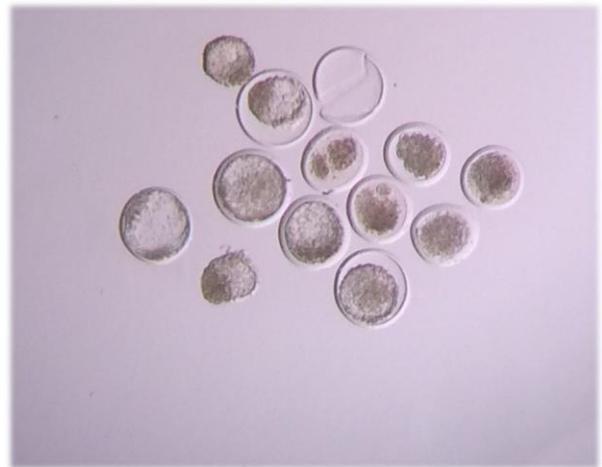
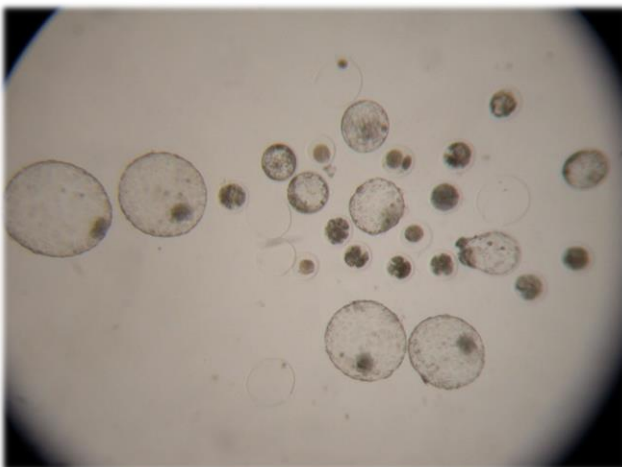
- Zygoty z „IVF“ 4-wellu přenést do falkonu s vortexovým médiem.
- Vortexovat 90 s při maximálních otáčkách. Falkon se zygotami přidržovat o další prázdný falkon (obr. 25).
- Obsah falkonu vylít do připravené malé Petriho misky. (Též je možno nechat krátce sedimentovat a přepipetovat sediment).
- Falkon 2x propláchnout 1 ml vortex médiem a vylít do Petriho misky se zygotami.
- Vyhledané zygoty promýt v připravených kapkách na velké Petriho misce (obr. 24).
- Předpokládané zygoty přesadit do 4-well destičky s kultivačním médiem.
- Kultivovat v inkubátoru při 38,8 °C, 5,5 – 6 % CO₂ a 5 % O₂ do dne 7.



Obrázek 25: Poloha zkumavek při vortexování

DEN 7 – 8 Hodnocení IVP embryí

Hodnocení kvality embryí se provádí dle IETS.



Obrázek 26: Kolekce IVP embryí

Poznámky:

| | |
|--------------|--|
| Autoři: | MVDr. Michaela Andrlíková Mgr. Zuzana Čierníková MVDr. Vojtěch Kos prof. MVDr. Miloslava Lopatářová, CSc. MVDr. Beáta Marková MVC. Veronika Stařecká Mgr. Lenka Vránová doc. MVDr. Svatopluk Čech, PhD. |
| Název: | Praktický manuál <i>in vitro</i> produkce embryí u skotu |
| Ústav: | Klinika chorob přežvýkavců a prasat |
| Počet stran: | 28 |
| Vydání: | 1. |
| Vydavatel: | Veterinární a farmaceutická univerzita Brno |
| Tiskárna: | Reakce s.r.o. |

ISBN 978-80-7305-817-3