

CRB Xénopes	<b>Microinjection d'ovocytes de <i>Xenopus laevis</i> pour criblage</b>	MO-
		Rédigé le : 13/07/2017

- I- Référence :
- Manuel d'utilisation DMZ-Universal Puller
  - Fiche de suivi des programmes Étireuse DMZ-Universal Puller
  - Manuel d'utilisation injecteur Nanoject II Drummond Scientific Company
- II- Matériel :
- Capillaire en verre 3.5'' Drummond # 3-000-203-G/X
  - Étireuse DMZ-Universal-PULLER-ZEITZ
  - Support métallique de capillaires
  - Becher en verre, utilisé comme cloche pour la stérilité des capillaires
  - Four
  - Couvercle de boîte de pétri
  - Parafilm
- III- Solutions :
- Huile minérale (SIGMA - Mineral oil - M-8410 1L) colorée par du oil red EGN (SIGMA 234117)
  - ORII+Ca<sup>2+</sup>
- IV- Mode Opératoire :
- A. Préparation des capillaires d'injection en verre
- o Allumer l'Étireuse DMZ-Universal-PULLER-ZEITZ, en appuyant sur le bouton « **Mains** » en haut à droite
  - o Sélectionner le programme 80 sur le clavier, saisir **80E**
  - o Appuyer sur le bouton « **Ready** » pour initialiser les mâchoires
  - o Positionner le capillaire en verre au centre des mâchoires
  - o Appuyer sur le bouton « **Start** » pour démarrer le programme
  - o À la fin du programme, lorsque les mâchoires sont ouvertes et les capillaires sont séparés, on peut les récupérer
  - o Placer les capillaires étirés sur le support
  - o Conserver les capillaires sous une cloche en verre
  - o Stériliser les capillaires au four à **200°C pendant 2h**
  - o Les capillaires peuvent être utilisés

*Lors de la fabrication des capillaires, si les mâchoires de l'étireuse sont trop serrées pour le positionnement du capillaire appuyez sur « **Break** » pour les écarter. Appuyez sur « **Ready** » puis positionnez le capillaire, appuyez sur « **Start** » pour démarrer le programme.*

*Il est possible d'enregistrer de 1 à 80 programmes. **Se référer au manuel d'utilisation pour tout changement. ATTENTION à ne pas modifier un programme existant si l'on n'en est pas le concepteur-utilisateur ! Une fiche de suivi des programmes est mise en place pour la traçabilité et l'historique de ces programmes.***

#### **Paramètres du programme 80**

P(A)		P(B)	
H	600	H	200
F(TH)	032	F(TH)	012
S(TH)	117	S(TH)	012
t(H)	000	t(H)	020
S(H)	000	S(H)	000
AD	010	AD	000
		t(F1)	211
		F1	550
		S(F2)	004
		F2	055

CRB Xénopes	<b>Microinjection d'ovocytes de <i>Xenopus laevis</i> pour criblage</b>	MO-
		Rédigé le : 13/07/2017

#### B. Préparation à l'injection

- Régler le volume d'injection sur le Nanoject II (*en fonction du type d'injection ADN ou ARN et du nombre d'ovocytes à injecter*)

*Le réglage se fait sur le côté du boîtier, le tableau de valeurs figure au dos du boîtier*

- Dévisser la vis noire de l'injecteur et retirer les différents joints
- Rincer les joints à l'éthanol pour retirer l'huile résiduelle
- Placer le joint noir le plus fin puis le joint blanc dans le bon sens (*face lisse vers le haut, face avec la rainure vers le bas*)
- Remplir un capillaire stérile avec l'huile minérale colorée, sans faire de bulle d'air
- Enfiler la vis noire puis le dernier joint noir
- Installer le capillaire sur le piston et le remonter tout en vissant, bien serrer

*Attention le piston se tord facilement*

- Appuyer sur « **Empty** » pour faire descendre le piston dans le capillaire

*Vérifier que le capillaire n'avance pas avec le piston et que des gouttes d'huile sortent bien*

- Ajuster la descente du piston au volume d'injection désiré (*plus le piston évacue d'huile, plus on peut aspirer du liquide à injecter*)
- Découper une bande de parafilm et ajuster le côté papier (*Important pour éviter la présence de RNases*) sur le couvercle de la boîte de pétri.
- Déposer une goutte du liquide à injecter sur ce parafilm (*Attention l'évaporation du liquide peut-être rapide*)
- Positionner le capillaire dans la goutte et aspirer le liquide à injecter en appuyant sur « **Fill** »
- Rester vigilant à l'absence d'air dans le capillaire lors de l'aspiration (*possibilité de passer en mode slow aspiration, pour les liquides plus visqueux*)

#### C. Préparation des ovocytes pour l'injection

- Remplir la petite boîte de pétri contenant la grille avec la solution d'ORII+Ca<sup>2+</sup>
- Déposer les ovocytes à injecter dans la petite boîte de pétri sur la grille
- Selon le type d'injection il faut être plus ou moins précis :
  - Injection ADN : microinjection dans le noyau, viser le pôle animal, ne pas dépasser 15nl
  - Injection ARN : microinjection dans l'ensemble de l'ovocyte, ne pas dépasser 50nl
- Après l'injection, placer les ovocytes dans une boîte de pétri contenant de l'ORII+Ca<sup>2+</sup>, placer à 16°C
- Remonter le piston à son maximum en appuyant sur « **Fill** ». La remontée peut être accélérée en appuyant simultanément sur « **Fill** » et « **Empty** ».
- Retirer le capillaire en verre de l'injecteur, il est à usage unique ou peut-être rincé par plusieurs aspiration vidange d'eau milliQ (RNase free selon l'usage) avant réutilisation

#### D. À noter

Il est important pour la survie des ovocytes de ne pas faire les injections en présence d'antibiotiques.

Si leur utilisation est nécessaire à la conservation, procéder à des rinçages avant et après injection dans de l'ORII+Ca<sup>2+</sup>.