

Процедура отмывки клеток

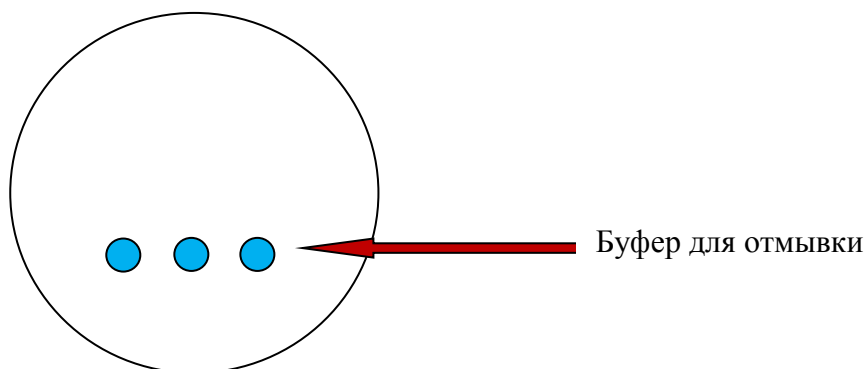
Необходимые материалы

35 мм стерильные чашки Петри
Штатив с буфером в 0,2 мл ПЦР пробирках
Штатив для 0,2 мл ПЦР пробирок
Стереомикроскоп
Микродозатор на 10 мкл
Стерильные наконечники на 10 мкл
Стерильные пластиковые пакеты для штатива
Маркер

1. Подготовка

Все этапы процедуры отмывки необходимо проводить в стерильном боксе для предотвращения загрязнения. Необходимо использовать одежду для чистых помещений, перчатки без талька, а также шапочку.

- 1.1. В стерильном боксе подготовьте необходимое количество чашек Петри из расчета 1 чашка на 1 клетку.
- 1.2. Пометьте чашки с указанием номера эмбриона и номера клетки.
- 1.3. Нанесите 3 капли (15-20 мкл) буфера, как показано ниже:

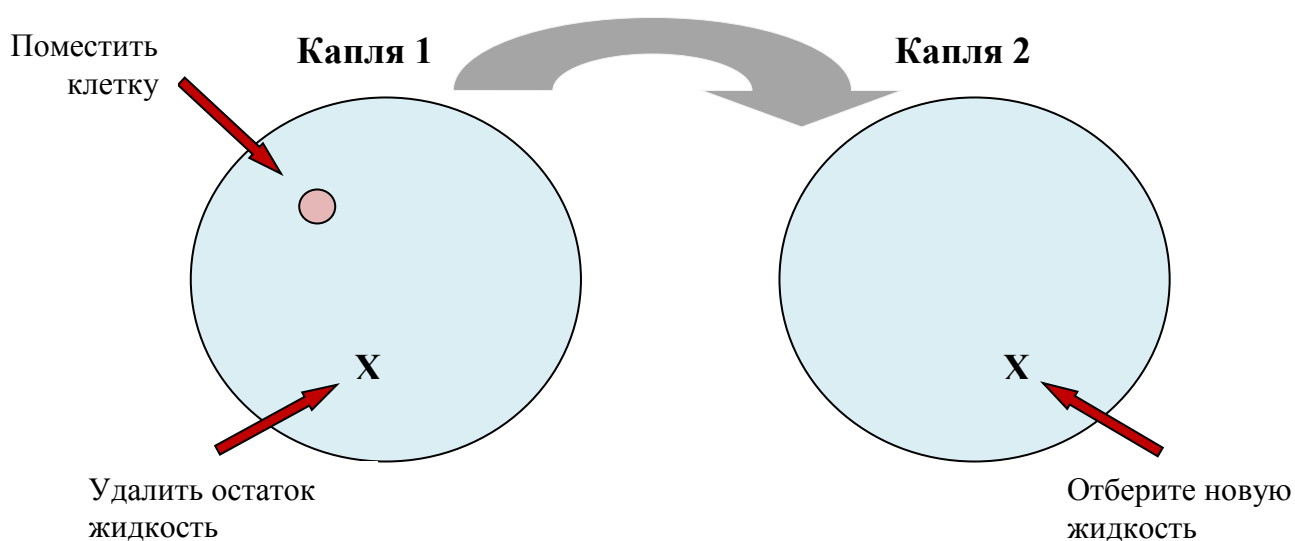


- 1.4. После подготовки всех чашек отложите их в сторону, в зоне доступа к микроскопу.
- 1.5. Подготовьте буфер, предоставленный лабораторией ЦГРМ (отцентрифугировать буфер перед биопсией, если он не был отцентрифугирован по получению).

2. Протокол отмывки

- 2.1. Поместите емкость с отобранными клетками под микроскоп. Убедитесь в наличии клеток.

- 2.2. Промойте носик капилляра буфером, убедитесь в отсутствии люфта жидкости в капилляре при манипуляциях.
- 2.3. Смочите носик капилляра в буфере и наберите небольшое его количество - примерно 5 мм по длине капилляра. Глядя в микроскоп, отберите клетку в минимальном объеме жидкости, предварительно обмыв ее буфером.
- 2.4. Поместите клетку в каплю 1 таким образом, чтобы с клеткой в каплю попало минимальное количество среды.
- 2.5. Промойте капилляр буфером из капли 2
 - (а). Переместите капилляр в каплю 2, отберите небольшой объем жидкости
 - (б). Верните капилляр в каплю 1, отберите клетку аналогично п.2.3; 2.4 и переместите ее во вторую каплю.



- 2.6. Перенесите аналогичным образом образец из капли 2 в каплю 3 отмывочного буфера.
- 2.7. Отберите клетку в капле 3 в минимальном объеме буфера. Убедитесь, что клетка не находится слишком близко к концу капилляра или рядом с мениском. Возьмите микропробирку, откройте крышку, держа ее вертикально.
- 2.8. Поместите капилляр с клеткой в микропробирку. Не касайтесь стенок пробирки.
- 2.9. Убедитесь, что капилляр помещен в буфер на дне микропробирки.
- 2.10. Выпустите весь объем буфера с клеткой в микропробирку. Достаньте капилляр и поместите пробирку в охлажденный штатив.
- 2.11. Для отбора отрицательного контроля используйте тот же капилляр, вернитесь к капле 3 и отберите небольшой объем отмывочного буфера и поместите его в новую микропробирку для контроля.
- 2.12. Удалите капилляр. Отцентрифугируйте пробирки с биоптатами и контролями, поместите в штатив и заморозьте при -20°C в чистом пластиковом пакете.