

### Preparazione soluzione fisiologica

Acqua sterile  
NaCl 0,9%

sterilizzare in autoclave e conservare a temperatura ambiente

### Preparazione Dulbecco + BSA

Dulbecco  
Bovin serum albumin 0,4%

Filtrare e conservare a +4°C

### Preparazione soluzione iperbarica

Acqua sterile  
TCM 199 liofilizzato 1 vial/litro  
NaHCO<sub>3</sub> 26,1 mM (350 mg/L)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,3 mM (186,6 mg/L)  
NaCl 14,9 mM (870 mg/L)

Volume finale 1 Litro

dopo aver sciolto le polveri, misurare il pH (deve essere tra 7,3 e 7,4)  
Aggiungere Hepes 1 mM, 20 ml (aggiungerlo sempre dopo aver misurato il pH)  
Portare a volume  
Filtrare e stoccare a +4°C

### Preparazione terreno di coltura per la maturazione dei COCs

Alfa- MEM o TCM 199  
Ultraglutamina 1%  
Fetal Calf Serum 5%  
Penicillina/streptomicina 1%  
ormoni

Dopo aver preparato la soluzione filtrare

### Preparazione Fetal Calf Serum

Scongelare a temperatura ambiente la stock solution.  
Inattivare il complemento a 56°C per 30 minuti  
lasciar raffreddare  
Preparare frazioni da 1 ml (o in base alle necessità) e congelare a -20°C

### Ormoni per la maturazione dei COCs di maiale

#### hCG

L'ormone si trova sotto forma di liofilizzato con potenza 1500UI/ml  
IL liofilizzato viene risospeso in 1500 ml di Dulbecco + BSA allo 0,4%.

La risospensione viene aliquotata in frazioni da 10 microlitri con potenza ognuna di 1 UI/ml, e conservata a -20°C.

Ogni frazione viene aggiunta a 2 ml di medium di maturazione poco prima dell'uso.

### PMSG

L'ormone si trova sotto forma di liofilizzato con potenza 1000 UI/ml

IL liofilizzato viene risospeso in 1000 ml di Dulbecco + BSA allo 0,4%.

La risospensione viene aliquotata in frazioni da 10 microlitri con potenza ognuna di 1UI/ml, e conservata a -20°C.

Ogni frazione viene aggiunta a 2 ml di medium di maturazione poco prima dell'uso.

### Maturazione COCs di maiale

Raccolta dei COCs mediante stagiuzzamento o aspirazione o isolamento dei follicoli dalle ovaie in Dulbecco + BSA allo 0,4%

Selezione dei COCs sani e incubazione dei COCs in 2 ml di terreno di maturazione in incubatore a 38,5°C e al 5% CO<sub>2</sub>, per 44 ore.

N.B. il medium di preparazione va preparato all'inizio dell'esperimento)

### Fine maturazione COCs

Valutazione espansione cumulo.

Denudamento accurato degli oociti in Dulbecco + BSA 0,4% con l'aggiunta di ialuronidasi all'1%.

Valutazione della presenza del globulo polare

### Ialuronidasi

Serve per denudare COCs espansi

Sciogliere 0,1 g di ialuronidasi in 10 ml di Dulbecco + BSA 0,4% (si ottiene uno stock 10x)

Fare aliquote da 200 microlitri e stocarle a -20°C

Fissazione degli oociti su vetrino

Pulire i vetrini accuratamente con Etanolo.

Posizionare dei pilastri di vasellina ai lati lunghi del vetrino portaoggetti

Posizionare gli oociti tra i due pilastri di vasellina e appoggiare il vetrino coprioggetto sopra i pilastri.

Schiacciare delicatamente il coprioggetto in corrispondenza dei pilastri in modo da bloccare gli oociti.

Far passare un po' di liquido tra il vetrino porta e coprioggetto in modo da verificare che gli oociti siano bloccati.

Posizionare il vetrino in rack di vetro contenenti fissativo per lacmoid.

Lasciare in fissativo overnight

### Colorazione con Lacmoid

Colorante caratterizzato da una particolare affinità per il materiale cromatinico. Consente una valutazione oggettiva dello stadio di maturazione raggiunto dagli oociti (GV, GVBD, MI, MII).

La soluzione stock si prepara sciogliendo 1 g di Lacmoid in 45 ml di acido acetico glaciale. La soluzione viene fatta bollire per 5 minuti, raffreddata e filtrata con carta bibula. Viene conservata a Temperatura ambiente al riparo della luce.

Per la colorazione:

250 microlitri della soluzione stock vengono miscelati con 750 microlitri di acqua distillata (volume finale 1 ml).

La soluzione così ottenuta viene centrifugata per 10 minuti al massimo dei giri ed usata immediatamente.

Nel frattempo, i vetrini, montati e lasciati in fissativo\* overnight, vengono spostati in etanolo per 10 minuti.

Far passare 30 microlitri circa di Lacmoid tra i due vetrini per capillarità e aspettare che gli oociti si colorino (pochi secondi).

Osservare al microscopio

#### Fissativo per colorazione con lacmoid\*

Etanolo 75%

Acido acetico 25%

#### Preparazione terreno per capacitazione spermatozoi maiale

TCM 199

Calcio lattato 2,25 mM (693 mg/L)

Sodio Piruvato 1,5 mM (137,5 mg/L)

Glucosio 13,9 mM (2500 mg/L)

Caffeina 1 mM (194 mg/L)

Filtrare e conservare a +4°C

#### Preparazione terreno per fecondazione oociti di maiale

TCM 199

Calcio lattato 2,25 mM (693 mg/L)

Sodio Piruvato 1,5 mM (137,5 mg/L)

Glucosio 13,9 mM (2500 mg/L)

Caffeina 1 mM (194 mg/L)

FCS 10% (100 ml/L)

Filtrare e conservare a +4°C

#### Preparazione spermatozoi di maiale per la capacitazione

- Frazionare il seme nelle provette a fondo conico
- Centrifugare a 1200 rpm per 7 minuti e poi a 3500 rpm per 5 min (le due velocità sono consecutive, ossia la centrifuga non va fermata, per cui va impostato il tempo di 12 min totali) in una centrifuga a braccio mobile
- Dopo centrifuga eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 5 ml di Dulbecco senza BSA
- Ripetere i lavaggi per tre volte, e ogni volta unire i pellet a due a due in una provetta
- Dopo l'ultima centrifuga si avranno due provette da cui è necessario togliere tutto il

surnatante portando a secco entrambe; si risospendono i due pellet con 1 ml totale di medium di capacitazione, unendoli in un'unica sospensione

- Effettuare la conta dopo aver fatto le tre diluizioni seriali (1:10; 1:100; 1:1000 finale) in acqua distillata
- capacitare gli spermatozoi alla concentrazione di  $10^8$  spz in 2 ml di terreno di capacitazione
- capacitare gli spermatozoi per due ore
- dopo due ore di capacitazione mettere gli spermatozoi alla concentrazione di  $10^7$  spz in 2 ml di terreno di fecondazione in coincubazione con gli oociti maturi denudati. Incubare overnight

### Preparazione gradiente di Percoll

Il percoll è ipertonico. Per renderlo isotonico va diluito nel modo seguente: si prelevano 9 ml di Percoll a cui si aggiunge 1 ml di Dulbecco 10x.

A questo punto bisogna preparare due concentrazioni di Percoll al 70% e al 35% per formare il gradiente.

Preparare prima il Percoll al 70%, aggiungendo ai 10 ml la quantità necessaria per diluire il Percoll dal 100% al 70%.

Questo significa che in una soluzione totale al 70%, 10 ml al 100% di Percoll corrispondono a 7 parti di soluto, e il resto (3 parti) è solvente (Dulbecco).

Imposto la proporzione:

$$10 : 7 = x : 3$$

calcolo la x e mi ricavo il volume di Dulbecco da aggiungere (4,2 ml), ottenendo Percoll alla concentrazione voluta (70%)

A questo punto bisogna preparare la soluzione di Percoll al 35%. Poiché 35% è esattamente la metà di 70%, basta prelevare 5 ml dalla soluzione al 70% e diluire con altrettanti ml di Dulbecco.

Bisogna, ora, preparare il gradiente:

Stratifico 1 ml di soluzione di Percoll al 35% e poi, posizionando la pipetta sul fondo, aggiungo lentamente 1 ml di soluzione di Percoll al 70%, in modo che quest'ultimo più pesante, sollevi il Percoll al 35% e stratificando quindi le due soluzioni con il 70% in basso e il 35% sopra.

A questo punto stratifico 1 ml di seme sopra al 35% e centrifugo in una centrifuga a braccio mobile a 1500/3500 rpm per 30 minuti totali (15 minuti a 1500 e poi aumentare in corsa il numero di rpm fino a 3500 rpm per altri 15 minuti).

Dopo la centrifuga si avranno tre strati: il pellet in fondo alla provetta costituito da spermatozoi vivi, un anello all'intercapedine tra i due strati di percoll costituito da spermatozoi morti e uno strato sulla superficie superiore costituito da impurità.

Si recuperano solo gli spermatozoi vivi e si trasferiscono in falcon. Si diluiscono con 10 ml di Dulbecco + BSA allo 0,4% e si centrifugano a 3000 rpm per 10 minuti (per tre volte consecutive).

A questo punto si procede alla conta (vedi sopra).

### Preparazione degli oociti per la fecondazione

Denudamento degli oociti in Dulbecco + BSA + ialuronidasi

Valutare la presenza del globulo polare e selezionare solo quegli oociti in cui il globulo polare è evidente.

Posizionare gli oociti con il PB (polar body) in una petri con 2 ml di terreno di fecondazione in incubatore, fino alla coincubazione con gli spermatozoi.

Lasciare overnight in incubatore.

La mattina successiva gli oociti vengono fissati per la colorazione con il lacmoid (vedi sopra).