- Se pueden desfolicular con pinzas y microscopio los que tengan el folículo flojo

7. Cada mañana hay que cambiar el medio por ND-96 con Calcio y Gentamicina fresco para evitar el desarrollo de microorganismos (a pesar de la gentamicina)

A.11.4. Inyección de RNA en ovocitos

1. Colocar el inyector en el manipulador con cuidado y ajustarlo para que no resbale
2. hacer puntas de vidrio para inyectar (largas)
    a. se coloca en el jalador y se aprieta,
    b. se ajusta la temperatura indicada y se dejan caer
    c. con el microscopio hay que ver hasta dónde está tapada y cortar todo lo que esté tapado
3. se llena la punta con aceite de inmersión (con la aguja de insulina)
4. se coloca en el inyector:
    a. sacar la punta metálica del inyector · empty ·
    b. Colocar la punta de vidrio con cuidado y ajustarla
    c. Sacar un poco la punta del inyector para asegurarnos que está saliendo · empty ·
5. En una caja petri se coloca parafilm y 1ul de RNA
6. se ajusta en el inyector la cantidad de RNA que se va a inyectar (hay que ver el código en la parte de abajo y ponerlo)
7. Cargar la punta con todo el RNA que se puso en el parafilm ·fill·
8. colocar ovocitos en la caja con hoyos (que son para que no se estén moviendo al inyectarlos)
9. picar al ovocito ligeramente (pero que pase la membrana) e inyectar ·inyect·
10. Retirar y repetir hasta inyectar los ovocitos deseados
11. Para inyectar otro RNA o H_2O para los controles hay que cambiar la punta de vidrio por una nueva.
12. Se dejan en la incubadora a 15-17ºC al menos 24 h antes de empezar a registrar

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

B. Soluciones

B.1. Solucion para Ovocitos ND96

Concentración		Agregar para Stock 1M (50 ml)	Para 1L	Para 500 ml
96 mM	NaCl	12.92 g	96 ml (5.6 gr)	48 ml (2.8 g)
2.0 mM	KCl	3.72 g	2 ml	1 ml
1.0 mM	$MgCl_2$	10.165 g	1 ml	0.5 ml
5.0 mM	HEPES/Tris	5.95	5 ml	2.5 ml
2.5 mM	Piruvato		2 ml (2.2 g)	1 ml (1.1 g)
1.8 mM	$CaCl_2$*	7.35 g	1.8 ml*	0.9 ml*
	Gentamicina**		100 mg**	50 mg**

*Si es sin calcio no se agrega $CaCl_2$

****Se prepara una solución sin gentamicina**

pH=7.4

Ajustar la osmolaridad a 240-260 mOsm/Kg

Esterilizar por filtración

B.3. Solucione Base para Registro (4 Litros)

Formatted: Font color: Auto

Concentración	Reactivo	Cantidad pesada
2 mM	$MgCl_2$	1.626 g
1 mM	$CaCl_2$	0.588 g
10 mM	Mes/Tris	Tris: 4.84 g; Mes: 8.5 g

Ajustar a pH 7.0 con Mes

Ajustar Osmolaridad con Sorbitol o Manitol