

# **НАБОР ДЛЯ БЕЗОПАСНОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ И РАЗМОРАЖИВАНИЯ ООЦИТОВ И ЭМБРИОНОВ CRYOTOP®**

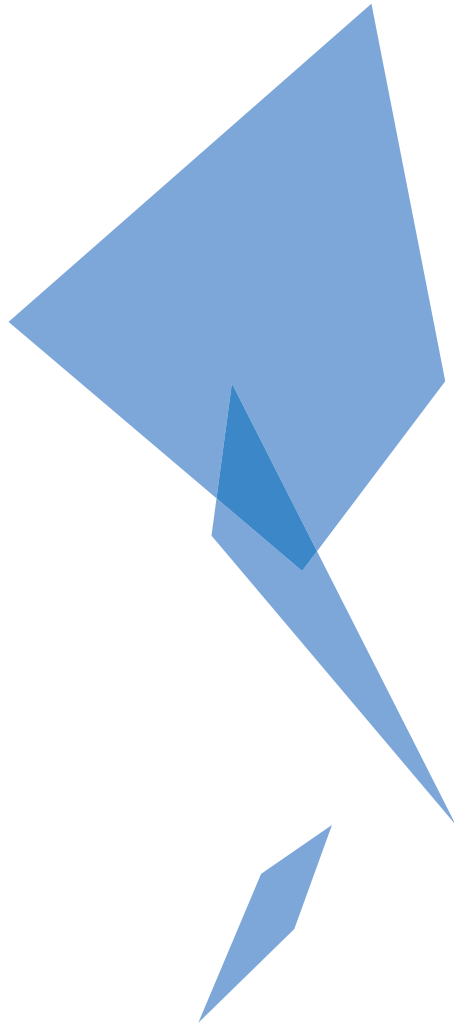
## **Протокол витрификации для метода Cryotop®**

**Растворы для витрификации и размораживания  
VT601 / VT602 и VT801 / VT802**

**Cryotop® - Открытая система**

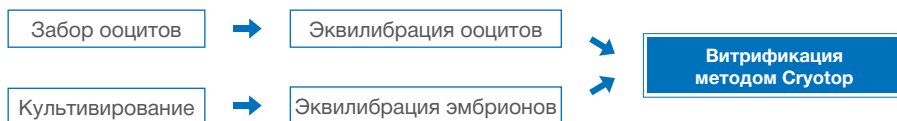
**Cryotop® SC - Закрытая система**





**Витрификация**

## Процедура витрификации



Процедуры эквilibрации ооцитов и эмбрионов различны.

### ЧАСТЬ 1

## Необходимые материалы

- Растворы для витрификации VT601 (Кат. номер 91101) или VT801 (Кат. номер 91171)
  - № 0 Базовый раствор (BS): 1 флакон объемом 1,5 мл (Только для витрификации ооцитов)
  - № 1 Равновесный раствор (ES): 1 флакон объемом 1,5 мл
  - № 2 Раствор для витрификации (VS): 2 флакона объемом 1,5 мл
- Cryotop
  - Cryotop® (Кат. номера 81111, 81112, 81113, 81114, 81115)
  - Cryotop® SC (Кат. номера 81121, 81122, 81123, 81124, 81125)
- Репродуктивный планшет – K1 (Кат. номер 83003)
- Криованна (Кат. номер 84010): голубой контейнер из стирола для жидкого азота
- Пастеровская пипетка **\*\* См. ВНИМАНИЕ**
- Микроскоп (с выключенной нагревательной пластиной)
- Секундомер или Таймер (с функцией суммирования)
- Жидкий азот
- Пинцет
- 2 микропипетки: 2-20 мкл / 100 – 1000 мкл
- Стеклопипетка
- Резервуар для хранения

### Дополнительные материалы для Cryotop®SC

- Криованна SC (Кат. номер 84014)
- Ножницы для соломин (Кат. номер 84117)
- Алюминиевая подставка (Кат. номер 84115)
- Запаяватель



### ВНИМАНИЕ

Используйте пастеровскую пипетку с внутренним диаметром, соответствующим диаметру ооцита или эмбриона. Внешний диаметр ооцита составляет приблизительно 120 мкм, внешний диаметр эмбриона – приблизительно 120-250 мкм. Это необходимо для оптимизации объема растворов, что позволит создать наилучшие условия для их разбавления и, как следствие, получить наиболее высокий коэффициент выживаемости после размораживания.

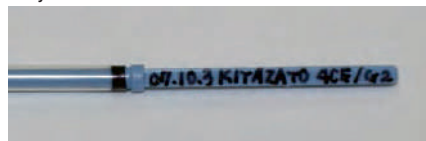
## ЧАСТЬ 2

# Подготовка к витрификации

1. Доведите базовый раствор (**BS**), равновесный раствор (**ES**) и раствор для витрификации (**VS**) до комнатной температуры (25-27°C).

2. Запишите необходимую информацию о пациенте на рукоятке Cryotop (См. Рисунок 2-1). Вы также можете нанести этикетку на рукоятку.

Рисунок 2-1

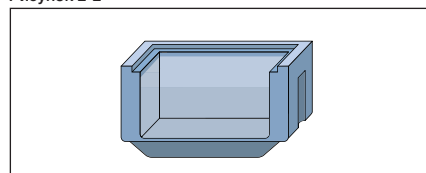


3.

### [Cryotop]

Наполните свежим жидким азотом 90% объема криованны.

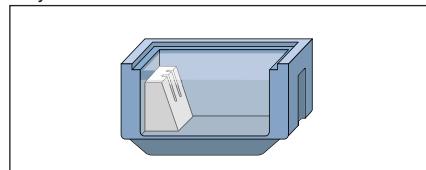
Рисунок 2-2



### [Cryotop SC для закрытой системы]

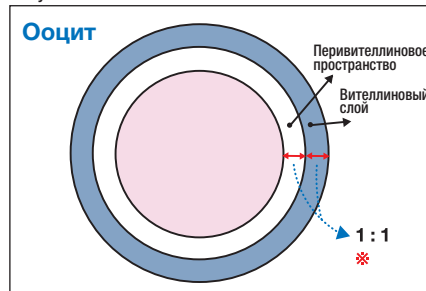
С самого начала поместите алюминиевую подставку в криованну SC. Затем наполните ее свежим жидким азотом до тех пор, пока он не покроет верхнюю границу алюминиевой подставки (См. Рисунок 2-3).

Рисунок 2-3



4. Удалите чашку для культивирования, содержащую ооцит или эмбрион, из инкубатора. При помощи пастеровской пипетки тщательно проверьте под микроскопом качество ооцита или эмбриона (См. Рисунок 2-4).

Рисунок 2-4



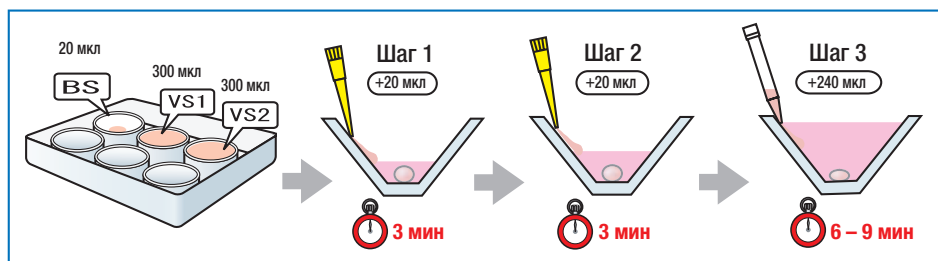
При витрификации ооцита необходимо удалить клетки кумулюса.

※ Сравните ширину перивителлинового пространства с толщиной вителлинового слоя и запишите соотношение (на рисунке показано соотношение 1:1). Это позволит убедиться в завершении эквilibрации после погружения в равновесный раствор (ES).

## ЧАСТЬ 3

## Эквilibрация

## Эквilibрация ооцита

**Эквilibрация ооцита – Шаг 1**

Сделайте надписи **BS**, **VS1** и **VS2** на крышке репродуктивного планшета. При помощи микропипетки накапайте 20 мкл базового раствора **BS** и по 300 мкл растворов для витрификации **VS1** и **VS2** в планшет (См. Рисунок 3-1). Незамедлительно накройте репродуктивный планшет крышкой.

**Эквilibрация ооцита – Шаг 2**

Аспирируйте ооцит на кончик пастеровской пипетки. Перенесите ооцит с минимальным объемом среды из чашки для культивирования на **ДНО** лунки с базовым раствором **BS** (20 мкл).

**Эквilibрация ооцита – Шаг 3 (в течение 3 минут)**

Установите секундомер (с функцией суммирования). Для проведения следующих этапов сверяйтесь по времени с секундомером. Перемещая микропипетку вдоль края лунки репродуктивного планшета, аккуратно добавьте 20 мкл равновесного раствора **ES** **НА ПОВЕРХНОСТЬ** основного раствора **BS**, в котором находится ооцит, и оставьте на 3 минуты (См. Рисунок 3-2).

**Эквilibрация ооцита – Шаг 4 (в течение 3 минут)**

Аккуратно добавьте еще 20 мкл равновесного раствора **ES** также **НА ПОВЕРХНОСТЬ** основного раствора **BS** и оставьте на 3 минуты (См. Рисунок 3-2).

**Эквilibрация ооцита – Шаг 5 (в течение 6-9 минут)**

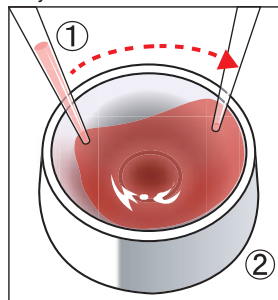
Аккуратно добавьте еще 240 мкл равновесного раствора **ES** также **НА ПОВЕРХНОСТЬ** основного раствора **BS** и оставьте на 9 минут (См. Рисунок 3-2).

При эквilibрации объем ооцита должен быть полностью восстановлен. Эквilibрация ооцита считается завершенной, когда ширина перевителлинового пространства станет равной его ширине до погружения в равновесный раствор **ES**.

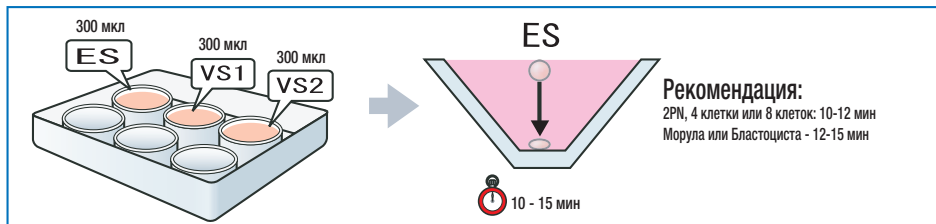
Рисунок 3-1



Рисунок 3-2



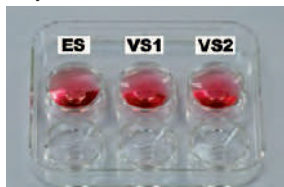
## Эквилибрация эмбриона



### Эквилибрация эмбриона – Шаг 1

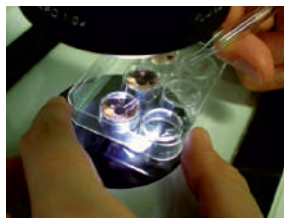
Сделайте надписи **ES**, **VS1** и **VS2** на крышке репродуктивного планшета. Аккуратно дважды переверните каждый флакон с равновесным раствором **ES** и раствор для витрификации **VS** для перемешивания содержимого. Используя микропипетку, накапайте по 300 мкл каждого раствора в планшет (См. Рисунок 3-3). Незамедлительно накройте репродуктивный планшет крышкой.

Рисунок 3-3



### Эквилибрация эмбриона – Шаг 2

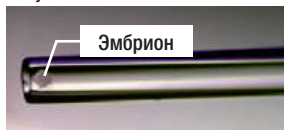
Аспирируйте эмбрион на кончик пастеровской пипетки (См. Рисунок 3-4). Переместите эмбрион с минимальным количеством среды в центр **НА ПОВЕРХНОСТЬ** равновесного раствора **ES**.



### Эквилибрация эмбриона – Шаг 3 (в течение 10-15 минут)

Установите секундомер (с функцией суммирования). Для проведения следующих этапов сверяйтесь по времени с секундомером. Эмбрион свободно погружается в течение 30 секунд. Он начинает спонтанно сжиматься и затем постепенно возвращается к первоначальному размеру по мере впитывания равновесного раствора **ES**, что свидетельствует о завершении этапа эквилибрации.

Рисунок 3-4



### ВНИМАНИЕ

При эквилибрации бластоцист необходимо дождаться исчезновения перивителлинового пространства. Рекомендуется проводить витрификацию бластоцисты на 5-й день.

#### Время, необходимое для процесса эквилибрации следующее:

Ооцит:	12-15 мин
2PN, 4 клетки или 8 клеток:	10-15 мин
Морула или бластоциста:	12-15 мин

## ЧАСТЬ 4

## Витрификация

Процедура аналогичная как для ооцитов, так и для эмбрионов.

## Витрификация – Шаг 1

После завершения эквilibрации аспирируйте ооцит (эмбрион) из равновесного раствора **ES** на кончик пастеровской пипетки (См. Рисунок 4-1). Перенесите ооцит (эмбрион) с минимальным количеством равновесного раствора **ES** в центр **на поверхность** раствора для витрификации **VS1**. Выдуйте только ооцит (эмбрион) в раствор для витрификации **VS1**. Во избежание попадания остатка равновесного раствора **ES**, находящегося в пастеровской пипетке, в раствор для витрификации **VS1**, необходимо выдуть равновесный раствор **ES** за пределы лунки. Аспирируйте свежий раствор для витрификации **VS1** и снова выдуйте его за пределы лунки. Аспирируйте свежий раствор для витрификации **VS1** пастеровской пипеткой.

Рисунок 4-1



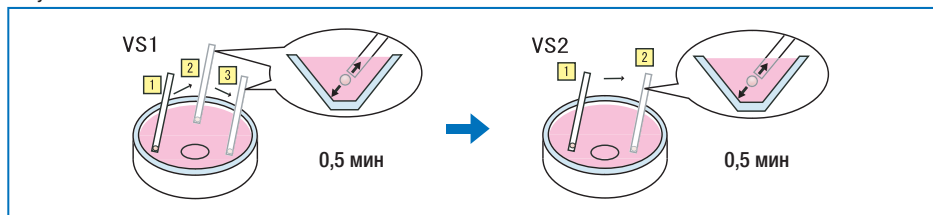
## Витрификация – Шаг 2 (в течение 0,5 минуты)

Используя пастеровскую пипетку, аспирируйте ооцит (эмбрион) из раствора для витрификации **VS1** и выдуйте его обратно в раствор для витрификации **VS1**. Быстро перемешайте 5 раз раствор вокруг ооцита (эмбриона). Повторите аспирацию, выдувания и перемешивания 3 раза, меняя положение в растворе для витрификации **VS1** (См. Рисунок 4-2). Таким образом, замените раствор вокруг ооцита (эмбриона) раствором для витрификации **VS1**, чтобы оставшийся равновесный раствор **ES** полностью исчез.

## Витрификация – Шаг 3 (в течение 0,5 минуты)

Выдуйте из пастеровской пипетки остаток раствора для витрификации **VS1** за пределы лунки. Аспирируйте свежий раствор для витрификации **VS2** в пастеровскую пипетку, затем аспирируйте на кончик пипетки ооцит (эмбрион) в растворе для витрификации **VS1**. Перенесите ооцит (эмбрион) с минимальным количеством раствора для витрификации **VS1** в раствор для витрификации **VS2**. При помощи пастеровской пипетки помешайте раствор вокруг ооцита (эмбриона), дважды меняя положение в растворе для витрификации **VS2** (См. Рисунок 4-2). Данный шаг можно считать завершенным, когда поверхность ооцита (эмбриона) полностью пропитается раствором для витрификации **VS**, и будет наблюдаться легкое сморщивание вследствие дегидратации.

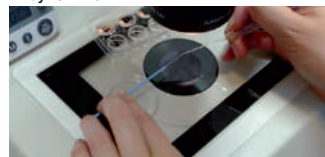
Рисунок 4-2



## Витрификация – Шаг 4

Поместите Cryotop под микроскоп (логотипом вверх) и настройте фокус на черную метку Cryotop (См. Рисунок 4-3).

Рисунок 4-3

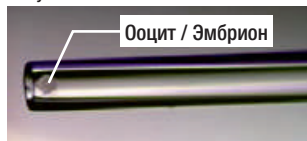




## Витрификация – Шаг 5

Аспирируйте погруженный в раствор для витрификации **VS2** ооцит (эмбрион) на кончик пастеровской пипетки (См. Рисунок 4-4). Поместите ооцит (эмбрион) с минимальным количеством (менее 0,1 мкл) раствора для витрификации **VS2** за черной меткой на носителе Cryotop (См. Рисунки 4-5а и 4-5b). При витрификации более 2 ооцитов (эмбрионов), сделайте по отдельной капле для каждого (См. Рисунки 4-6а и 4-6b).

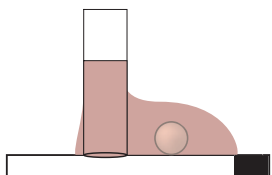
Рисунок 4-4



## Удаление избыточного количества раствора для витрификации VS с носителя

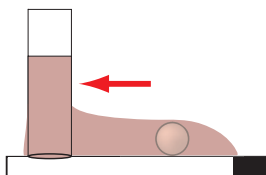
После помещения ооцита на носитель Cryotop следует удалить излишек раствора для витрификации VS путем аспирирования при помощи пипетки.

Шаг 1



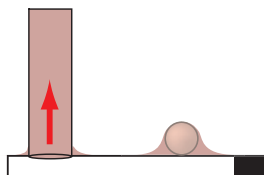
Поместите кончик пипетки в нижнюю часть большой капли раствора для витрификации VS.

Шаг 2



Передвиньте пипетку горизонтально по направлению от капли раствора для витрификации VS, растягивая каплю и уменьшая ее высоту.

Шаг 3



Аспирируйте избыточное количество раствора для витрификации VS и минимизируйте таким образом каплю раствора для витрификации VS (не аспирируя при этом ооцит).

Рисунок 4-5а

### Правильный вариант



Сделана плоская капля за черной меткой на носителе Cryotop.

Рисунок 4-5б

### Неправильный вариант



Сделана стерическая капля за черной меткой на носителе Cryotop. Количество раствора для витрификации VS2 избыточно.

Рисунок 4-6а

### Правильный вариант

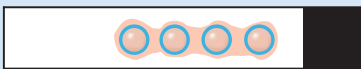
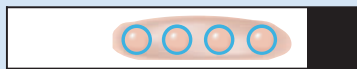


Рисунок 4-6б

### Неправильный вариант



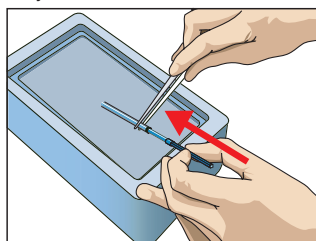
Процедуры витрификации для Cryotop® и Cryotop® SC различны.

## Cryotop® – Открытая система Витрификация 6-А

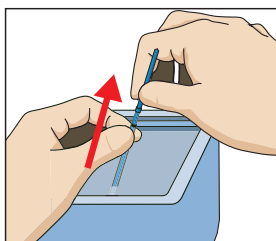
### Витрификация – Шаг 6

Погрузите Cryotop в жидкий азот. Удерживая при помощи пинцета покровный чехол, поместите Cryotop кончиком носителя в жидкий азот. Затем совместите Cryotop с чехлом, держа их руками и поворачивая чехол относительно Cryotop для того, чтобы убедиться, что чехол плотно подходит к Cryotop. (См. Рисунок 4-7).

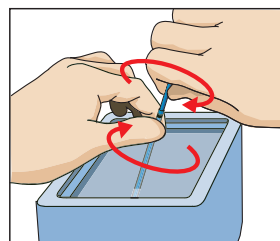
Рисунок 4-7



Возьмите чехол пинцетом и вставьте в него Cryotop.



Удерживая чехол пальцами, наденьте его до конца на Cryotop.



Поверните чехол и убедитесь, что он плотно прилегает к Cryotop.

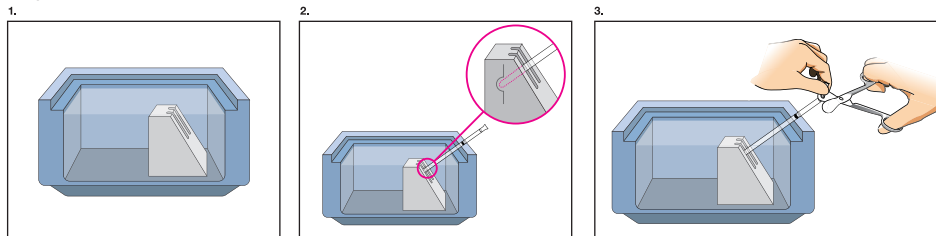
### ВНИМАНИЕ

Держите носитель Cryotop в жидком азоте вплоть до его перемещения в резервуар для хранения. При перемещении Cryotop в другой резервуар для хранения также держите его в жидком азоте. Не держите Cryotop на воздухе до начала процедуры размораживания.

## Cryotop® SC – Полностью закрытая система Витрификация 6-В

Не допуская прямого контакта с жидким азотом, поместите CryotopSC в покрывной чехол, предварительно размещенный на алюминиевой подставке. Затем произведите запаивание чехла (См. Рисунок 4-9).

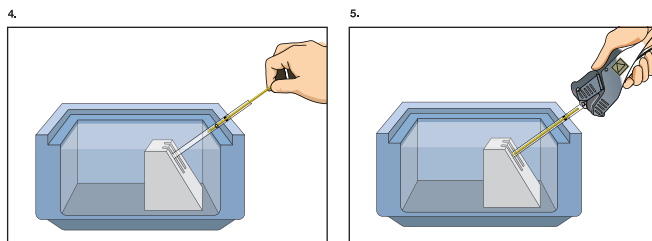
Рисунок 4-9



Предварительно наполните криованну жидким азотом так, чтобы он покрывал верхнюю границу алюминиевой подставки, и оставьте до тех пор, пока не прекратиться кипение (около 5 мин).

Поставьте чехол.

Отрежьте чехол по верхней нанесенной метке, используя ножницы для соломин.



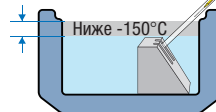
Поместите CryotopSC в чехол.

Произведите запаивание в верхней части чехла, используя запаиватель.

### 🔊 ВАЖНАЯ ОСОБЕННОСТЬ

Прислоните верхнюю часть чехла к стенке криованны. Такое размещение позволяет избежать влияния холодных паров от жидкого азота.

В пределах  
2,5 см



### ⚠️ ВНИМАНИЕ

Держите носитель CryotopSC в жидком азоте вплоть до его перемещения в резервуар для хранения. При перемещении CryotopSC в другой резервуар для хранения также держите его в жидком азоте. Не держите CryotopSC на воздухе до начала процедуры размораживания.





The image features a minimalist abstract design on a white background. It consists of several overlapping pink shapes: a large semi-circle in the upper right, a smaller semi-circle below it, a small solid circle in the lower left, and another semi-circle at the bottom right. The text 'Размораживание' is centered within the large upper semi-circle.

Размораживание

## ЧАСТЬ 1

# Необходимые материалы

- Растворы для размораживания VT602 (Кат. номер 91121) или VT802 (Кат. номер 91182).
  - № 1 Раствор для размораживания (TS): 2 флакона объемом 4 мл
  - № 2 Раствор для дилуции (DS): 1 флакон объемом 4 мл
  - № 3 Раствор для промывки (WS): 1 флакон объемом 4 мл
- Репродуктивный планшет – K1 (Кат. номер 83003)
- 2 чашки Петри
- Криованна (Кат. номер 84010): голубой контейнер из стирола для жидкого азота
- Пастеровская пипетка **См. ВНИМАНИЕ**
- Микроскоп (с выключенной нагревательной пластиной)
- Секундомер или Таймер (с функцией суммирования)
- Жидкий азот
- Пинцет
- 1 микропипетка: 100 – 1000 мкл

### Дополнительные материалы для Cryotop® SC

- Ножницы для соломин (Кат. номер 84117)



### ВНИМАНИЕ

Используйте пастеровскую пипетку с внутренним диаметром, соответствующим диаметру ооцита или эмбриона. Внешний диаметр ооцита составляет приблизительно 120 мкм, внешний диаметр эмбриона – приблизительно 120-250 мкм. Это необходимо для оптимизации объема растворов, что позволит создать наилучшие условия для их разбавления и, как следствие, получить наиболее высокий коэффициент выживаемости после размораживания.

## ЧАСТЬ 2

# Подготовка к размораживанию

1. Нагрейте запечатанный флакон раствора для размораживания **TS** и чашку Петри в инкубаторе до температуры 37°C (> 1,5 часа).
2. Доведите раствор для дилуции **DS** и раствор для промывки **WS** до комнатной температуры (25-27°C).
3. Извлеките из хранилища стеклянную пробирку с конкретным Cryotop, быстро погрузите ее в наполненную свежим жидким азотом криованну. Извлеките Cryotop из пробирки в жидком азоте. Проверьте информацию о пациенте на этикетке Cryotop.

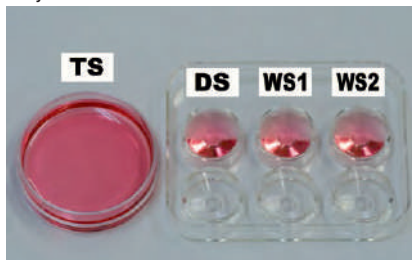


### ВНИМАНИЕ

Поместить криованну вблизи стереомикроскопа.

4. Сделайте надписи **DS**, **WS1** и **WS2** на крышке репродуктивного планшета. Дважды осторожно переверните каждый флакон с раствором для дилуции **DS** и раствором для промывки **WS**, чтобы перемешать их содержимое. При помощи микропипетки накапайте по 300 мкл раствора для дилуции **DS** и растворов для промывки **WS1** и **WS2** в репродуктивный планшет. Поместите его на предметный столик микроскопа и накройте крышкой. Выньте флакон с раствором для размораживания **TS** и чашку Петри из инкубатора и поместите чашку Петри на столик микроскопа. Дважды аккуратно переверните флакон с раствором для размораживания **TS** для перемешивания его содержимого и вылейте все содержимое флакона в чашку Петри (См. Рисунок 2-1).

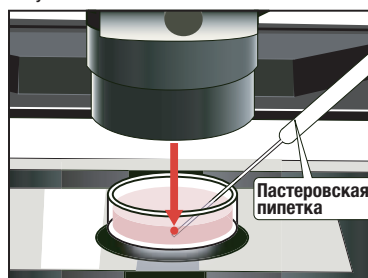
Рисунок 2-1



5. Настройте фокус микроскопа на чашку Петри, содержащую раствор для размораживания **TS**.

Используйте пастеровскую пипетку для более четкого наведения фокуса на центр чашки Петри (См. Рисунок 2-2).

Рисунок 2-2

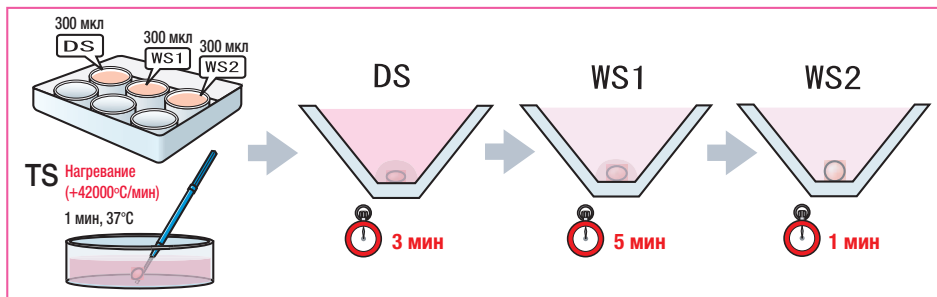




ЧАСТЬ 3

# Размораживание

Процедуры для Cryotop® и Cryotop®SC различны.

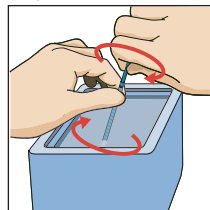


## Cryotop® – Открытая система

### Размораживание – Шаг 1

Осторожно поверните и снимите чехол с Cryotop в жидком азоте (См. Рисунок 3-1). Поместить его в углу криованны.

Рисунок 3-1



Установите секундомер (с функцией суммирования). Для проведения следующих этапов сверяйтесь по времени с секундомером

### Размораживание – Шаг 2

Приготовьте к использованию пастеровскую пипетку, пока Cryotop находится в жидком азоте. Установите секундомер (с функцией суммирования). Для проведения следующих этапов сверяйтесь по времени с секундомером.

### Размораживание – Шаг 3 (в течение 1 минуты)

Быстро погрузите носитель Cryotop в раствор для размораживания **TS** на предметном столике микроскопа. Это следует осуществить в течение 1 секунды (См. Рисунок 3-2). Найдите ооцит (эмбрион), настраивая фокус на черную метку на носителе Cryotop. Через 1 минуту после погружения в раствор для размораживания **TS** осторожно аспирируйте ооцит (эмбрион) при помощи пастеровской пипетки после его отделения от носителя. Также аспирируйте раствор для размораживания **TS** до тех пор, пока ооцит (эмбрион) не будет находиться на расстоянии 2 мм от кончика пастеровской пипетки (См. Рисунок 3-3).

Рисунок 3-2

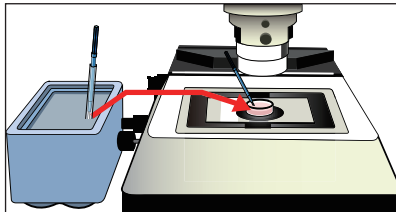
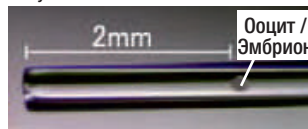


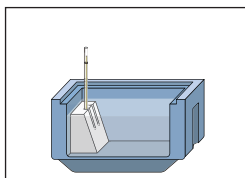
Рисунок 3-3



## Cryotop® SC – Закрытая система

### Размораживание – Шаг 1

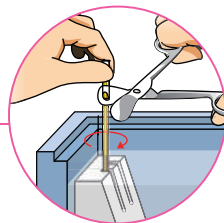
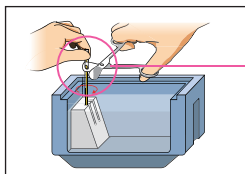
Поставьте CryotopSC на алюминиевую подставку.



### Размораживание – Шаг 2

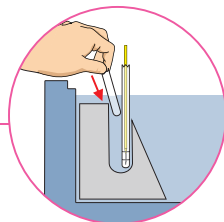
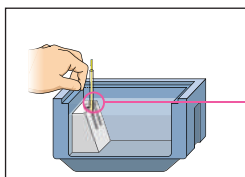
Отрежьте чехол по метке, используя ножницы для соломин.

Поместите лезвие на черную метку.  
Отрежьте чехол, медленно вращая его.



### Размораживание – Шаг 3

Приготовьте к использованию пастеровскую пипетку, пока CryotopSC находится в жидком азоте. Установите секундомер (с функцией суммирования). Для проведения следующих этапов сверяйтесь по времени с секундомером.



### Размораживание – Шаг 4

Поместите отрезанную часть чехла между CryotopSC и алюминиевой подставкой. Это позволит с легкостью вынуть CryotopSC.

### Размораживание – Шаг 5

(в течение 1 минуты)

Быстро погрузите носитель Cryotop в раствор для размораживания **TS** на предметном столике микроскопа. Это следует осуществить в течение 1 секунды (См. Рисунок 3-4). Найдите ооцит (эмбрион), настраивая фокус на черную метку на носителе Cryotop. Через 1 минуту после погружения в раствор для размораживания **TS** осторожно аспирируйте ооцит (эмбрион) при помощи пастеровской пипетки после его отделения от носителя. Также аспирируйте раствор для размораживания **TS** до тех пор, пока ооцит (эмбрион) не будет находиться на расстоянии 2 мм от кончика пастеровской пипетки (См. Рисунок 3-5).

Рисунок 3-2

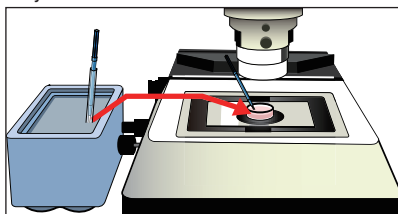
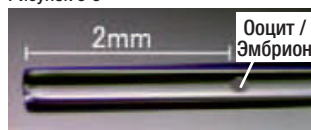


Рисунок 3-3



## ЧАСТЬ 4

# Диллюция

### Диллюция (течение 3 минут)

Медленно выдуйте из пастеровской пипетки только раствор для размораживания **TS** в центр на **ДНО** раствора для диллюции **DS** (См. Рисунок 4-1а), затем аккуратно поместите ооцит (эмбрион) на дно слоя раствора для размораживания **TS** (См. Рисунок 4-1б). Оставьте на 3 минуты. Это необходимо для наиболее плавного перемещения ооцита (эмбриона) из раствора для размораживания **TS** в раствор для диллюции **DS**.

Рисунок 4-1а

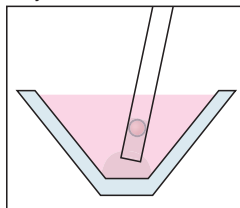
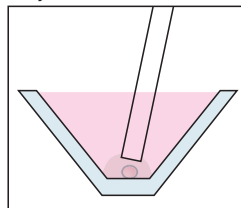


Рисунок 4-1б



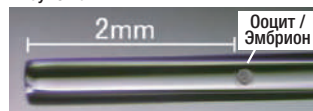
## ЧАСТЬ 5

# Промывание

### Промывание – Шаг 1 (в течение 5 минут)

Через 3 минуты после погружения в раствор для дилуции **DS** аккуратно аспирируйте ооцит (эмбрион) из раствора для дилуции **DS**, используя пастеровскую пипетку. Также аспирируйте раствор для дилуции **DS** до тех пор, пока ооцит (эмбрион) не будет находиться на расстоянии 2 мм от кончика пастеровской пипетки (См. Рисунок 5-1).

Рисунок 5-1



Медленно выдуйте только раствор для дилуции **DS** из пастеровской пипетки на **ДНО** в центр капли раствора для промывки **WS1** (См. Рисунок 5-2а), затем аккуратно поместите ооцит (эмбрион) также на дно (См. Рисунок 5-2b). Оставьте на 5 минут. Это также для наиболее плавного перемещения ооцита (эмбриона) из раствора для дилуции **DS** в промывочный раствор **WS1**.

Рисунок 5-2а

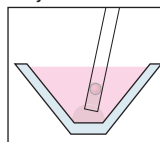
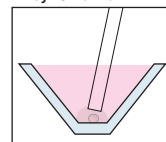


Рисунок 5-2b



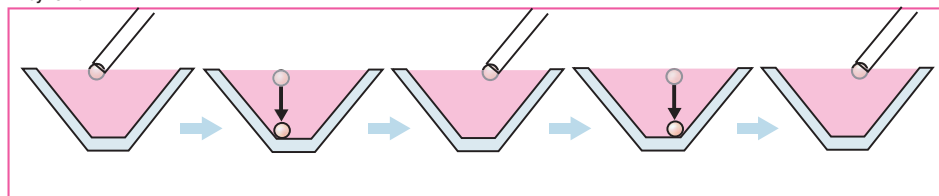
### Промывание – Шаг 2 (в течение 1 минуты)

Через 5 минут после погружения в раствор для промывки **WS1** при помощи пастеровской пипетки аспирируйте ооцит (эмбрион) с минимальным объемом промывочного раствора **WS1** (См. Рисунок 5-3) и поместите его в центр на **ПОВЕРХНОСТЬ** капли раствора для промывки **WS2**. После того, как ооцит (эмбрион) самостоятельно опустится на дно раствора для промывки **WS2**, повторите ту же процедуру еще раз в растворе для промывки **WS2** (См. Рисунок 5-4).

Рисунок 5-3

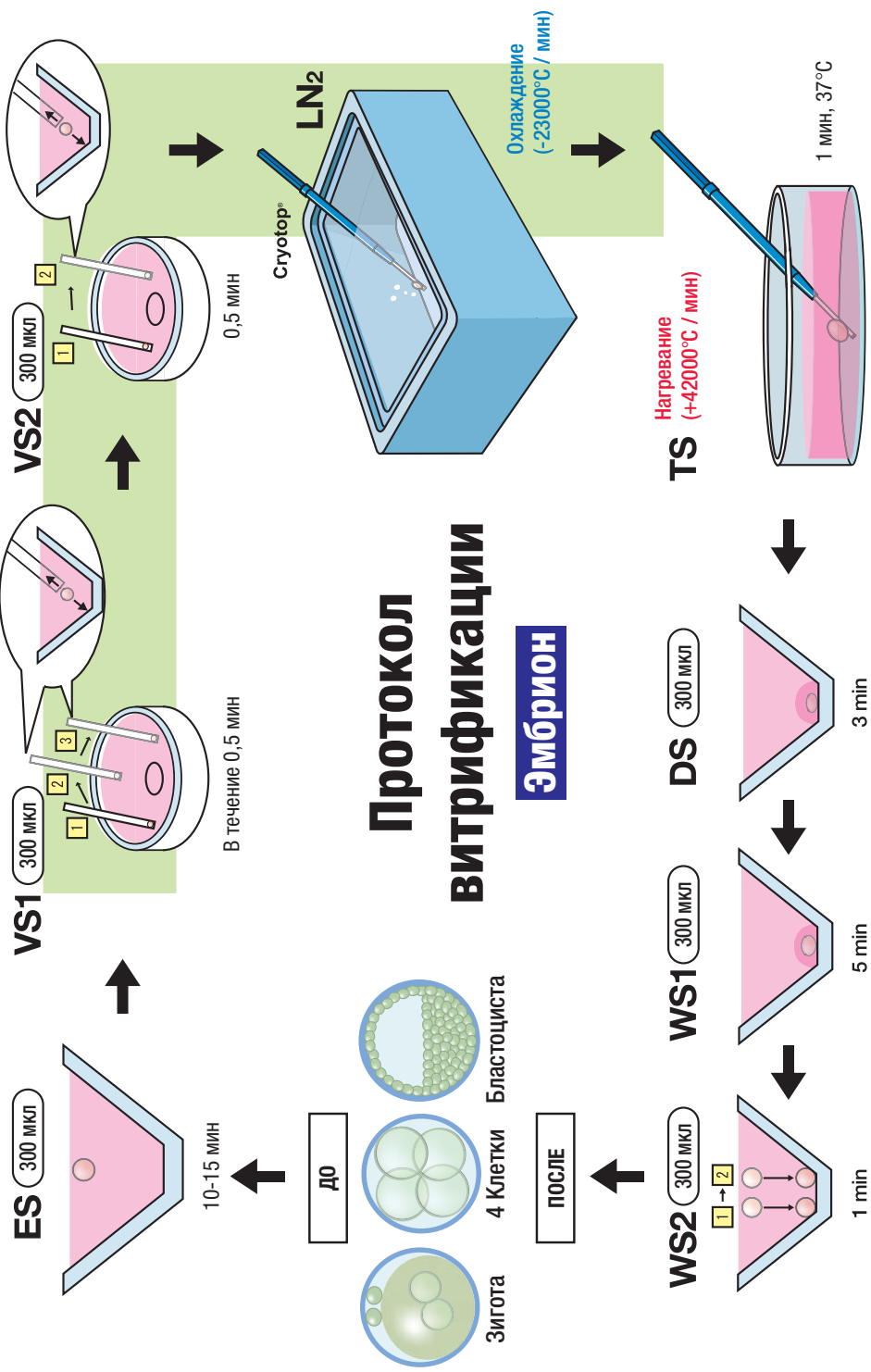


Рисунок 5-4



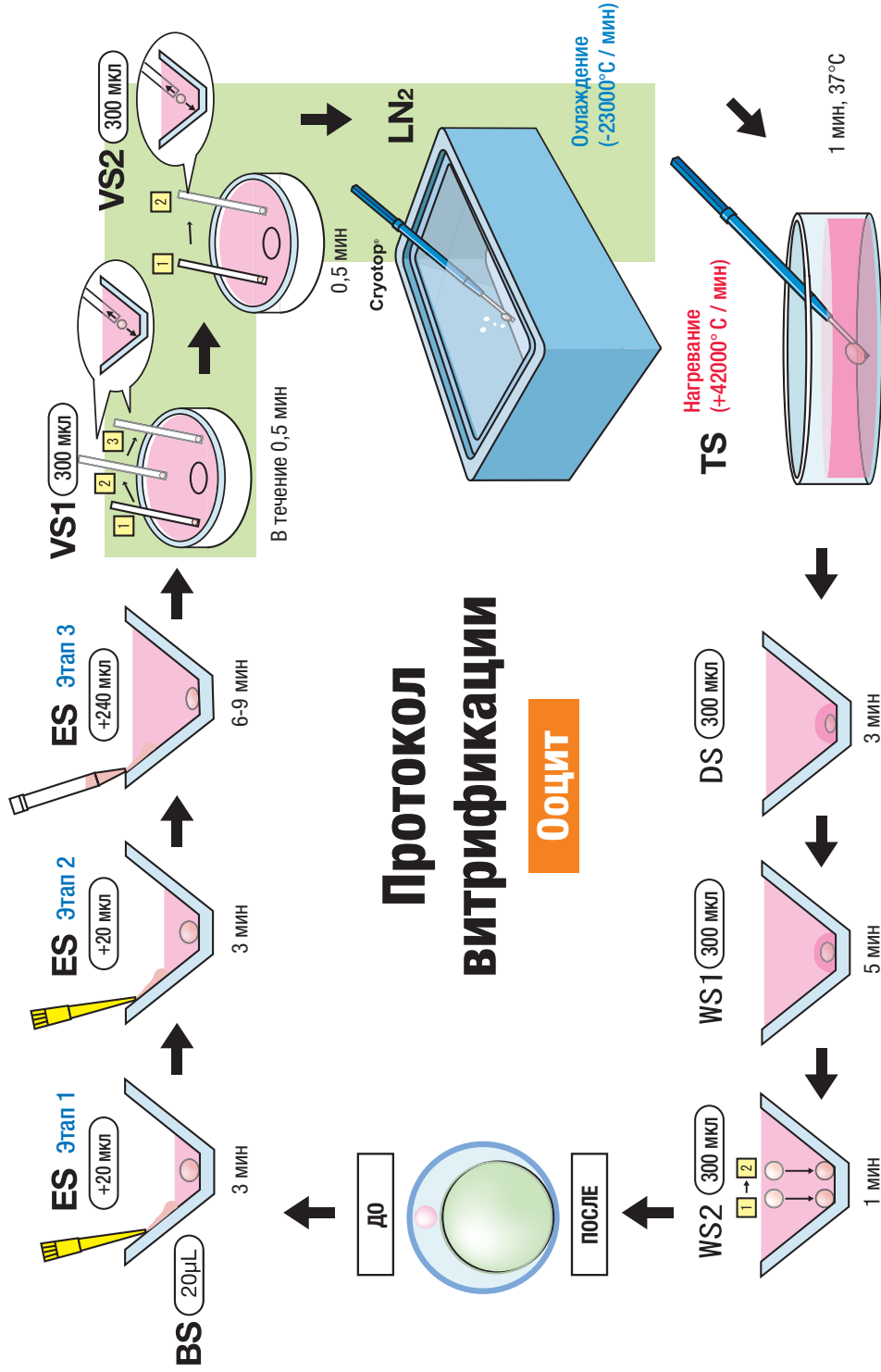
### Промывание – Шаг 3

Переместите ооцит (эмбрион) в чашку для культивирования, содержащую соответствующую питательную среду. Инкубируйте ооцит (эмбрион) при температуре 37 °C до полного восстановления. Завершение процесса восстановления: для ооцита (эмбриона) рекомендованы 2 часа.



# Протокол витрификации

## Эмбрион



# Протокол Витрификации

**Ооцит**



