

VITAVITRO

玻璃化冷解冻

「 用户指南 」

产品清单

- | | |
|----------------------------------|--|
| 1 VitaVitro® 冷冻试剂盒 (HHM、HV1、HV2) | 7 1个60mm或90mm 有盖培养皿 |
| 2 VitaVitro® 解冻试剂盒 (HHM、HV1、HV2) | 8 1个35mm 有盖培养皿 |
| 3 体视显微镜 | 9 10 μ l、100 μ l和1000 μ l移液器及相应的无菌吸头 |
| 4 显微镜加热台 | 10 计时器 |
| 5 加热垫 (置于显微镜旁边) | 11 液氮及液氮盒 |
| 6 1个四孔皿 (4WD) | 12 冷冻载杆或冻存管 (自由适配) |

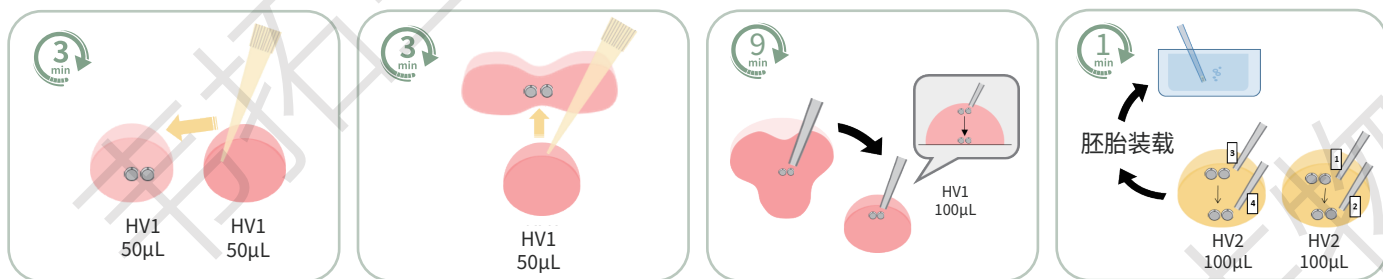
卵母细胞

准备

- 1 所有程序均应在室温25-27°C下进行。
- 2 复温：冷冻操作 HHM、HV1、HV2复温到25-27°C；解冻操作 HW1预热到37°C，HW2、HHM复温到25-27°C。

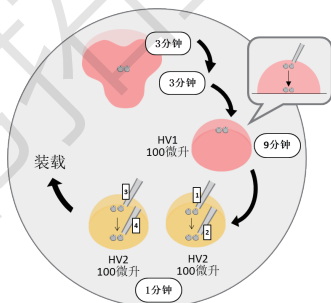
玻璃化冷冻

- 1 将卵母细胞放入50微升基础液(HHM)中，用移液枪头拨动冷冻液1(HV1)与基础液(HHM)联通。
∞ 第一次液滴桥接联通
⌚ 等待3分钟
- 2 再吸取一滴50微升冷冻液1(HV1)，用移液枪拨动第二滴冷冻液1(HV1)与步骤1液体联通。
∞ 第二次液滴桥接联通
⌚ 等待3分钟
- 3 将卵母细胞移入100微升冷冻液1(HV1)液滴表面上方，让其缓慢下沉。
⌚ 等待9分钟
✖ 9分钟后，体视显微镜下检查卵母细胞是否已完全恢复，若尚未完全恢复，则可再等3-6分钟。
✖ 等待时盖上皿盖以减少蒸散，勿混合、移动或干扰液滴。
✖ 等待时提前准备好载杆。
- 4 将卵母细胞移至100微升冷冻液2(HV2)，在冷冻液2(HV2)内轻柔转移卵母细胞位置2次；将卵母细胞移至第二滴100微升冷冻液2(HV2)，在冷冻液2(HV2)内轻柔转移卵母细胞位置2次，并将其放于液滴底部，随即进行装载及放入液氮。
⌚ 自冷冻液2(HV2)至液氮中共1分钟



※ 注意事项:

- 1 使用内径与卵母细胞直径相适应的吸胚管。
- 2 每次冷冻卵母细胞建议不超过3枚。
- 3 为维持操作期间冷冻液的渗透压稳建，操作液量最佳建议为200微升，最少不低于100微升，可依实验室系统环境进行调整。
- 4 冷冻卵母细胞或2PN受精卵推荐使用OPS载杆。



卵母细胞

解冻复苏

① 将载杆末端自液氮快速浸入0.5毫升37℃解冻液1(HW1)中,卵母细胞悬浮后将载杆移出。

⌚ 等待1分钟(37℃)

② 将卵母细胞转移到2号孔0.5毫升解冻液2(HW2)中。

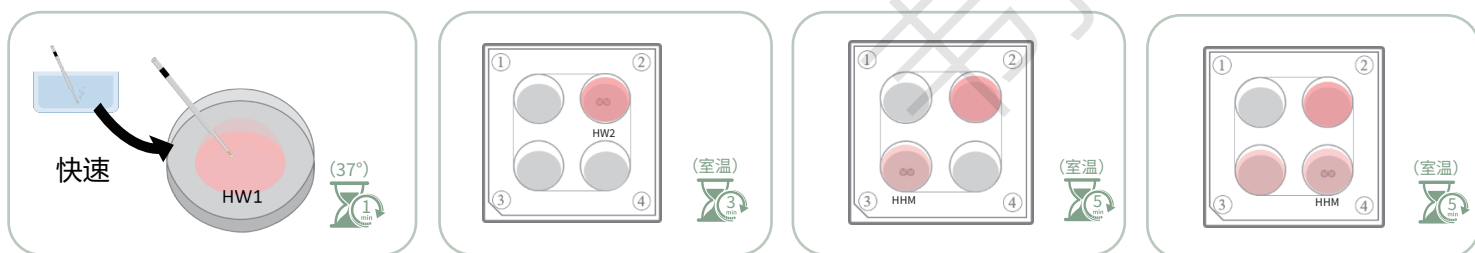
⌚ 等待3分钟(室温)

③ 将卵母细胞转移到3号孔0.5毫升基础液(HHM)中。

⌚ 等待5分钟(室温)

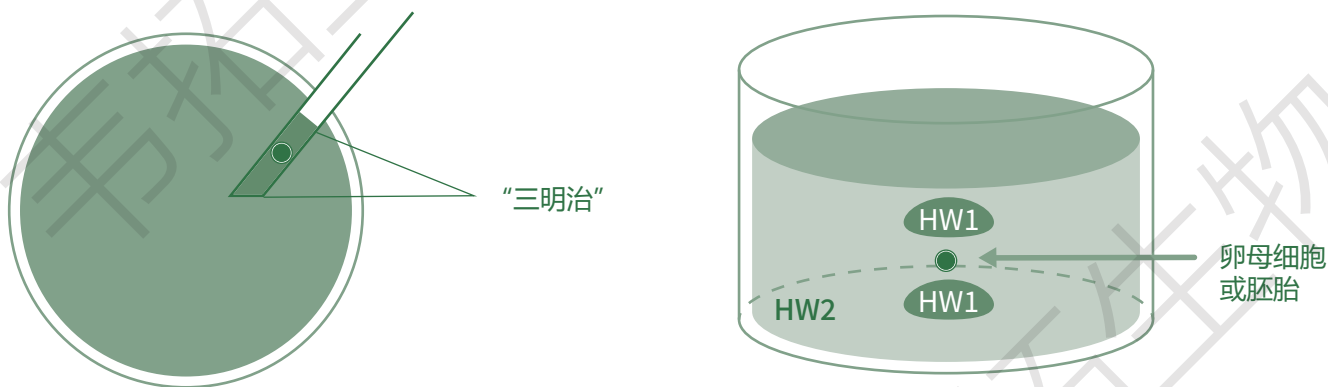
④ 将卵母细胞转移到4号孔0.5毫升基础液(HHM)中静置5分钟后即可转移至培养液。

⌚ 等待5分钟(室温)



※ 三明治法说明:

步骤1-3中, 每转移至下一步时需夹带较多上一步骤的液体, 使卵母细胞吐出时被上一步骤的液体上下包覆, 如下图:



※ 注意事项:

■ 解冻第一步骤的升温速度极为重要, 为确保解冻质量, 解冻液1(HW1)操作液体量最佳建议1毫升, 最少不低于0.5毫升。

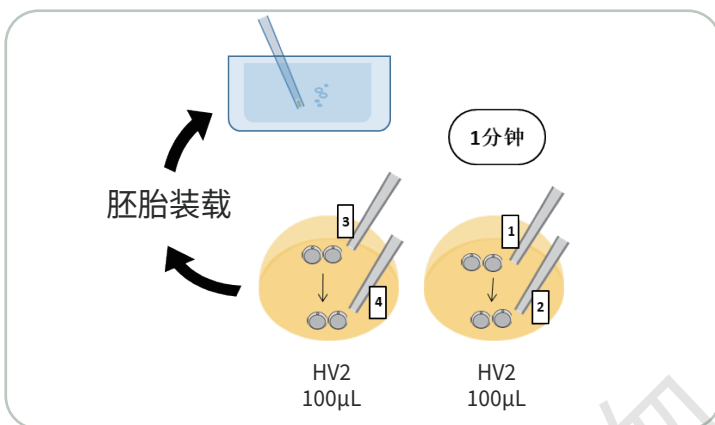
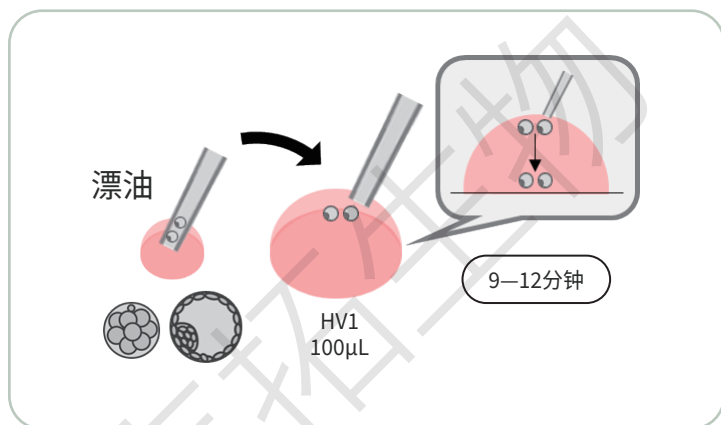
第2-6天胚胎

准备

- 1 所有程序均应在室温25-27℃下进行。
- 2 复温：冷冻操作 HHM、HV1、HV2复温到25-27℃；解冻操作 HW1预热到37℃，HW2、HHM复温到25-27℃。

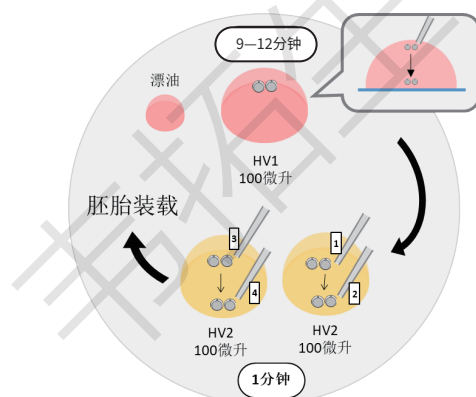
玻璃化冷冻

- 1 移胚管经过20微升基础液(HHM)漂油后，将胚胎移入100微升冷冻液1(HV1)液滴表面上方，让其缓慢下沉。(见图1)
⌚ 等待5-15分钟(建议9-12分钟)
✖ 5分钟后体视显微镜下检查胚胎是否已完全恢复，若尚未完全恢复，则可再等3-10分钟。
✖ 等待时盖上皿盖以减少蒸散，勿混合、移动或干扰液滴。
✖ 等待同时提前预备好载杆。
- 2 将胚胎移至100微升冷冻液2(HV2)，在冷冻液2(HV2)内轻柔转移胚胎位置2次;将胚胎移至第二滴100微升冷冻液2(HV2),在冷冻液2(HV2)内轻柔转移胚胎位置2次,并将其放于液滴底部，随即进行装载及放入液氮。(见图2)
⌚ 自冷冻液2(HV2)至液氮中共1分钟



※ 注意事项:

- 1 使用内径与胚胎直径相适应的吸胚管。
- 2 每次冷冻胚胎建议不超过3枚。
- 3 为维持操作期间冷冻液的渗透压稳建，操作液量最佳建议为200微升，最少不低于100微升，可依实验室系统环境进行调整。
- 4 冷冻胚胎推荐使用OPS载杆。



第2-6天胚胎

解冻复苏

① 将载杆末端自液氮快速浸入0.5毫升37℃解冻液1(HW1)中,胚胎悬浮后将载杆移出。

⌚ 等待1分钟(37℃)

② 将胚胎转移到2号孔0.5毫升解冻液2(HW2)中。

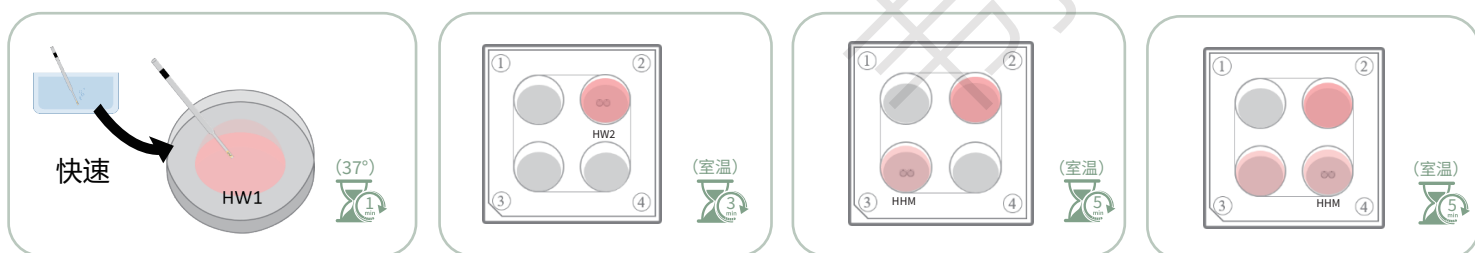
⌚ 等待3分钟(室温)

③ 将胚胎转移到3号孔0.5毫升基础液(HHM)中。

⌚ 等待5分钟(室温)

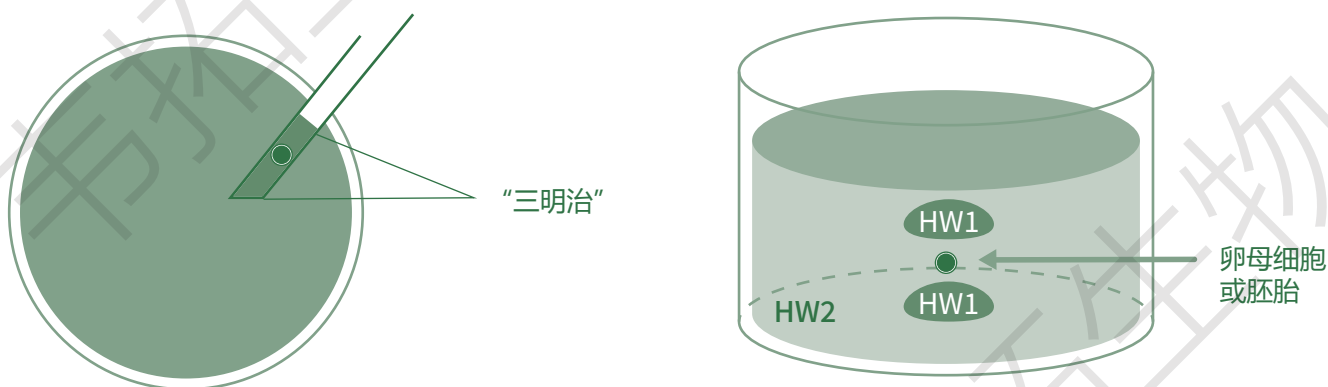
④ 将胚胎转移到4号孔0.5毫升基础液(HHM)中静置5分钟后即可转移至培养液。

⌚ 等待5分钟(室温)



※ 三明治法说明:

步骤1-3中, 每转移至下一步时需夹带较多上一步骤的液体, 使胚胎吐出时被上一步骤的液体上下包覆, 如下图:



※ 注意事项:

■ 解冻第一步骤的升温速度极为重要, 为确保解冻质量, 解冻液1(HW1)操作液体量最佳建议**1毫升**, 最少不低于0.5毫升。