

Набор для размораживания и протоколы Irvine Scientific

**ПРОТОКОЛ РАЗМОРАЖИВАНИЯ ООЦИТОВ (МП) И ЭМБРИОНОВ**

Все процедуры должны проходить при комнатной температуре (22-27 °C). Не используйте нагревательную поверхность!

Figure 1:

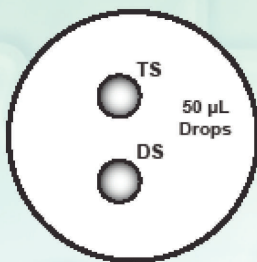


Figure 2:

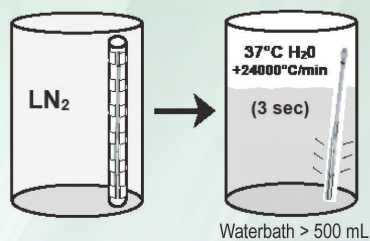


Figure 3:

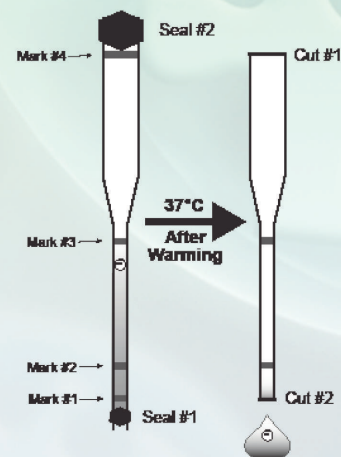
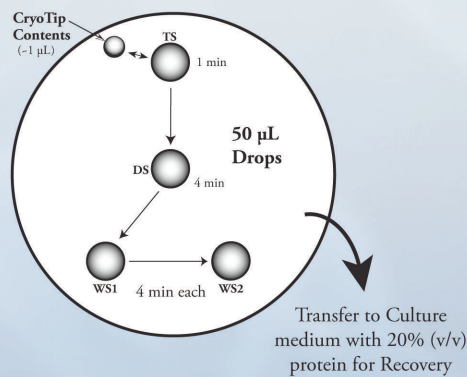


Figure 4:

TS = Thawing Solution  
DS = Dilution Solution  
WS = Washing Solution



## ПРОТОКОЛ РАЗМОРАЖИВАНИЯ ООЦИТОВ (MII) И ЭМБРИОНОВ

*ВНИМАНИЕ: Сведите к минимуму воздействие света на образец во время манипуляций посредством растворов для размораживания.*

1. Доведите кол-во сред TS, DS, и WS которое будет использовано, до комнатной температуры (20-27° C), перед разморозкой витрифицированных образцов.

*ПРИМЕЧАНИЕ: Избегайте повторного доведение до комнатной температуры всех пробирок TS, DS и WS когда каждый раз необходимо небольшое кол-во раствора. Лучше разделить на аликвоты кол-во для использования и вернуть пробирки в 2-8° C сразу же после деления.*

2. Наполните резервуар для жидкого азота с LN2 (на ≈ 80%) и поместите близко к морозильной камере LN2, содержащей образцы для размораживания.

3. Извлеките трости с бокалами, содержащие соломины CryoTip с витрифицированными образцами из хранилища с жидким азотом в резервуаре с LN2.

*ВНИМАНИЕ: Убедитесь, что соломины CryoTip остаются погруженными в LN2 (в гоблете-бокале) во время перемещения из хранилища в резервуар с LN2, чтобы предотвратить бесконтрольное оттаивание образцов.*

*Поместите резервуар близко к микроскопу для быстрой манипуляции.*

4. Наклейте на стерильную чашку Петри (или крышку) этикетку с необходимой информацией.

5. Аккуратно переверните каждую пробирку TS, DS и WS дважды, чтобы перемешать содержимое перед использованием.

6. Асептически приготовьте последовательность из 2 микрокапель на перевернутую крышку стерильной чашки Петри как на Рисунке 1, и поместите чашку на столик микроскопа:

- Одну (1) 50 мкл каплю TS
- Одну (1) 50 мкл каплю DS
- (2 капли WS будут установлены позже на этапе 13)

7. Поставьте водяную баню (37°С) близко к микроскопу. Иметь поблизости: пипетки для переноса и информацию, стерильные острые ножницы, шприц Гамильтона и стерильные салфетки.

8. С помощью пинцета (или щипцов), извлеките конкретный CryoTip из трости в жидком азоте, быстро погрузите CryoTip в водяную баню 37 ° C (> 500 мл) и медленно помешивайте в течение 3-х секунд, чтоб нагреть (Рисунок 2) на +24000°С/мин.

9. Быстро распределите содержимое соломины CryoTip ( см. Рисунок 3):

- Быстро протрите насухо CryoTip стерильной салфеткой
- Снимите металлический чехол (metal cover sleeve)
- Отрежьте широкий запаянный конец соломины по отметке №4 (Mark #4)
- Присоедините соломинку CryoTip® к аспирационному устройству (Шприц Гамильтона) через адаптер (connector).

*ПРИМЕЧАНИЕ: Поднимите поршень шприца примерно на 0,5 дюйма, перед тем как присоединить шприц к адаптеру (connector) и к CryoTip.*

- Аккуратно протрите тонкий наконечник насухо стерильной салфеткой.
- Поместите тонкий запаянный конец соломины CryoTip над подготовленной чашкой и быстро отрежьте его по отметке Mark#2 и распределите содержимое соломины небольшой каплей (1 мкл) на сухой области чашки над каплей TS (см. Рисунок 4) **ИЗБЕГАЙТЕ ОБРАЗОВАНИЯ ПУЗЫРЬКОВ!**

10. Объедините каплю TS с содержанием соломины CryoTip и позвольте постепенное смешивание в течение 1 мин. (см. Рисунок 4).

*Примечание: образцы будут сжиматься, и плавать на поверхности капли.*

*ПРИМЕЧАНИЕ: После каждого переноса образца (ов), выдуть оставшуюся жидкость в пипетку для переноса и приготовить немного раствора.*

11. Подготовьте немного DS в пипетку для переноса и перенесите образец (ы) из капли TS с минимальным объемом в каплю DS на 4 минуты.

*ПРИМЕЧАНИЕ: Образец останется сморщенным во время воздействия DS. В это время подготовьте две (2) капли 50 мкл WS (WS1, WS2), как на Рисунке 4.*

12. Перенесите образец (ы) в каплю WS (WS1) на 4 минуты.

*ПРИМЕЧАНИЕ: Образец (ы) должны вновь расширится до первоначального размера в течение 2-3 минут в капле WS.*

13. Далее перенесите образец (ы) во вторую каплю WS (WS2) на 4 минуты.

14. Затем, перенесите образец в чашку с заранее подготовленной культуральной средой (с белком). Выдержите образец (ы) соответственно в 37°С инкубаторе с CO2 в течении 3-4 часов, чтобы завершить восстановление до дальнейших манипуляций (например, оплодотворение ооцитов, переноса или расширенного культивирования эмбрионов).