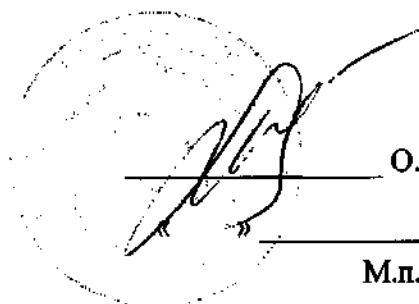


«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «ФармИнформ»



О.Е. Макарова

20__г.

М.п.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Среды культуральные и реактивы для ЭКО
(экстракорпорального оплодотворения)**

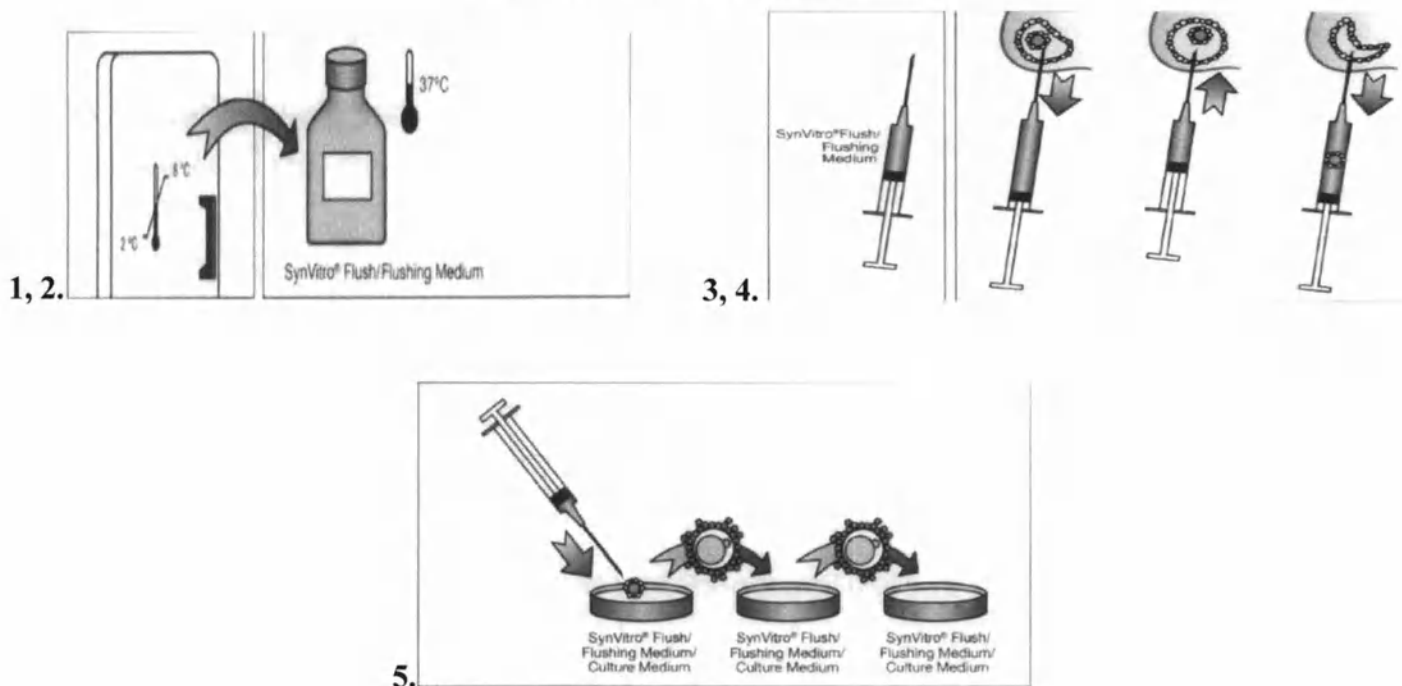
I. Среда и реактивы для подготовки к ЭКО (IVF).

1. Среда для промывки ооцитов, с феноловым/красным, pH=7,4, без гепарина 125 мл (каталожный номер 10840125).
2. Среда для промывки ооцитов, с феноловым/красным, pH=7,4, без гепарина 5 x 60 мл (каталожный номер 10845060).
3. Среда для промывки ооцитов, с феноловым/красным, pH=7,4, с 10 МЕ/мл гепарина, 125 мл (каталожный номер 10760125).
4. Среда для промывки ооцитов, с феноловым/красным, pH=7,4, с 10 МЕ/мл гепарина 5 x 60 мл (каталожный номер 10765060).
5. Среда для промывки ооцитов Син Витро без фенолового/красного, с 10 МЕ/мл гепарина 125 мл (каталожный номер 15760125).
6. Среда для промывки ооцитов Син Витро без фенолового/красного, без гепарина 125 мл (каталожный номер 15840125).

Данные среды используются для забора и промывки человеческих ооцитов.

Протокол

Среда для промывки ооцитов (SynVibro Flush/Flushing Medium)



1. Подогрейте предварительно Среда для промывки ооцитов (SynVibro Flush/Flushing Medium) до температуры 37°C.

2. Продолжайте держать Среду для промывки ооцитов (SynVibro Flush/Flushing Medium) при температуре 37°C в подогреваемом блоке во время сей процедуры забора ооцитов и их доставки в эмбриологическую лабораторию.
3. Заполните шприцы, предназначенные для промывки фолликулов, средой для промывки ооцитов (SynVibro Flush/Flushing Medium). Отберите фолликулярную жидкость и промойте фолликулы объемом среды, эквивалентным объему забранной фолликулярной жидкости. Будьте аккуратны и следите за тем, чтобы размеры фолликулярных клеток не превысили их первоначальный размер.
4. Промойте ооциты с помощью Среды для промывки ооцитов (SynVibro Flush/Flushing Medium) или уравновешенной средой для культивирования, осторожно удаляя все компоненты свернувшейся крови и клетки гранулезы.
5. Перенесите ооциты в уравновешенную среду для культивирования и оставьте при температуре 37°C в атмосфере 5-6% CO₂.

7. **Среда для приготовления сперматозоидов, с феноловым красным, 10 x 10мл**
(каталожный номер 10701010).

8. **Среда для приготовления сперматозоидов, с феноловым красным, 2 x 10 мл**
(каталожный номер 10702010).

9. **Среда для приготовления сперматозоидов, с феноловым красным, 60мл**
(каталожный номер 10700060).

10. **Среда для приготовления сперматозоидов, с феноловым красным, 5 x 60мл**
(каталожный номер 10705060).

11. **Среда для приготовления сперматозоидов, без фенолового красного, 10 x 10мл**
(каталожный номер 10691010).

12. **Среда для приготовления сперматозоидов, без фенолового красного, 60мл**
(каталожный номер 10690060).

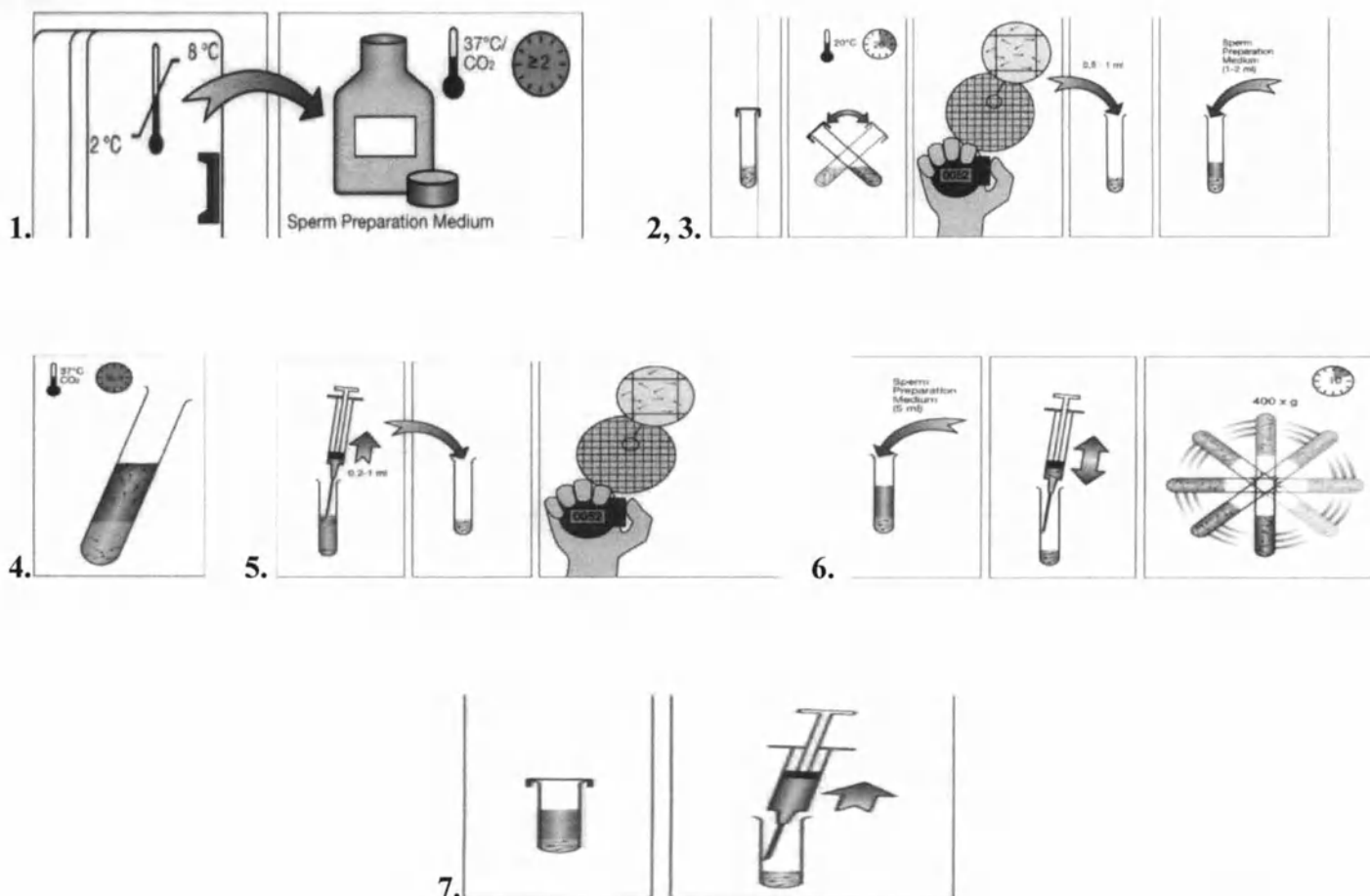
13. **Среда для приготовления сперматозоидов, без фенолового красного, 5 x 60мл**
(каталожный номер 10695060).

Используется метод "swim-up", при котором происходит 30 – 60 минутное инкубирование спермы. При этом она остается интактной и покрывается Средой для приготовления сперматозоидов таким образом, чтобы подвижные сперматозоиды могли всплыть. Может также применяться метод центрифугирования в градиенте плотности СупраСперм.

Протокол

Среда для приготовления сперматозоидов

(Sperm Preparation Medium)



1. После забора образца спермы он тщательно встряхивается (согласно процедуре принятой в вашей лаборатории в течение 20 мин. при комнатной температуре). Если образец недостаточно жидкий, его пипетируют через узкую пипетку и/или смешивают с небольшим количеством среды для приготовления сперматозоидов (Sperm Preparation Medium).

2. После того как процедура смешивания завершена, концентрация и подвижность сперматозоидов определяется под микроскопом.

3. Аккуратно поместите 0,5-1 мл жидкой спермы на дно пробирки. А сверху наложите 1-2 мл предварительно уравновешенной среды для приготовления сперматозоидов (Sperm Preparation Medium).

4. По возможности разместите пробирку под наклоном с тем, чтобы увеличить площадь пограничной зоны между образцом и средой, что способствует лучшей миграции подвижных клеток из образца спермы в среду. Поместите штатив в атмосферу 5-6% CO₂ при температуре 37°C на 30-60 минут в зависимости от качества спермы.

Методом "swim-up" вы можете работать и при комнатной температуре, в этом случае крышки пробирок должны быть плотно закрыты для сохранения pH среды.

5. После процесса «всплытия» отберите верхние 0.2-1 мл и проверьте количество сперматозоидов в них. Если их концентрация низкая, следует произвести дополнительный отбор еще 0,5 мл и объединить его с первоначально забраным объемом. Внимание! При повторном заборе, будьте аккуратны и не нарушайте границы равновесия между средой и осадком.

6. Если необходимо отделить максимальное количество сперматозоидов, добавьте 5 мл среды для приготовления сперматозоидов (Sperm Preparation Medium), смешайте и отцентрифугируйте при 400 x g в течение 10 минут.

7. Удалите супернатант и ресуспандируйте осадок в соответствующем количестве уравновешенной среды для приготовления сперматозоидов (Sperm Preparation Medium).

Если вы используете пробирки с плотно прикрывающимися крышками, приготовленные образцы могут оставаться при комнатной температуре (20-25 °C) в течение одного часа до оплодотворения.

Рекомендовано также заворачивать их в алюминиевую фольгу. В противном случае, не обернутые образцы должны находиться при 5-6% CO₂ и 37°C.

14. СупраСперм 90, 90% раствор для приготовления градиента, 60 мл (каталожный номер 10910060).

15. СупраСперм 90, 90% раствор для приготовления градиента, 500 мл (каталожный номер 10910500).

16. СупраСперм 100, 100% раствор для приготовления градиента, 60 мл (каталожный номер 10970060).

17. СупраСперм 100, 100% раствор для приготовления градиента, 2 x 60 мл (каталожный номер 10972060).

18. СупраСперм 100, 100% раствор для приготовления градиента, 500 мл (каталожный номер 10970500).

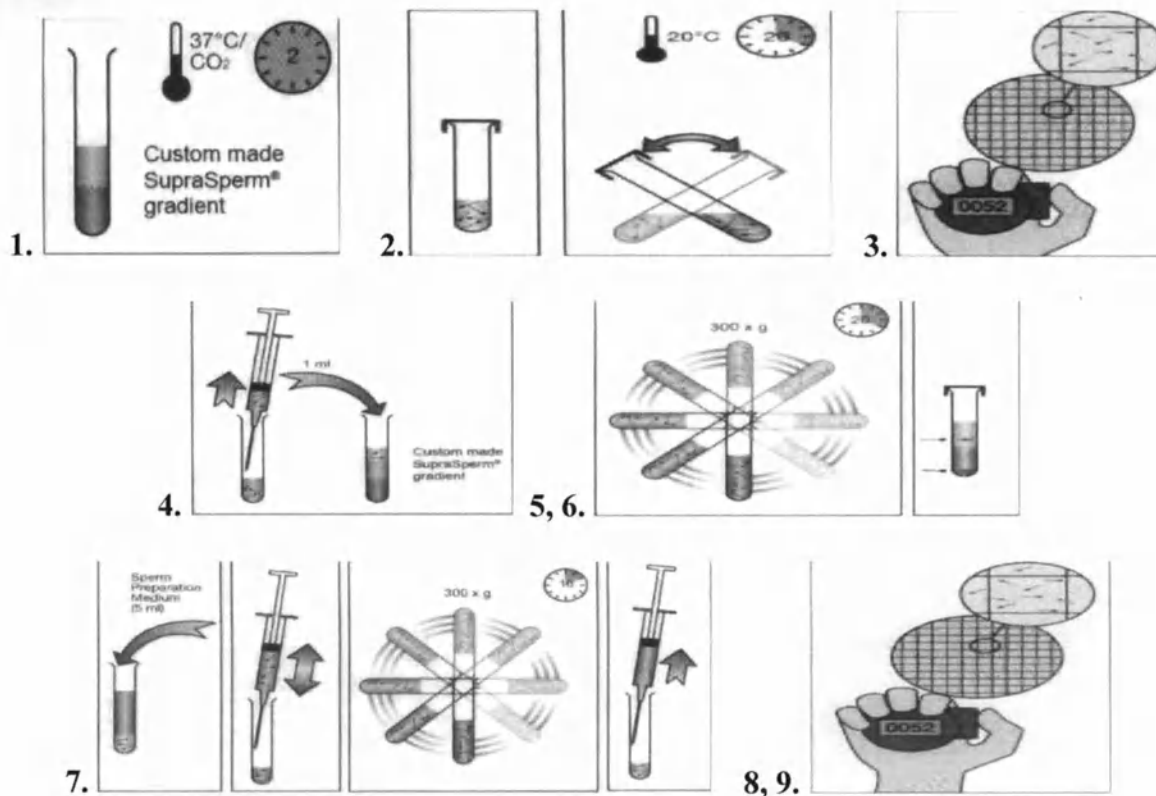
19. Система СупраСперм, готовые к применению 55% и 80% растворы градиентов, 2 x 10 мл (каталожный номер 10922010).

20. Система СупраСперм, готовые к применению 55% и 80% растворы градиентов, 2 x 60 мл (каталожный номер 10922060).

СупраСперм применяется для экстрагирования подвижных жизнеспособных сперматозоидов с помощью метода центрифугирования в градиенте плотности.

Протокол

СупраСперм (SupraSperm)



1. Для каждого образца спермы на каждый 1 мл его объема приготовьте отдельный градиент. Градиент составляется из 1-2 мл 55% СупраСперм (SupraSperm) и 1-2 мл 80% СупраСперм (SupraSperm) (55% раствор наслаивается на 80%). Данная система предварительно уравнивается в 5-6% CO₂ при 37°C.

Для получения оптимальных результатов систему градиентов готовят непосредственно перед использованием.

2. Образец спермы тщательно взбалтывается (путем повторных наклонов в течение 20 минут при комнатной температуре).

3. После перемешивания производится измерение концентрации и подвижности клеток данного образца.

4. Осторожно наложите жидкий образец поверх приготовленного градиента.

Добавление избыточного объема образца ухудшает результат.

5. Центрифугирование проводят при 300 x g в течение 20 минут.

6. Удалите супернатант, а осадок (с минимальным остатком 80% раствора) перенесите в чистую центрифужную пробирку.

7. Разведите осадок в 5 мл уравновешенной среды для приготовления сперматозоидов (Sperm Preparation Medium) и отцентрифугируйте вновь при 300 x g 10 минут. Удалите супернатант. Повторите процедуру дважды.

8. Добавьте небольшое количество уравновешенной среды для приготовления сперматозоидов (Sperm Preparation Medium) и измерьте показатели подвижности и концентрации в промытом образце.

9. Разведите отмытые сперматозоиды в соответствующем объеме среды для приготовления сперматозоидов (Sperm Preparation Medium).

При использовании пробирок с плотно закрывающимися крышками подготовленный образец может находиться при комнатной температуре (20-25 °C) до одного часа до процедуры инсеминации. Рекомендуется оборачивать образцы спермы в алюминиевую фольгу. Если данное условие не соблюдается образец следует хранить в условиях 5-6% CO₂ и 37°C.

21. Среда PVP, с феноловым/красным, готовая к применению, 1 мл (каталожный номер 10890001).

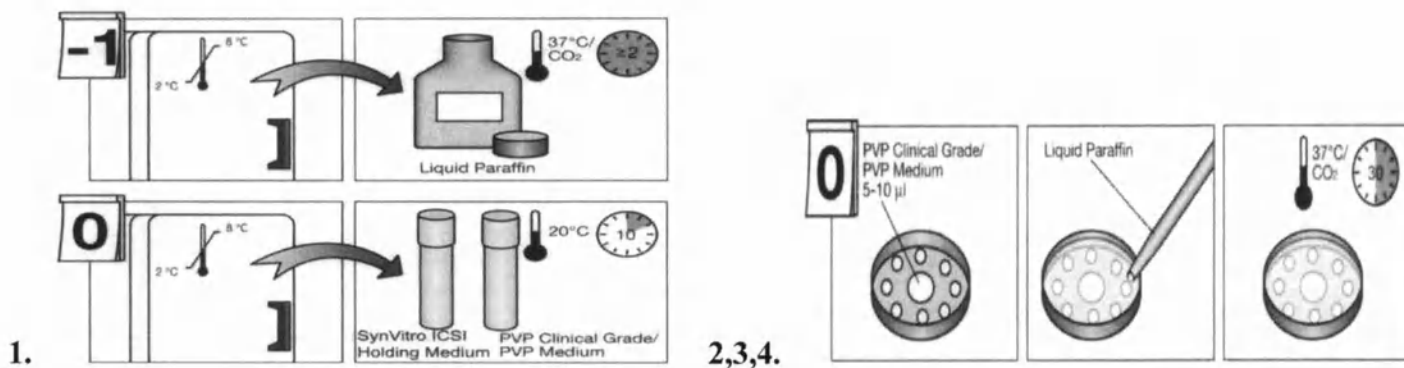
22. PVP, клинический градиент, без фенолового/красного, готовый к применению, 5 x 0,2 мл (каталожный номер 10905000).

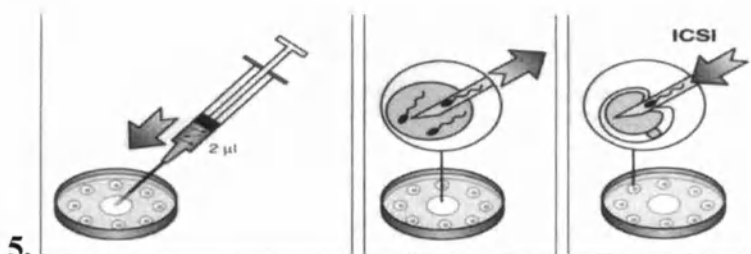
Данные среды используются для замедления движения сперматозоидов, что необходимо для процедуры внутриплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ).

Протокол

Среда PVP и PVP, клинический градиент

(PVP Medium/PVP Clinical Grade)





5.

1. Достаньте Среду PVP и Среду СинВитро ИКСИ Холдинг, хранящиеся при +2 - +8°C и оставьте при комнатной температуре на 10 минут.

2. В зависимости от числа ооцитов для инъекции нанесите пипеткой соответствующее число капель по 10 мкл Среды СинВитро ИКСИ Холдинг (SynVibro ICSI Holding Media) на дно ИКСИ чашки. (Смотрите инструкцию для Среды СинВитро ИКСИ Холдинг (SynVibro ICSI Holding Media)).

3. В центр той же чашки поместите 5-10 мкл Среда PVP или PVP, клинического градиента (PVP Medium/PVP Clinical Grade).

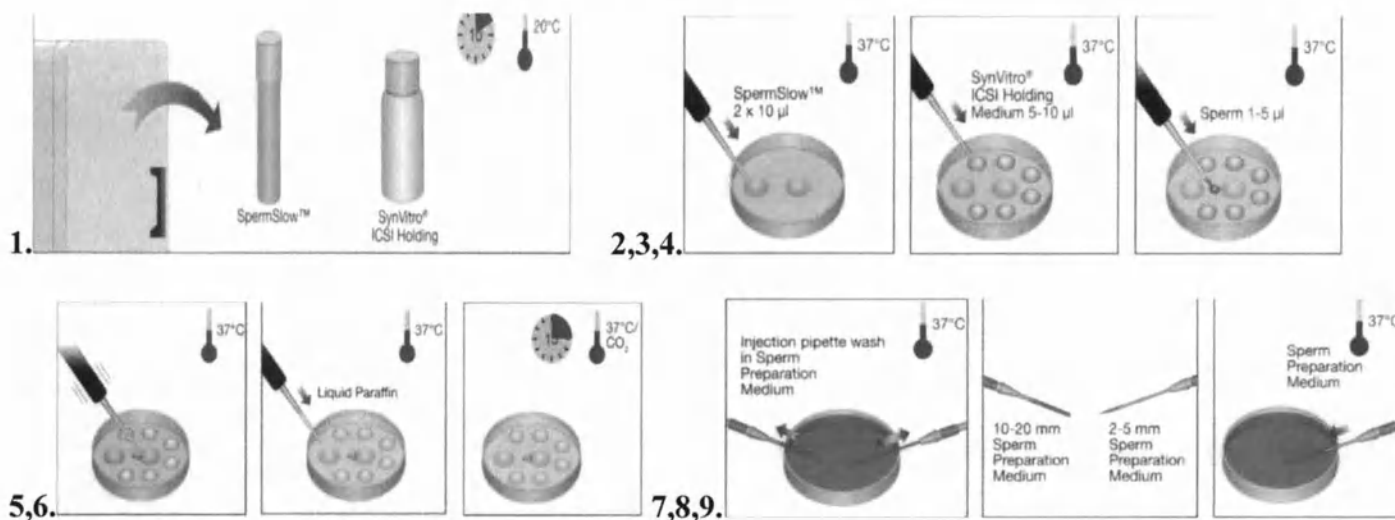
4. Покройте подготовленным жидким парафином и поместите чашку в 5-6% CO₂ при температуре 37°C на 30 минут перед тем как использовать.

5. Введите 2 мкл подготовленной и отмытой спермы в каплю среды PVP (PVP Medium). PVP уменьшит подвижность спермы и облегчит забор отдельного сперматозоида в инъекционную пипетку.

23. СпермСлоу, без фенолового/красного 4 x 0,1 мл (каталожный номер 10944000). – Среда предназначена для снижения подвижности и отбора более зрелых и жизнеспособных сперматозоидов, которые в дальнейшем будут использованы для процедуры ИКСИ.

Протокол

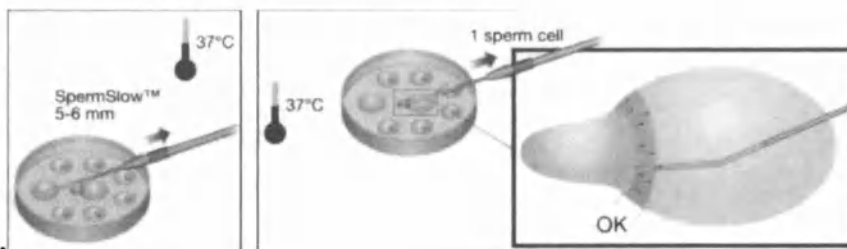
СпермСлоу (SpermSlow)



5,6.

7,8,9.

10,11.



1. Достаньте СпермСлоу (SpermSlow) и SynVitro ICSI Holding Medium из холодильной камеры (+2 - +8°C) и оставьте при комнатной температуре на 10 минут.
2. Нанесите 2 капли по 10 мкл СпермСлоу (SpermSlow) на дно чашки для ИКСИ, температура которой должна поддерживаться на уровне 37°C на протяжении всей процедуры (одна капля в центр, одна капля ближе к краю).
3. В зависимости от числа ооцитов, используемых в ИКСИ процедуре, нанесите пипеткой соответствующее количество капель SynVitro ICSI Holding Medium по 5-10 мкл каждая.
4. Поместите небольшое количество, например 1-5 мкл, подготовленного образца спермы в непосредственной близости от капли со средой СпермСлоу (SpermSlow) в центре чашки.
5. используйте кончик пипетки для создания соединения между капелькой спермы и каплей СпермСлоу (SpermSlow) в центре.
6. Немедленно покройте ИКСИ чашку подготовленным жидким парафином и поместите в 5-6% CO₂ инкубатор при температуре 37°C на 15 минут до начала использования.
7. Промойте/прополаскайте инъекционную пипетку в подготовленной Среде для приготовления сперматозоидов (Sperm Preparation Medium). Аспирируйте 10-20 мм среды в холдтнговую пипетку и 2-5 мм в инъекционную пипетку.
8. Через одну минуту удалите Среду для приготовления сперматозоидов (Sperm Preparation Medium) из инъекционной пипетки в чашку Петри со Средой для приготовления сперматозоидов (Sperm Preparation Medium).
9. Поместите ооциты в капли SynVitro ICSI Holding Medium.
10. Аспирируйте 5-6 мм СпермСлоу (SpermSlow) в инъекционную пипетку.
11. Аккуратно выберите зрелый сперматозоид в районе соединения капли спермы с каплей СпермСлоу (SpermSlow). Зрелый сперматозоид будет связан гиалуронидазой в СпермСлоу (SpermSlow). Поэтому ищите сперматозоид с наилучшей морфологией.ю с хвостом, но не совершающего движение вперед (т.е. совершающего «движение на месте»). Сперматозоиды, свободно передвигающиеся в капле СпермСлоу (SpermSlow), являются незрелыми и не должны подлежать отбору.

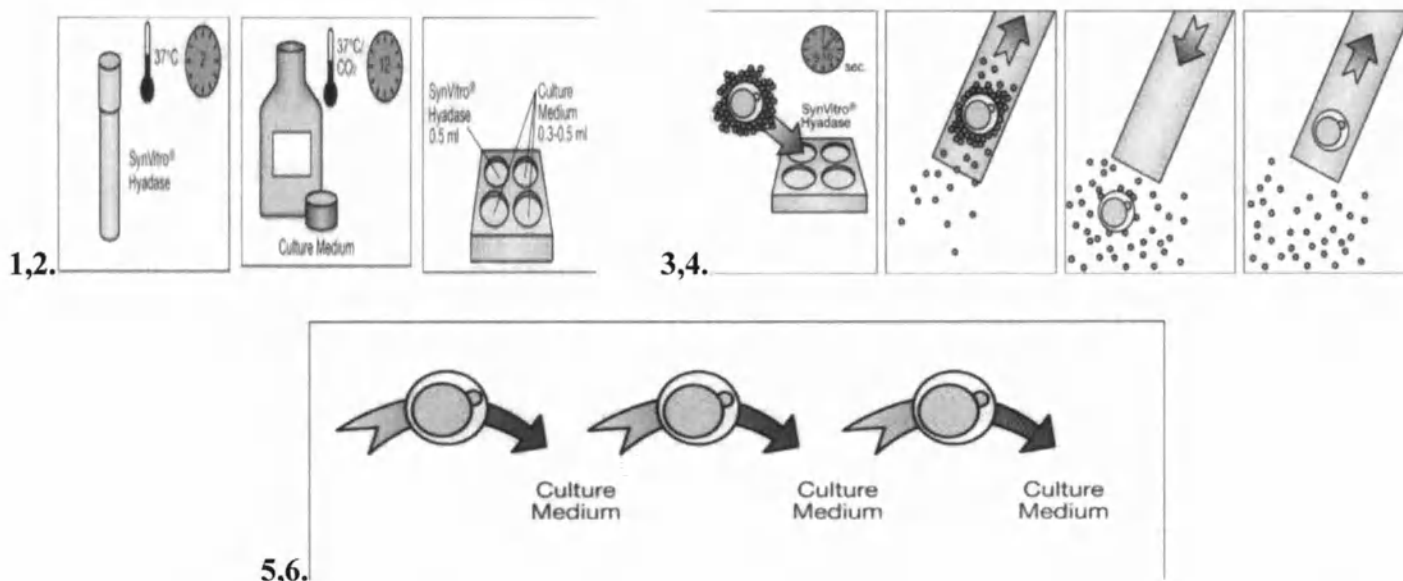
24. СинВитро Гидаза (Гиалуронидаза), готовая к применению, 5 x 1 мл (каталожный номер 15115001) – среда для удаления клеточного комплекса, окружающего ооцит, при подготовке их к процедуре ИКСИ. Среда полностью готова к использованию и представляет собой исключительно

синтетическую среду с содержанием 80 МЕ/мл фермента гиалуронидазы. Данный фермент - не бычьего происхождения и лицензирован для терапевтического использования у человека.

Протокол

СинВитро Гидаза (Гиалуронидаза)

(SynVibro Hyadase)



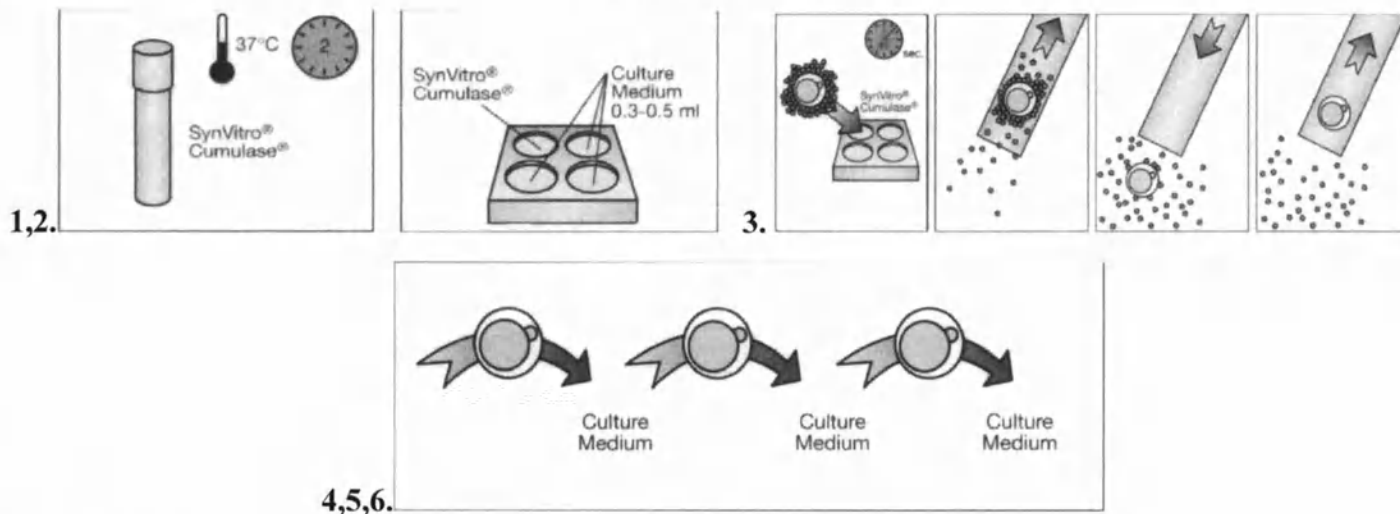
1. Подогрейте СинВитро Гидазу (SynVibro Hyadase) до 37°C в течение 2 часов, не снимая крышки.
2. Заполните одну из лунок 4-х луночного планшета содержимым одной виалы СинВитро Гидазой (SynVibro Hyadase) (0,5 мл) и 3 других лунки – уравновешенной культуральной средой, которую вы обычно используете в вашей лаборатории.
3. Поместите один или несколько ооцитов с кумулюсным комплексом в лунку с СинВитро Гидазой (SynVibro Hyadase). После 10 секунд, осторожно методом пипетирования (туда-обратно) добиваетесь денудирования ооцитов.
4. Перенесите ооцит/ооциты в лунку со средой для культивирования и удалите остатки кумулюсного комплекса с помощью пипетки для денудации.
5. Тщательно промойте ооциты посредством их перенесения из лунки в лунку со средой.
6. Затем ооциты переносятся в чашку для инъекций и помещаются в индивидуальную микрокаплю, покрытую уравновешенным жидким парафином.

Рекомендуется оставлять ооцит в среде для культивирования на короткий период времени перед процедурой ИКСИ.

25. ИКСИ Кумулаза 5 x 0,5 мл (каталожный номер 16125000) - разработана для удаления клеток комплекса, окружающего ооцит, перед процедурой ИКСИ. Традиционные продукты для денудации получают из образцов тканей животных. Такие факторы, как контаминация, аллергические реакции и

токсические эффекты, беспокоят нас в тот момент, когда начинаем использовать данную продукцию, поэтому время экспозиции ооцитов сокращаем до минимума.

Протокол ИКСИ Кумулаза



1. Подогреть среду до 37°C в течение 2 часов не снимая крышки.

2. Зополните одну из лунок 4-х луночного планшета содержимым одной виалы ИКСИ Кумулаза и 3 других лунки – уравновешенной средой для культивирования, которую вы обычно используете в вашей лаборатории.

3. Поместите один или несколько ооцитов в лунку с ИКСИ Кумулазой. После 60 секунд осторожно методом пипетирования (туда-обратно) добиваетесь денудирования ооцитов.

4. Перенесите ооцит/ооциты в лунку со средой для культивирования.

5. Тщательно промойте ооциты посредством перенесения их из лунки в лунку с культуральной средой.

6. Затем ооцит переносят в чашку для инъекций, в индивидуальную микрокаплю, покрытую уравновешенным жидким парафином.

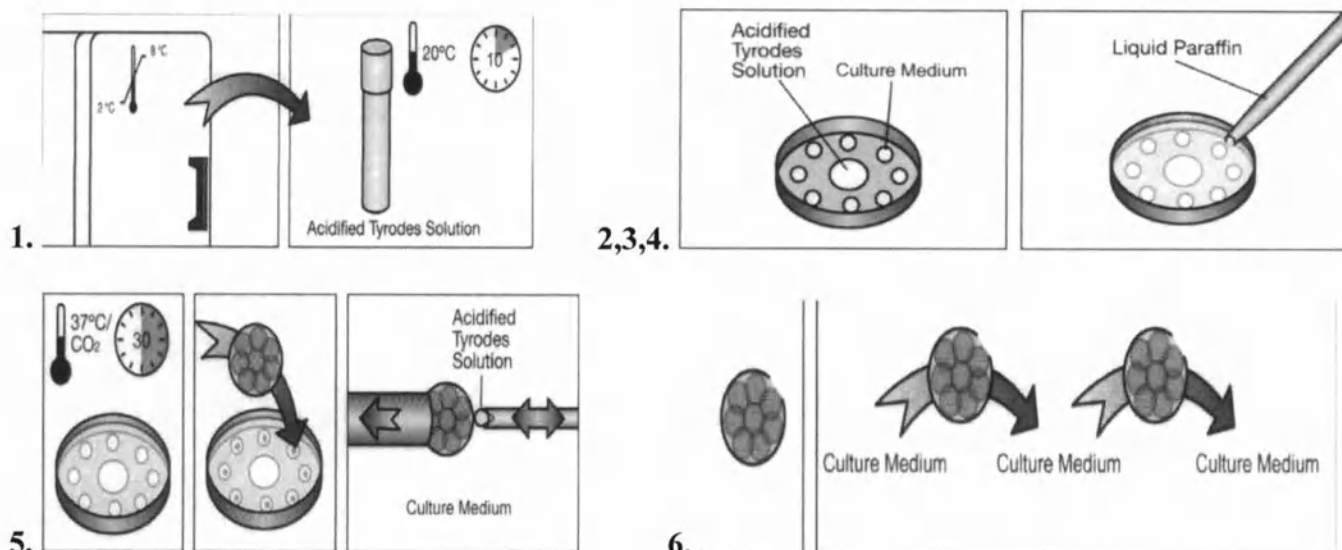
Рекомендуется некоторое время выдержать ооцит в среде культивирования перед процедурой ИКСИ.

26. Кислый раствор Тироде, готовый к применению, 5 x 0,2 мл (каталожный номер 10605000) – используется для химического дреллинга зоны пеллюцида, что облегчает проведение хэтчинга и забора бластомеров для преимплантационной генетической диагностики.

Протокол

Кислый раствор Тироде

(Acidified Tyrodes Solution)



1. Приготовьте чашку Петри с 1 микрокаплей Кислого раствора Тироде (Acidified Tyrodes Solution) и несколькими каплями предварительно уравновешенной Средой для приготовления сперматозоидов (Sperm Preparation Medium). Покройте чашку подготовленным Жидким парафином Liquid Paraffin). И поместите в условия CO₂ при 37°C перед применением.

2. Поместите каждый эмбрион в микрокапли Среды для приготовления сперматозоидов.

3. Наполните пипетку для дреллинга зоны Кислым раствором Тироде (Acidified Tyrodes Solution) и стабилизируйте движение жидкости.

4. Прикрепите эмбрион к холдинговой пипетке (шприцевая система) так, чтобы микроигла и Кислым раствором Тироде (Acidified Tyrodes Solution) располагалась в области 3 часов. Как только микроигла коснется поверхности зоны, несколько раз подвигайте ее назад и вперед, одновременно выпустив минимальное количество Кислого раствора Тироде. На этой стадии рекомендуется отсасывание, чтобы удалить вест использованный Кислый раствор Тироде.

Внимание! Общее время для того, чтобы сделать отверстие в зоне, не должно превышать 5-7 секунд.

5. Очень важно не допустить повреждения blastomeres в течение этой процедуры. Сначала растворяется внешняя часть зоны, а затем внутренняя. Примерно в половине случаев зона открывается сама, в остальных случаях можно расширить отверстие механически, передвигая микроиглолку. Размер отверстия должен быть 15-20 μm .

6. Немедленно промойте эмбрионы. Перемещая их между несколькими каплями Среды для приготовления сперматозоидов и, наконец, поместите их в среду для переноса. Последующее содержание эмбрионов должно быть очень бережным, чтобы не допустить потери blastomeres.

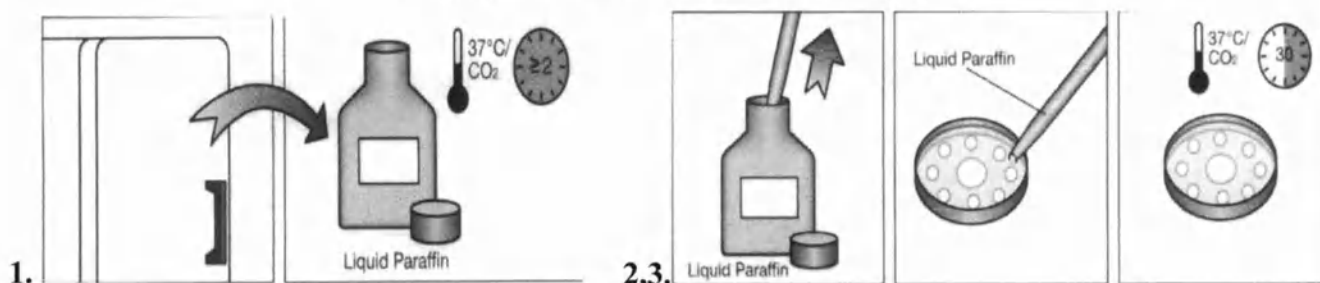
II. Минеральное масло для культивирования (жидкий парафин).

1. Парафиновое масло, стерильное, готовое к применению, 60 мл (каталожный номер 10100060)
2. Парафиновое масло, стерильное, готовое к применению, 5 x 60 мл (каталожный номер 10105060)
3. Парафиновое масло, стерильное, готовое к применению, 500 мл (каталожный номер 10100500)

Используется для покрытия капель сред при проведении процедур ЭКО и ИКСИ.

Протокол

Парафиновое масло (Жидкий парафин)



1. Поместите парафиновое масло в 5-6% CO₂ при температуре 37°C не менее чем на 2 часа до начала использования.
2. Нанесите на дно чашки Петри предполагаемое к использованию количество микрокапель.
3. Аккуратно наносите парафиновое масло в чашку Петри так, чтобы капли были покрыты маслом полностью.

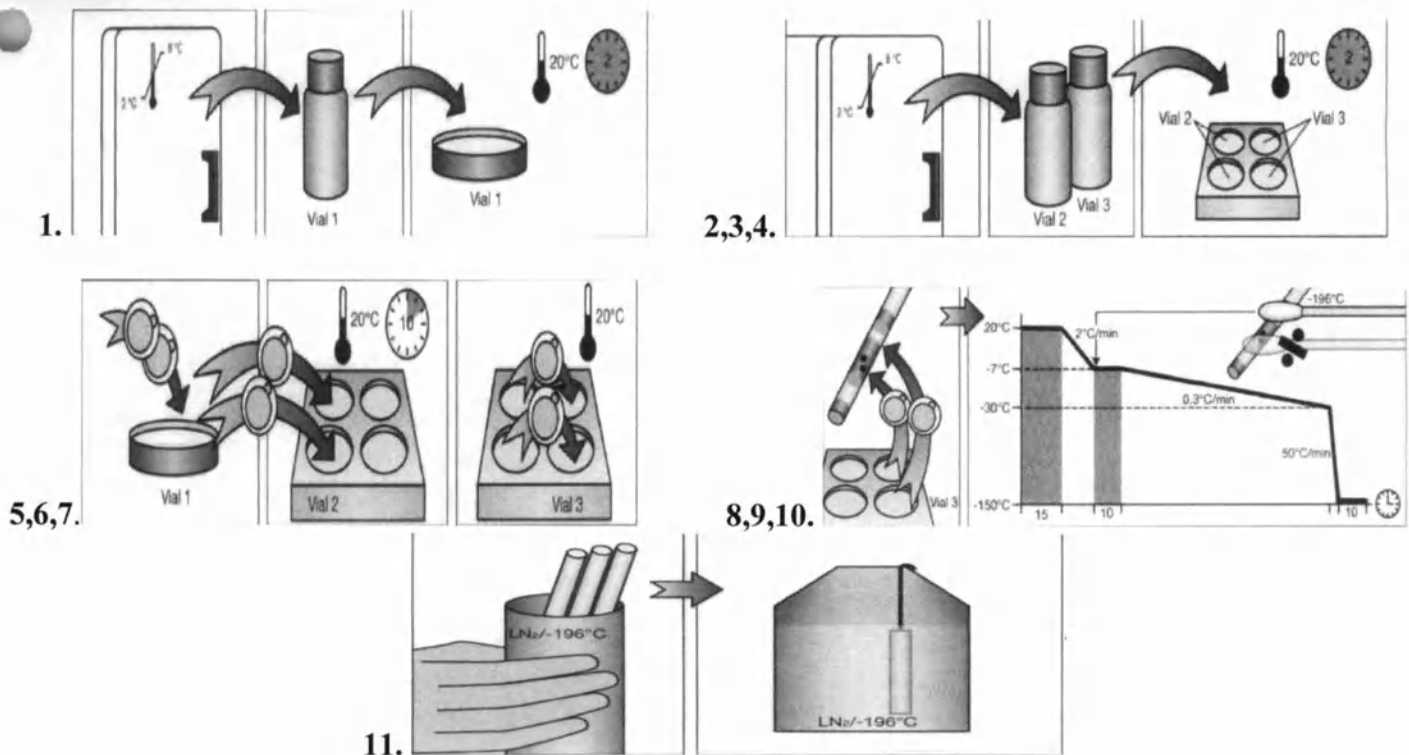
III. Реактивы для замораживания и размораживания:

Полностью готовая к использованию система для криоконсервации ооцитов.

Инсеминация криоконсервированных и размороженных человеческих ооцитов с последующим оплодотворением и переносом эмбрионов, получившихся из данных замороженных/размороженных ооцитов показали результативные беременности и рождение здоровых детей.

1. Набор для замораживания ооцитов 5 x 10 мл, (каталожный номер 10485010)

Протокол Набор для замораживания ооцитов (Oocyte Freeze)

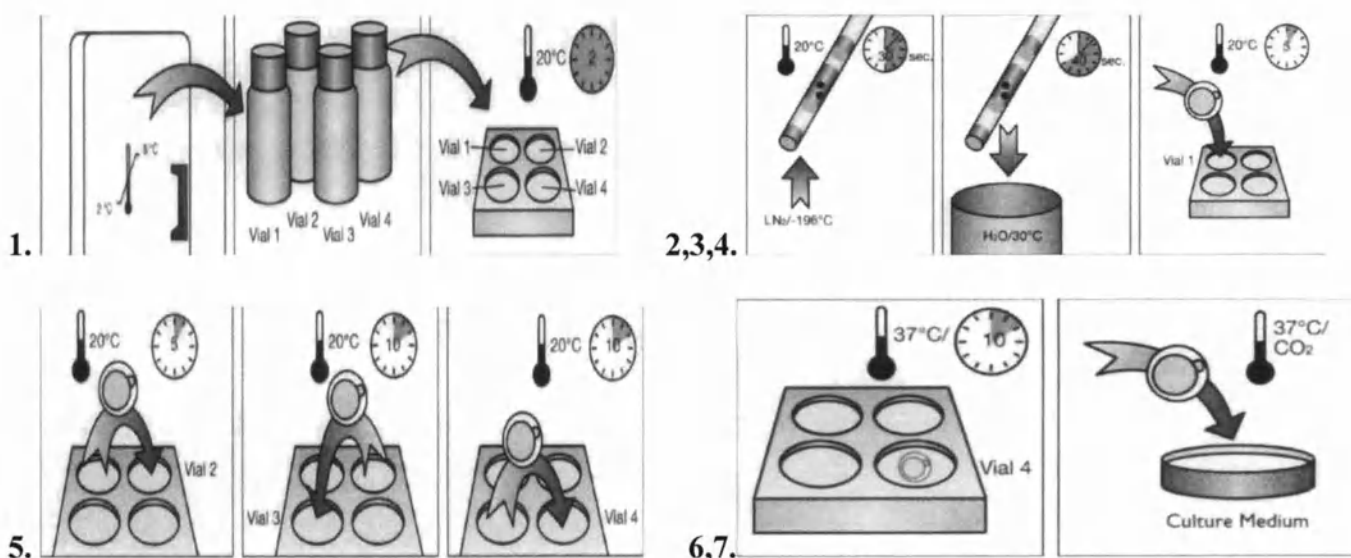


1. Оставить при комнатной температуре не менее чем на 2 часа.
2. Промыть ооциты 3мл среды из виалы 1 при комнатной температуре.
3. Перенести ооциты в 0,5 мл среды из виалы 2 на 10 минут при комнатной температуре.
4. перенести ооциты в 0,5 мл среды из виалы 3 и бастро загрузить в соломинки. Используя данную среду в качестве среды для переноса.
5. перенести соломинки в прибор для замораживания с контролируемой скоростью замораживания. Оставьте соломинки для уравнивания на 15 минут при комнатной температуре (20°C), прежде чем запустить программу замораживания.
6. Охладите до температуры -7°C со скоростью 2°C/минуту.
7. Затем проведите вручную сидинг при -7°C. Когда раствор становится белым. Это означает, что процесс сидинга начался.
8. Выдержите при температуре -7°C 10 минут.
9. Охлаждайте с -7°C до -30°C со скоростью 0,3°C/минуту.
10. Охлаждайте с -30°C до -150°C со скоростью 50°C/минуту.

11. Через 10-12 минут после того, как температура стабилизируется, перенесите соломинки в жидкий азот и храните при температуре -196°C .

2. Набор для размораживания ооцитов 4 x 10 мл (каталожный номер 10494010) – предназначен для проведения процедуры размораживания ооцитов человека, замороженных с использованием набора для замораживания ооцитов.

Протокол
Набор для размораживания ооцитов
(Oocyte Thaw)



1. Предварительно оставить Набор для размораживания ооцитов (Oocyte Thaw) для согревания как минимум на 2 часа при комнатной температуре.

2. Извлечь соломинки из жидкого азота и выдержать при комнатной температуре 30 секунд. Затем поместить соломинки на водяную баню (30°C) на 40 секунд до полного исчезновения следов льда.

3. Вскройте соломинки или криопробирки согласно принятой процедуре и перенесите содержимое в чашку Петри.

4. Поместите ооцит в среду из виалы 1 при комнатной температуре на 5 минут.

5. Перенесите ооциты в среду из виалы 2 при комнатной температуре на 5 минут и затем в среду из виалы 3 при комнатной температуре на 10 минут.

6. Перенесите ооциты в среду из виалы 4 на 10 минут при комнатной температуре и далее выдержите еще 10 минут при 37°C .

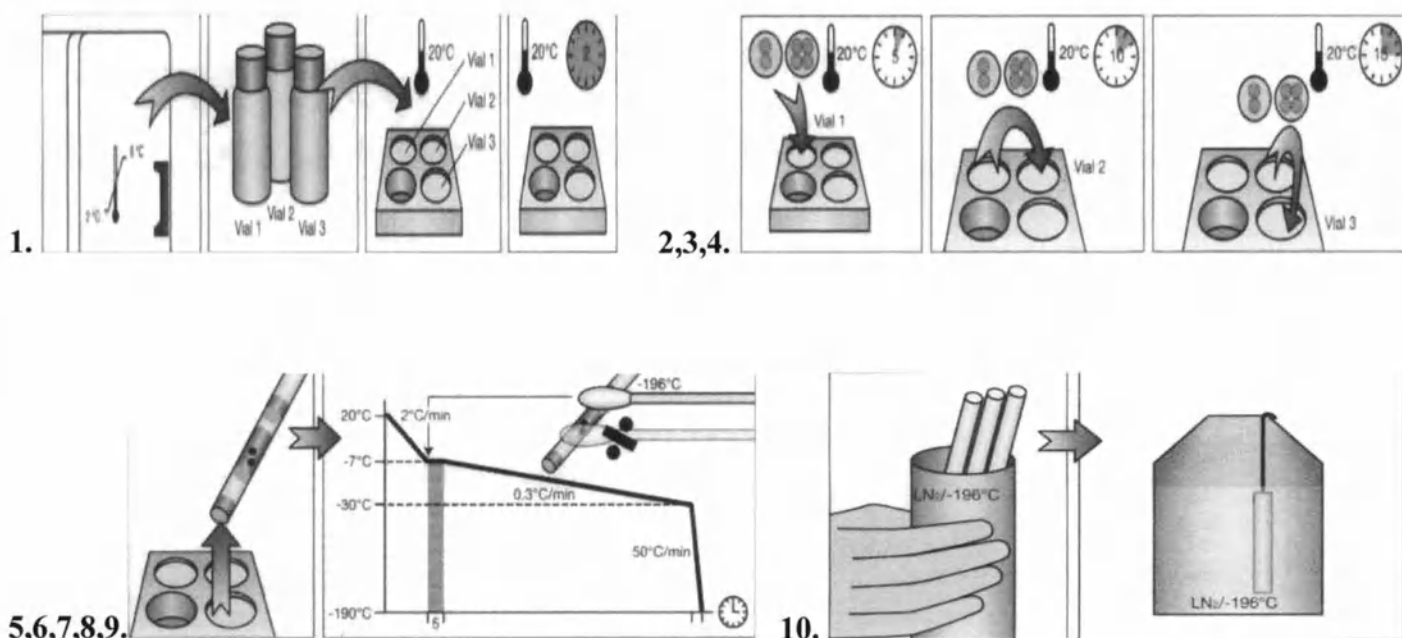
7. Поместить ооциты в среду культивирования в условия 5-6% CO_2 и 37°C как минимум на 3 часа до момента оплодотворения.

3. Набор для замораживания эмбрионов 4 x 10 мл (каталожный номер 10264010)

Протокол

Набор для замораживания эмбрионов

(Embryo Freezing Pack)



1. Оставить виалы как минимум на 2 часа при комнатной температуре.

2. Зиготы и эмбрионы на стадии 2-4-клеточного развития поместить в среду из виалы 1 на 5 минут при комнатной температуре.

3. Перенести зиготы и эмбрионы в среду из виалы 2, выдержать 10 минут при комнатной температуре.

Непосредственно перед тем, как клетки будут перенесены в среду из виалы 3 соломинки изнутри следует промыть тем же раствором, но из другой чашки.

4. Перенесите зиготы и эмбрионы в среду из виалы 3 на 15 минут при комнатной температуре.

5. Среда из виалы 3 используется для загрузки зигот и эмбрионов в соломинки. Замораживание выполняется согласно процедуре засораживания, описанной ниже.

6. Начните охлаждение с комнатной температуры до -7°C со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{минуту}$.

7. Выдержите 5 минут. Запустите процесс сидинга вручную. Не проводите сидинг соломинки близко к зиготе/эмбриону, не трясите ее.

Когда раствор становится белым, это означает, что процесс сидинга начался.

8. Охладите с -7°C до -30°C со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/\text{минуту}$.

9. Охладите с -30°C до -190°C со скоростью $50^{\circ}\text{C}/\text{минуту}$.

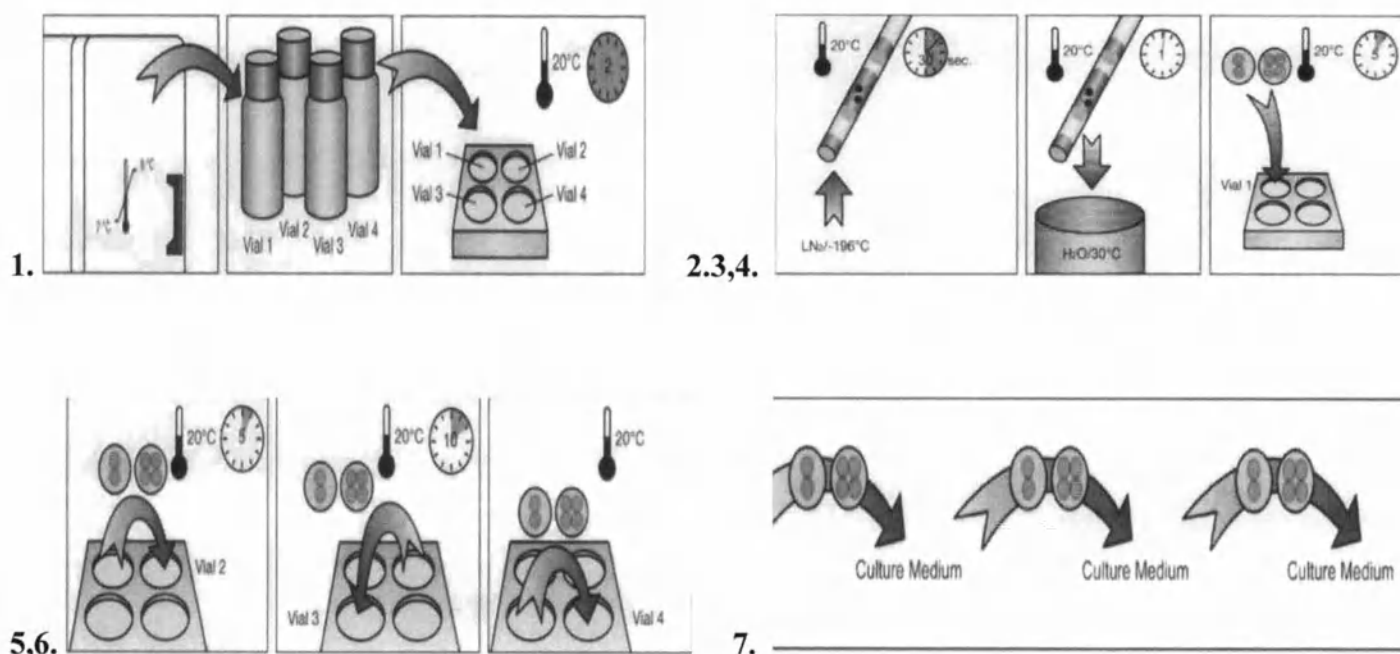
10. Перенесите соломинки в жидкий азот и храните при -196°C .

4. Набор для размораживания эмбрионов 4 x 10 мл (каталожный номер 10984010)

Протокол

Набор для размораживания эмбрионов

(Embryo Thawing Pack)



1. Предварительно оставить Набор для размораживания эмбрионов (Embryo Thawing Pack) для согревания как минимум на 2 часа при комнатной температуре.

2. Извлечь соломинки из жидкого азота и выдержать при комнатной температуре 30 секунд. Затем поместить соломинки на водяную баню (30°C) на 60 секунд до полного исчезновения следов льда.

3. вскрыть соломинки или криопробирки согласно принятой процедуре и перенести содержимое в чашки Петри.

4. Поместить зиготы или эмбрионы в среду из виалы 1 при комнатной температуре на 5 минут.

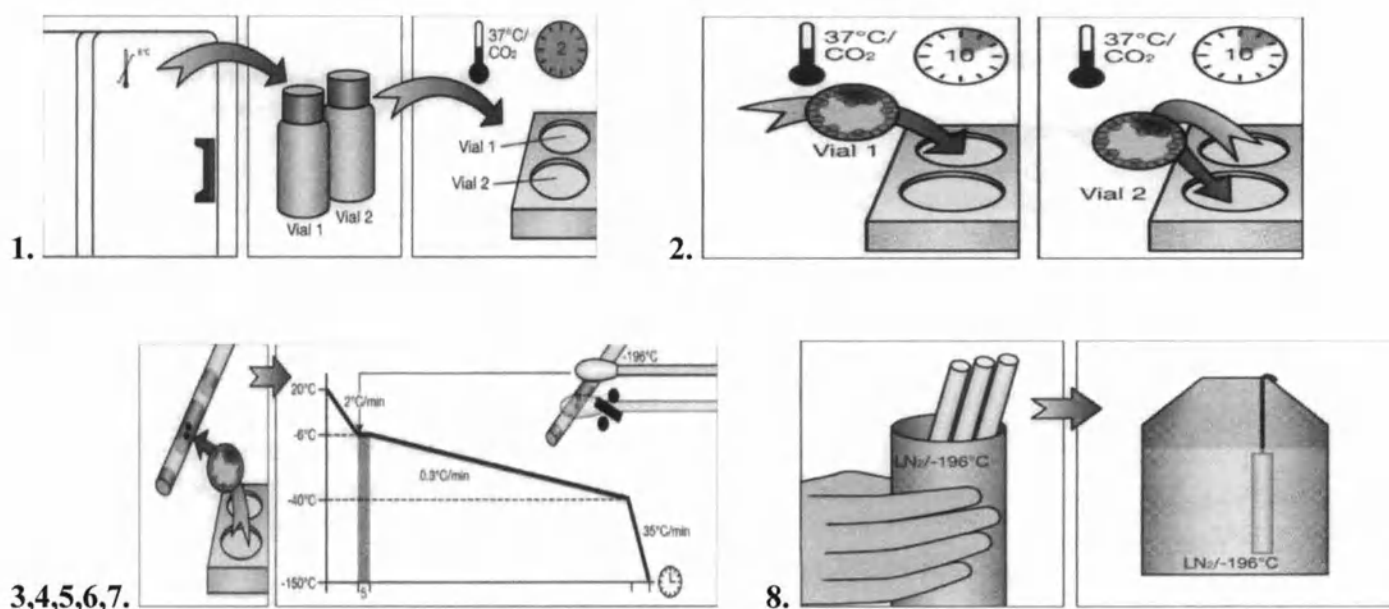
5. Перенести зиготы или эмбрионы в среду из виалы 2 при комнатной температуре на 5 минут и затем в среду из виалы 3 при комнатной температуре на 10 минут.

6. Перенести зиготы или эмбрионы в среду из виалы 4 при комнатной температуре (короткий промывочный этап).

7. Достать зиготы или эмбрионы из среды 4 и промыть в соответствующей среде культивирования. В соответствии со стадией, на которой клетки замораживались. Поместить зиготы или эмбрионы для культивирования, используя ту же самую среду.

5. Набор для замораживания бластоцист (2 x 10 мл, каталожный номер 10532010) – предназначен для проведения процедуры замораживания человеческих бластоцист.

**Протокол
Набор для замораживания бластоцист
(Blast Freeze)**

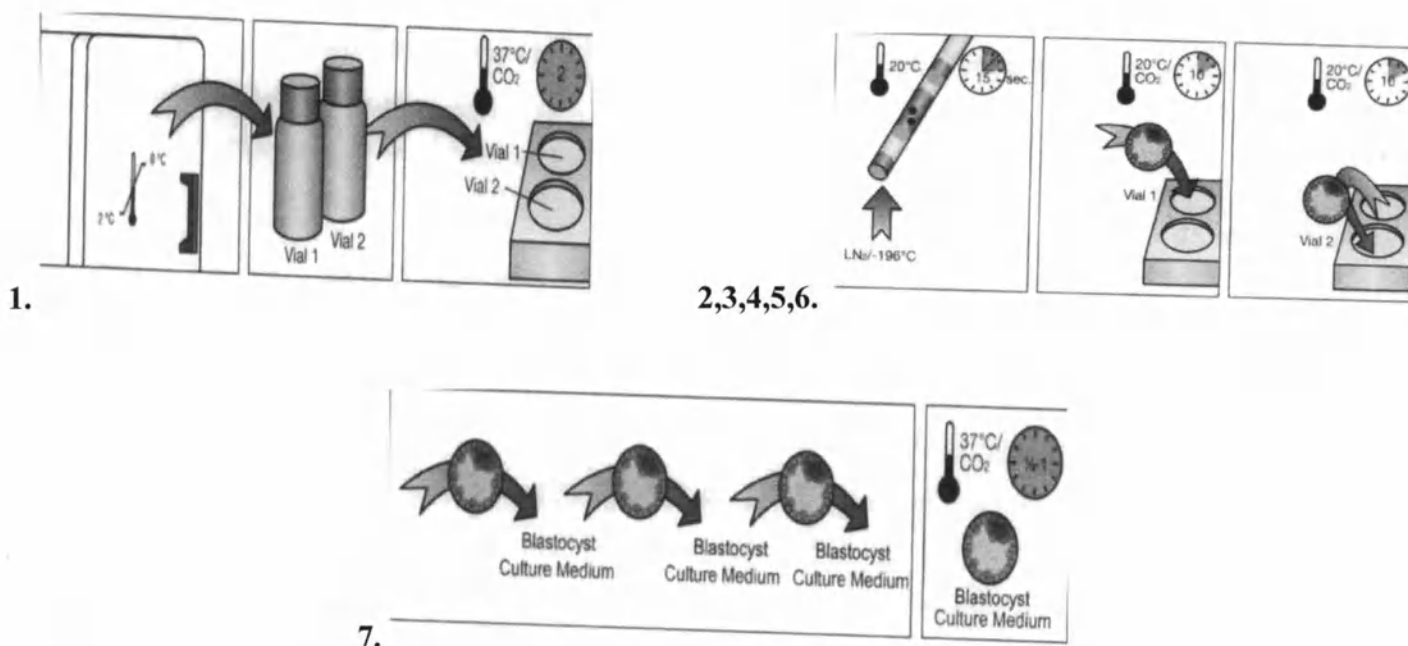


1. Уравновесьте в течение 2 часов при 5-6% CO₂ и температуре 37°C.
2. Поместите эмбрионы в среду из вials 1, оставьте в инкубаторе (5-6% CO₂ и 37°C) на 10 минут, затем перенесите их в среду из вials 2 и также выдержите 10 минут в инкубаторе.
Пока идет инкубация в среде вials 2, промойте соломинки той же средой из другой чашки.
3. Перенесите эмбрионы в соломинки (максимум по два на соломинку) и начинайте замораживание по ниже описанному протоколу.
4. Охладите до температуры -6°C со скоростью 2°C/минуту.
5. Иницируйте сидинг вручную при температуре -6°C. Не проводите сидинг соломинки рядом с бластоцистой, не трясите ее. Когда раствор становится белым, это означает, что процесс сидинга начался.
6. Продолжайте охлаждать с -6°C до -40°C со скоростью 0,3°C/минуту.
7. Охлаждайте с -40°C до -150°C со скоростью 35°C/минуту.

8. Перенесите соломинки в жидкий азот и храните при температуре -196°C .

6. Набор для размораживания бластоцист 2 x 10 мл (каталожный номер 10542010) – предназначен для размораживания человеческих бластоцист, замороженных с применением набора для замораживания.

**Протокол
Набор для размораживания бластоцист
(Blast Thaw)**



1. Поместите среду для уравнивания в инкубатор на 2 часа (5-6% CO_2 и температуре 37°C).

2. Нагрейте соломинки при комнатной температуре, оставив их на столе на 10-15 секунд.

3. Откройте соломинки или криопробирки согласно процедуре, предлагаемой производителем, и перенесите содержимое на чашку Петри.

4. Поместите бластоциты в среду из виалы 2 на 10 минут при комнатной температуре, держите их в темноте.

5. Перенесите бластоциты в среду из виалы 2 на 10 минут при комнатной температуре, держите их в темноте.

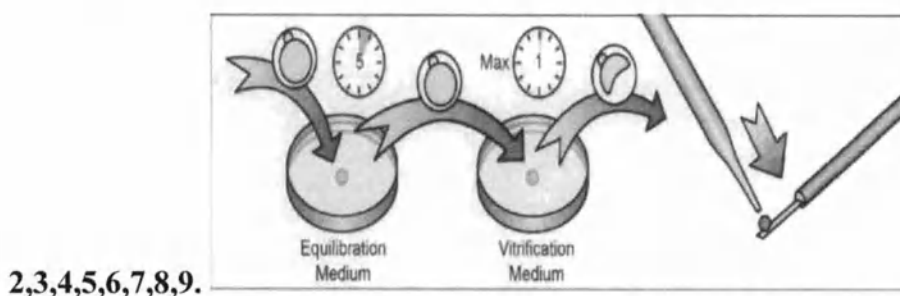
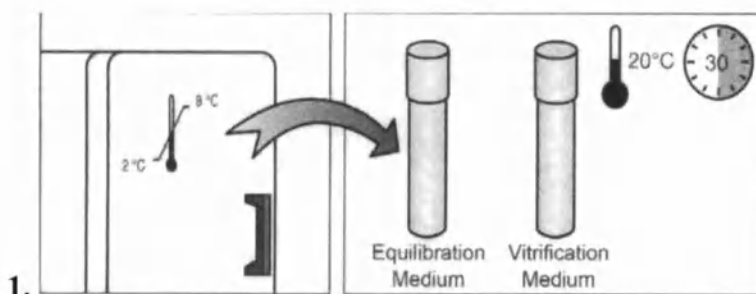
6. После размораживания, поместите бластоцисты в уравновешенную среду для культивирования, промойте эмбрионы этой средой с помощью пипетки 5 раз, чтобы обеспечить тщательное промывание (процедуру следует проводить в течении нескольких секунд).

7. Перенесите в свежую, предварительно уравновешенную среду для культивирования, дайте время бластоцистам восстановиться минимум в течении 30 минут в условиях инкубатора (5-6% CO₂) перед переносом.

7. Набор для витрификации 2 x 1 мл (каталожный номер 12182001).

8. Набор для витрификации замораживание 4 x 1 мл (каталожный номер 12184001).

Протокол
Набор для витрификации
(Vitrification Kit)
Набор для витрификации замораживание
(Virification cooling)



1. Уравновесьте Equilibration Medium и Vitrification Medium при комнатной температуре в течение 30 минут.

2. С помощью соответствующей пипетки, перенесите 2-3 ооцита/эмбриона в 1 мл Equilibration Medium и оставьте на 5 минут (ооциты/эмбрионы поначалу сожмутся, а затем вернуться к их обычным очертаниям).

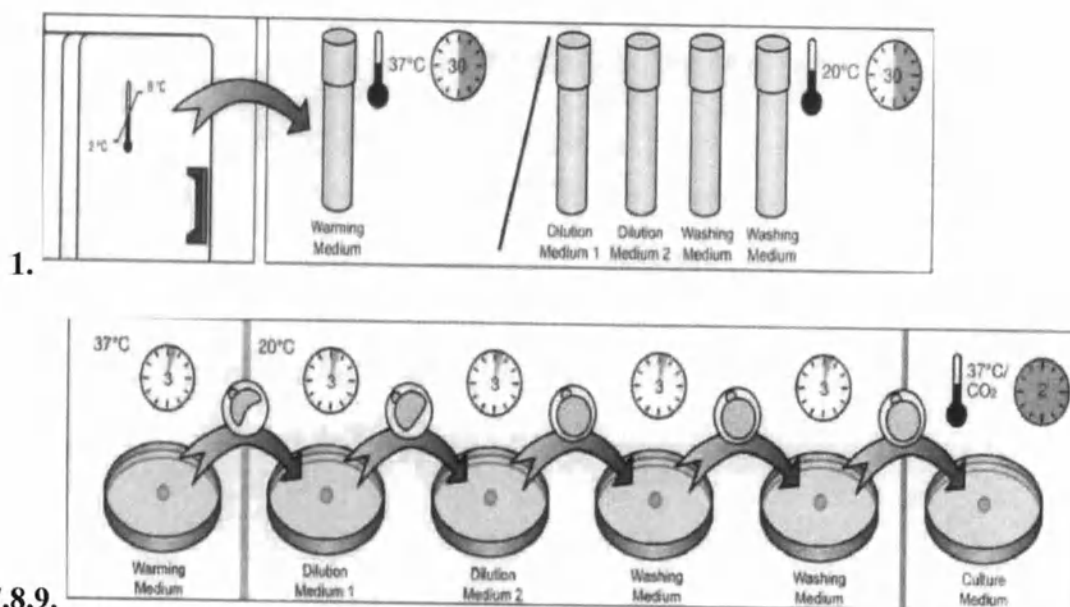
3. Перенесите ооциты/эмбрионы в 1 мл Vitrification Medium, где они должны находиться не менее чем 1 минуту (ооциты/эмбрионы опять сжимаются).

4. Быстро загрузите ооциты/эмбрионы в устройство для переноса согласно Инструкции для его использования.

5. Витрифицируйте согласно Инструкции для использования.

Набор для витрификации размораживание 5 x 2 мл (каталожный номер 12195002)

**Протокол
Набор для витрификации размораживание
(Vitrification Warming)**



1. Уравновесьте Warming Medium при 37°C и другие среды при комнатной температуре в течение как минимум 30 минут.
2. Достаньте из контейнера устройство, используемое для проведения витрификации и хранения клеток.
3. Откройте его согласно Инструкции.
4. Быстро перенесите ооциты/эмбрионы в 2 мл среды Warming Medium при 37°C, где они должны находиться минимум 3 минуты (к этому моменту клетки все еще сморщенные).
5. Используя соответствующую пипетку, перенесите ооциты/эмбрионы в 2 мл Dilution Medium1 при комнатной температуре на 3 минуты (к данному моменту клетки продолжают восстанавливать свои очертания).
6. Перенесите ооциты/эмбрионы в 2 мл среды Delution Medium2 при комнатной температуре. Промойте их в течение 3 минут (к данному моменту клетки продолжают восстанавливать свои очертания).
7. Перенесите ооциты/эмбрионы в 2 мл среды Warming Medium при комнатной температуре. Промойте их в течение 3 минут (к этому моменту клетки полностью приобретают свой первоначальный вид).

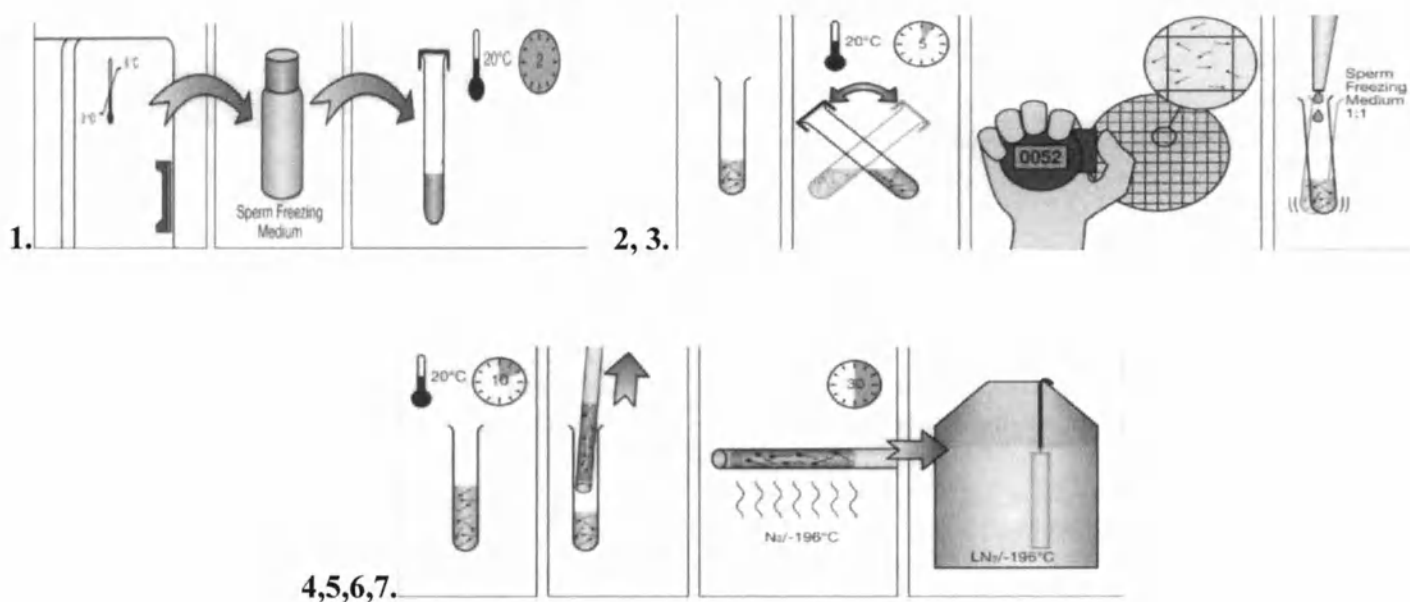
8.* Перенесите ооциты/эмбрионы в 2 мл среды Warming Medium при комнатной температуре на 3 минуты.

9. Перенесите ооциты/эмбрионы в пре-уравновешенную среду для культивирования. Оставьте в инкубаторе на 2 часа до следующего этапа.

10. Среда для замораживания спермы 10 мл (каталожный номер 10670010)

11. Криосперм 10 мл (каталожный номер 11010010)

Протокол
Среда для замораживания спермы
(Sperm Freezing Medium)
КриоСперм (CryoSperm)



Замораживание:

1. Предварительно выдержите Среду для замораживания спермы (Sperm Freezing Medium) как минимум в течение 2-х часов при комнатной температуре.

2. После разжижения измерьте объем эякулята и выполните все необходимые анализы.

3. Убедитесь, что и образец спермы и Среда для замораживания спермы имеют комнатную температуру прежде, чем производить смешивание в соотношении 1:1. Среда должна добавляться по каплям в образец спермы, которая осторожно перемешивается после каждого добавления.

4. Смесь оставляется при комнатной температуре как минимум на 10 минут.

5. Поместите разбавленную сперму в соломинку или криопробирку и запечатайте согласно процедуре. Очень важно при запечатывании оставлять немного свободного пространства в нижней части соломинки, чтобы не ограничивать некоторого расширения жидкости во время замораживания.

6. Разместите соломинки на 30 минут горизонтально над поверхностью жидкого азота. Криопробирки должны быть прикреплены к держателю и затем размещены над поверхностью жидкого азота на такой же период времени.

7. В конечном итоге переместите соломинки или криопробирки в жидкий азот и храните при -196°C .

Размораживание:

1. Выдержите соломинки при комнатной температуре в течение 5 минут.

2. Вскройте соломинки или криопробирки согласно процедуре производителя и извлеките сперму.

Образец должен быть немедленно обработан методом центрифугирования или методом "swim up".

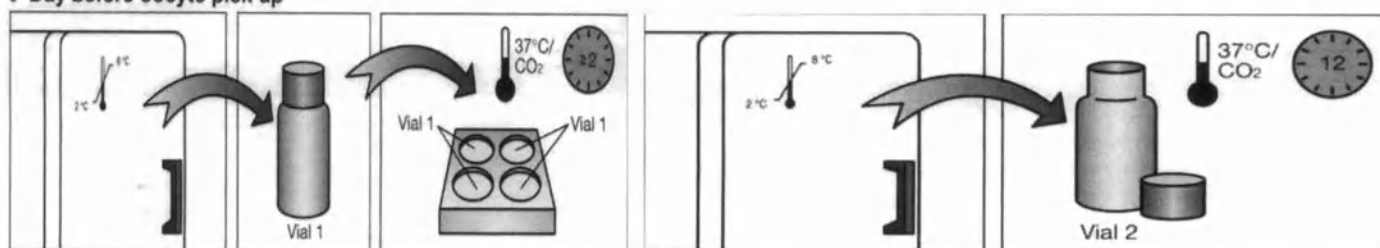
IV. Среда для культивирования и переноса.

1. Система IVM с феноловым красным, 4 x 10 мл (каталожный номер 82214010).

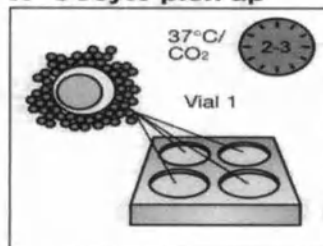
Протокол

Система IVM с феноловым красным, с гентамицином

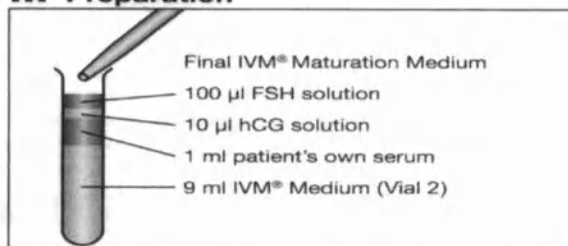
I Day before oocyte pick up



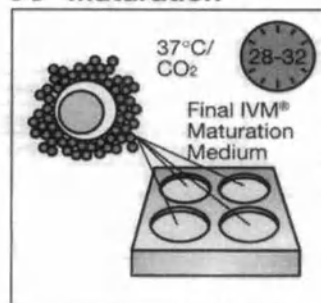
II Oocyte pick up



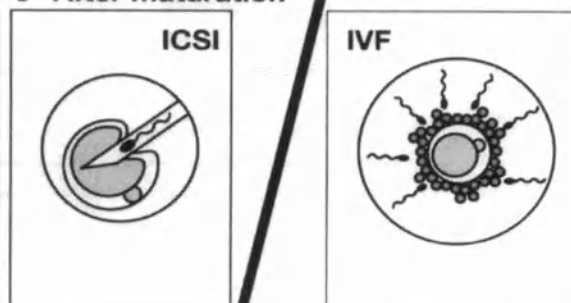
III Preparation



IV Maturation



V After maturation



2. Универсальная среда для ЭКО с феноловым красным, 10 x 10 мл (каталожный номер 10311010).

3. Универсальная среда для ЭКО с феноловым красным, 60 мл (каталожный номер 10310060).

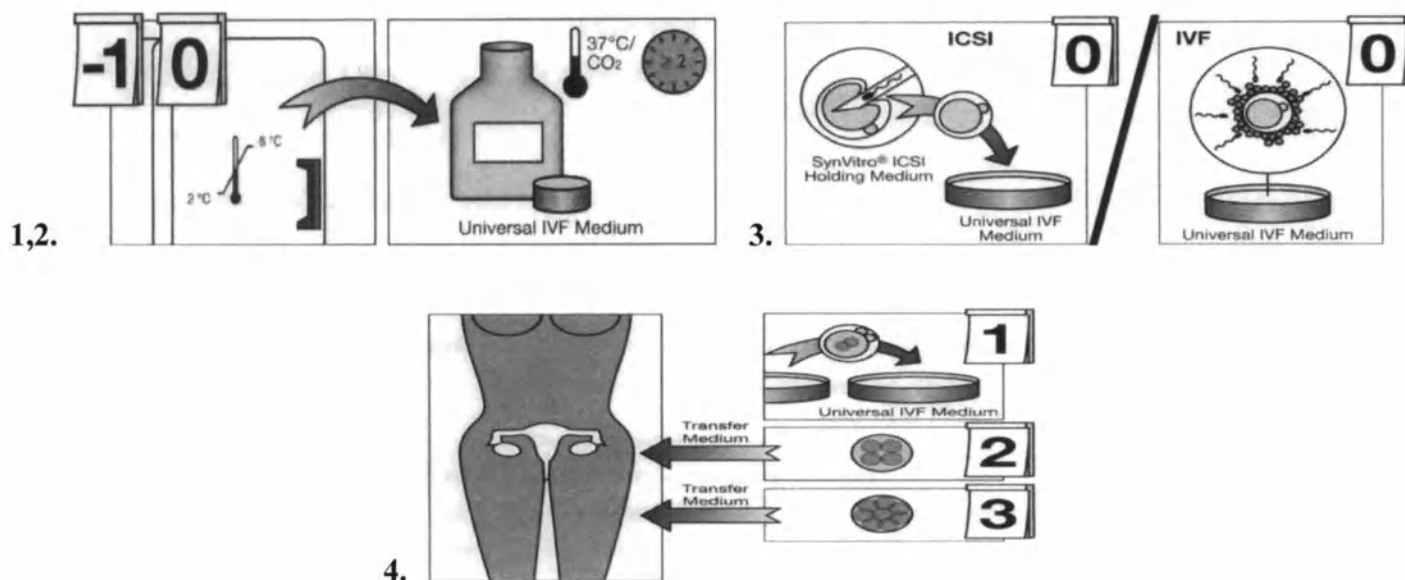
4. Универсальная среда для ЭКО с феноловым красным, 5 x 60 мл (каталожный номер 10315060).

5. Универсальная среда для ЭКО без фенолового красного, 10 x 10 мл (каталожный номер 10301010).

6. Универсальная среда для ЭКО без фенолового красного, 60 мл (каталожный номер 10300060).

7. Универсальная среда для ЭКО без фенолового красного, 5 x 60 мл (каталожный номер 10305060).

Протокол



1. Проведите уравнивание среды в течение как минимум 2-х часов при 5-6% CO₂ и при 37°C перед использованием.

2. Получите ооциты и подготовьте сперму по принятой в лаборатории процедуре.

3. Проведите оплодотворение (День 0) в уравновешенной среде – Универсальной среде для ЭКО (Universal IVF Medium). В тех случаях, когда необходимо ИКСИ, оплодотворение проводят в предварительно подогретой SynVibro ICSI Holding Medium.

4. Через 16-20 час (День 1) проверьте образование pronucleus, затем осторожно промойте и перенесите зиготы в свежие капли (50 мкл) или в 0,5 мл Универсальной среды для ЭКО и покройте жидким парафином.

Эмбрионы следует культивировать по одному или не более чем по 4 на лунку.

Перенос эмбриона на 2 или 3 день

1. Эмбрионы готовят и переносят в матку в 20-30 мкл уравновешенной среды для переноса или в свежей Универсальной среде для ЭКО.

2. Предварительно промойте катетер, выбранной вами средой.

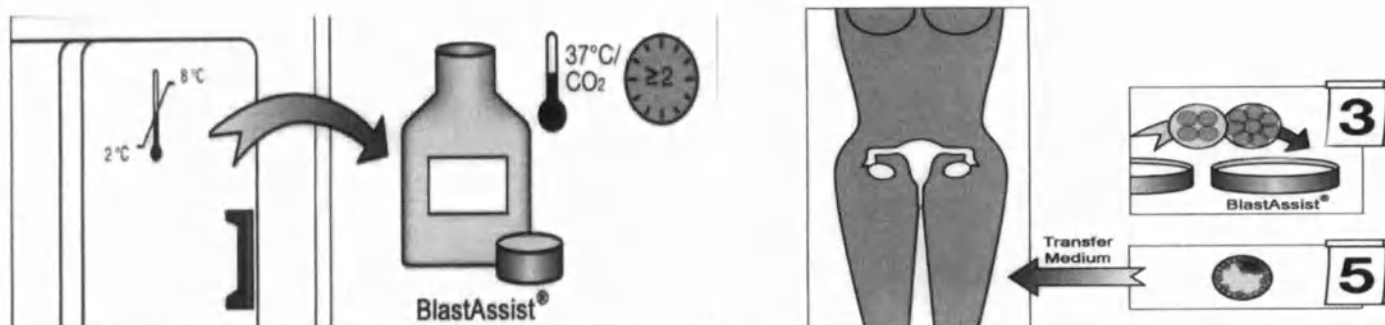
8. БластАссист с феноловым красным, 10 мл (каталожный номер 12160010).

9. БластАссист без фенолового красного, 10 мл (каталожный номер 12150010).

Данные среды предназначены для культивирования эмбрионов с 4 – 8 клеточной стадии до стадии бластоцисты. Они также используются как среды для переноса.

Протокол

БластАссист



1. Уравновесить среду как минимум в течении 2 часов перед использованием в 5-6% CO₂ и температуре 37°C.
2. На 4-8 клеточной стадии эмбрионы тщательно промывают уравновешенной средой БластАссист (BlastAssist) и переносят в свежие 50 мкл капли или в 0,5 мл среды БластАссист (BlastAssist).

Эмбрионы лучше культивировать по одному, в крайнем случае не более 4 на лунку.

3. Эмбрионы следует переносить в свежие капли БластАссист (BlastAssist) каждый день до образования бластоцист на 5-6 день.

Перенос бластоцист

1. Бластоцисты подготавливаются и переносятся в матку в 20-30 мкл пре-уравновешенной среды для переноса.
2. Перед использованием промойте катетер средой для переноса.

10. Среда ISM1 с феноловым/красным, 10 мл (каталожный номер 10500010).

11. Среда ISM1 с феноловым/красным, 60 мл (каталожный номер 10500060).

Это среда для оплодотворения и культивирования эмбрионов до 4-8 клеточной стадии. Оплодотворение в ISM1 должно быть выполнено в интервал времени менее чем 4 часа.

12. Среда ISM2 с феноловым/красным, 10 мл (каталожный номер 10510010).

13. Среда ISM2 с феноловым/красным, 60 мл (каталожный номер 10510060).

14. Среда UTM с феноловым/красным, 10 мл (каталожный номер 10520010) – среда используется для переноса эмбрионов на стадии дробления и бластоцист.

15. Среда ISM1 без фенолового/красного, 10 мл (каталожный номер 11500010).

16. Среда ISM1 без фенолового/красного, 60 мл (каталожный номер 11500060).

Это среда для оплодотворения и культивирования эмбрионов до 4-8 клеточной стадии. Оплодотворение в ISM1 должно быть выполнено в интервал времени менее чем 4 часа.

17. Среда ISM2 без фенолового/красного, 10 мл (каталожный номер 11510010).

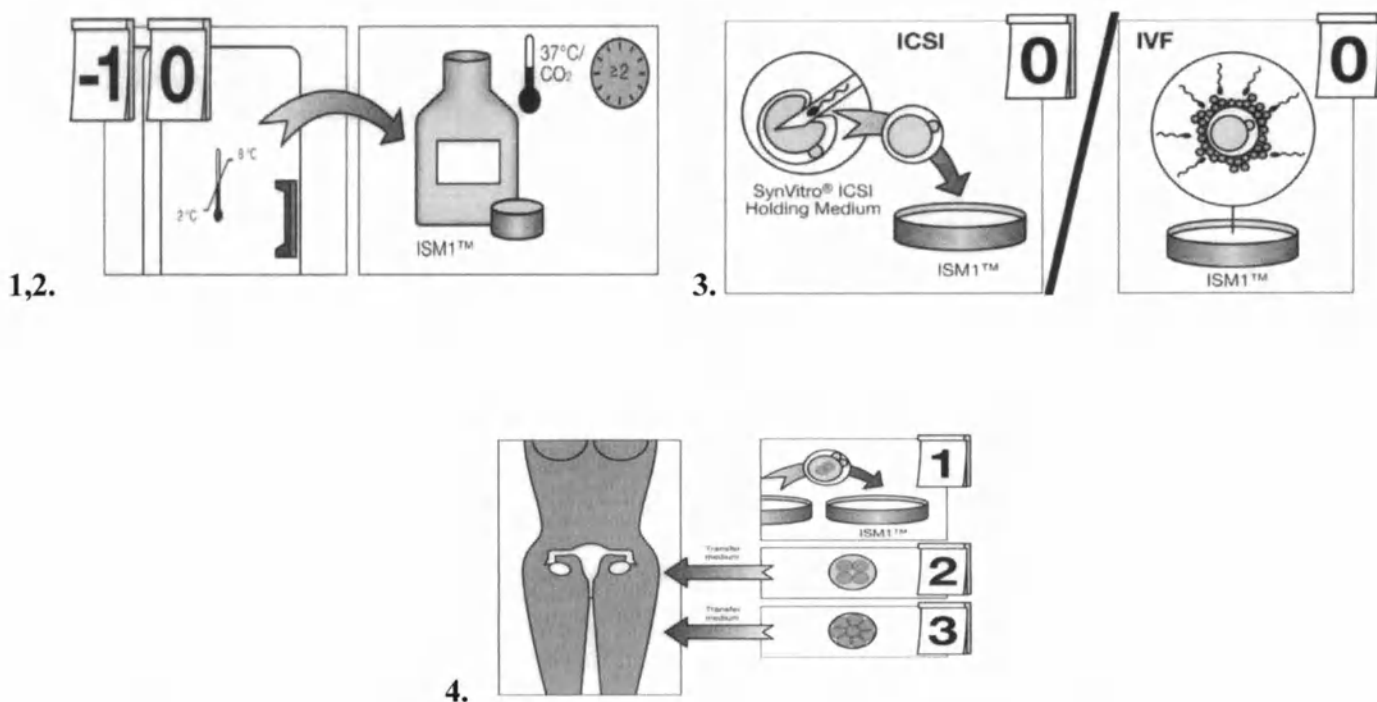
18. Среда ISM2 без фенолового/красного, 60 мл (каталожный номер 11510060).

Среда ISM2 используется для культивирования эмбрионов со стадии 4-8 клеток до бластоцисты.

19. Среда UTM без фенолового/красного, 10 мл (каталожный номер 11520010) – среда используется для переноса эмбрионов на стадии дробления и бластоцист.

Протокол

ISM1



1. Уравновесить среду как минимум в течение 2 часов при 5-6% CO₂ при температуре 37°C.

2. Подготовить ооциты и сперму согласно процедурам принятым в лаборатории.

3. Провести оплодотворение (День 0) в предварительно уравновешенной среде ISM1 или Универсальной среде для ЭКО (Universal IVF Medium). При необходимости ИКСИ, процедуру следует проводить в подогретой среде SynVibro ICSI Holding Medium.

а) Если в качестве среды для инсеминации применяется Универсальная среда для ЭКО (Universal IVF Medium), то рекомендуется раннее промывание в ISM1 для того, чтобы получить эмбрионы с лучшей морфологией. После промывки ооциты осторожно переместите в предварительно подготовленную ISM1 (50 мкл или 0,5 мл капли/лунки), покрытую жидким парафином.

б) Если необходимо проведение ИКСИ, то ооциты переносятся в уравновешенную среду ISM1 сразу же после инъекции сперматозоида (в микрокапли объемом 50 мкл или в 0,5 мл ISM1 и покрывают жидким парафином).

Эмбрионы лучше культивировать по одному в крайнем случае не более 4 на лунку.

4. Через 16-20 часов, проконтролируйте образование пронуклеуса, затем аккуратно и тщательно промойте и перенесите зиготы в свежие микрокапли объемом 50 мкл или в лунки с 0,5 мл ISM1, покрытые жидким парафином.

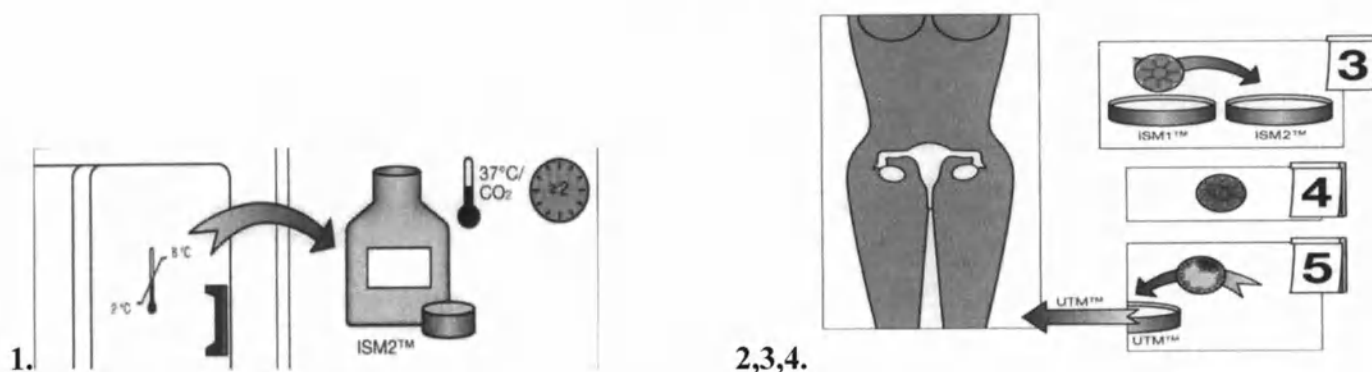
Перенос эмбриона на День 2 и День 3.

1. Эмбрионы подготавливаются и переносятся в матку в 20-30 мкл пре-уравновешенной среде для переноса.

2. Промойте катетер перед использованием средой для переноса.

Протокол

ISM2 и UTM



1. Уравновесить среду как минимум в течение 2 часов при 5-6% CO₂ при температуре 37°C.

2. Провести оплодотворение в предварительно уравновешенной Универсальной среде для ЭКО (Universal IVF Medium) или ISM1 и культивировать до 3-го дня в ISM1.

3. На третий день эмбрионы тщательно промойте в уравновешенной среде ISM2 и перенесите в свежие микрокапли объемом 50 мкл или в лунки с 0,5 мл той же среды.

Эмбрионы лучше культивировать по одному в крайнем случае не более 4 на лунку до образования бластоцист (до 5 дня).

4. На 5 день эмбрионы, достигшие стадии бластоцисты, помещают в уравновешенную среду UTM в ожидании дальнейшего переноса.

Перенос бластоцист

1. Бластоцисты подготавливаются и переносятся в матку в 20-30 мкл предварительно уравновешенной среде для переноса.

2. Промойте катетер перед использованием средой для переноса.

20. Эмбрио Ассист с феноловым/красным, 10 мл (каталожный номер 12140010)

21. Эмбрио Ассист с феноловым/красным, 60 мл (каталожный номер 12140060)

22. Эмбрио Ассист с феноловым/красным, 10 x 10 мл (каталожный номер 12141010)

23. Эмбрио Ассист с феноловым/красным, 5 x 60 мл (каталожный номер 12145060)

24. Эмбрио Ассист без фенолового/красного, 10 мл (каталожный номер 12130010)

25. Эмбрио Ассист без фенолового/красного, 60 мл (каталожный номер 12130060)

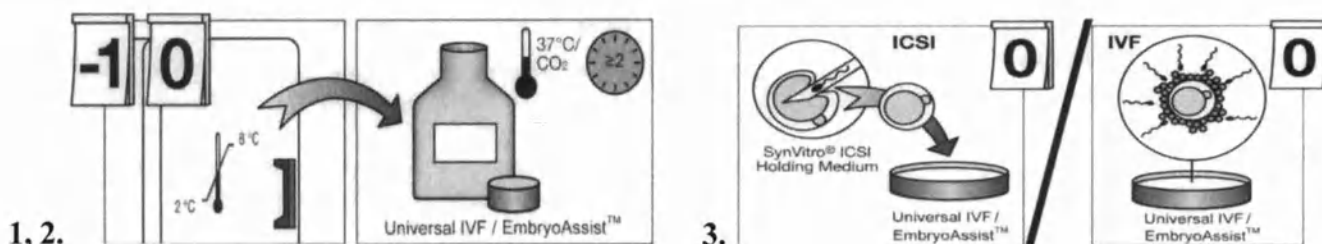
26. Эмбрио Ассист без фенолового/красного, 10 x 10 мл (каталожный номер 12131010)

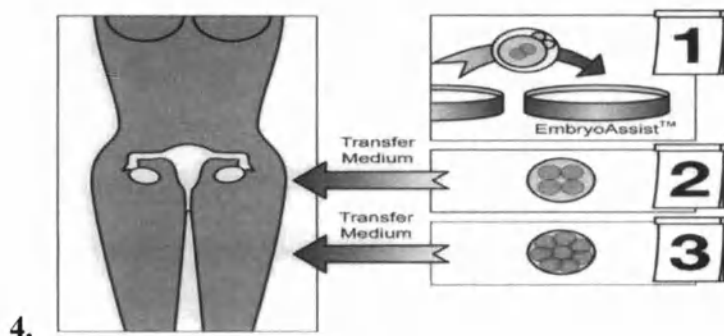
27. Эмбрио Ассист без фенолового/красного, 5 x 60 мл (каталожный номер 12135060)

Эмбрио Ассист – готовая к использованию среда для культивирования эмбрионов до 4 – 8 клеточной стадии (день второй или третий после оплодотворения). Данная среда может также использоваться для оплодотворения ооцитов и для переноса эмбрионов.

Протокол

ЭмбриоАссист





4.

1. Уравновесьте среду в течение как минимум 2 часов перед применением при 5-6% СЦ2 и при температуре 37°C.

2. Получите ооциты и подготовьте сперму по принятой в лаборатории процедуре.

3. Проведите оплодотворение (День 0) в уравновешенной среде ЭмбриоАссист (EmbryoAssist) или Универсальной среде для ЭКО (Universal IVF Medium). В тех случаях, если необходимо ИКСИ, оплодотворение проводят в предварительно подогретой Syn Vitro ICSI Holding Medium. Сразу же после инъекции сперматозоида ооциты переносят в микрокапли (50 мкл) или в 0,5 мл уравновешенной среды ЭмбриоАссист (EmbryoAssist) и покрывают жидким парафином.

Эмбрионы следует культивировать по одному или не более чем по 4 на лунку.

4. Через 16-20 час., проверьте образование пронуклеуса, затем осторожно промойте и перенесите зиготы в свежие 50 мкл капли или в 0,5 мл Универсальной среды для ЭКО (Universal IVF Medium) покрытые жидким парафином.

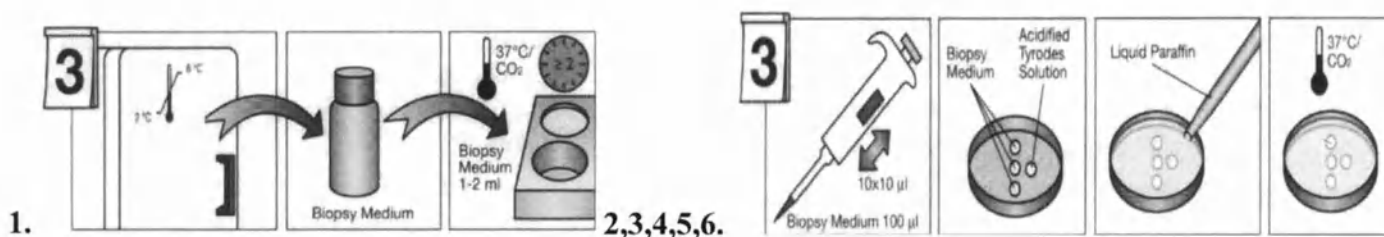
Перенос эмбриона на День 2 или День 3.

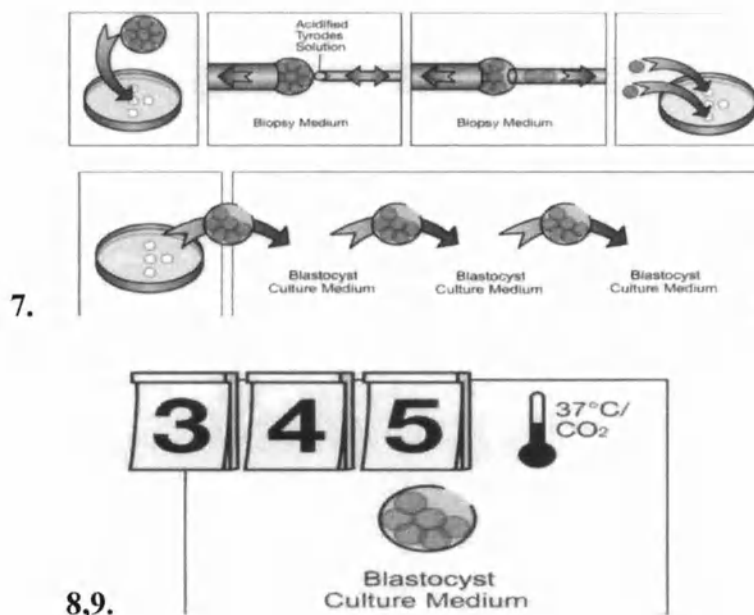
1. Эмбрионы переносят в матку в 20-30 мкл уравновешенной среде для переноса или в свежей ЭмбриоАссист (EmbryoAssist).
2. Предварительно промойте катетер выбранной вами средой для переноса перед использованием.

28. Среда для биопсии 10 мл (каталожный номер 10620010) – предназначена для биопсии бластомеров на стадии деления эмбриона для проведения ПГД (предимплантационной генетической диагностики).

Протокол

Среда для биопсии (Biopsy Medium)





Биопсия эмбриона на стадии деления проводится на третий день после оплодотворения.

1. Поместите 1-2 мл Среды для биопсии (Biopsy Medium) на чашку для культивирования. Покройте подготовленным жидким парафином и подогрейте до температуры 37°C, поместив в инкубатор (5-6% CO₂) как минимум на часа.

2. За 30 минут до биопсии, подготовьте индивидуальные чашки для биопсии для каждого эмбриона. Промойте кончик пипетки 10 раз по 10 мкл среды для биопсии.

3. Нанесите 3 капли Среды для биопсии и одну каплю Кислого раствора Тироде так, как это показано на иллюстрации. Незамедлительно покройте чашку приготовленным жидким парафином (4 мл) для избежания испарения и подогрейте приготовленные чашки до температуры 37°C в 5-6% CO₂.

4. Возьмите чашку Петри с предварительно уравновешенной Средой для биопсии и перенесите эмбрион в центральную каплю.

5. Выполните дреллинг зоны пеллюцида.

При использовании Кислого раствора Тироде для химического разрушения зоны пиллюции, просим обратиться к специальному протоколу, рекомендованному для использования данного продукта.

6. Как только в зоне проделано небольшое отверстие, бластомеры становятся доступными для забора простым пипетированием. Для забора достаточно взять один или два наименьших бластомера, которые и переносятся в соответствующие капли Среды для биопсии.

7. Непосредственно после проведения биопсии тщательно промойте эмбрион(ы) путем их переноса между несколькими каплями среды для культивирования.

8. В заключении перенесите эмбрион в новую чашку с предварительно уравновешенной средой для культивирования бластоцист, покрытую жидким парафином.

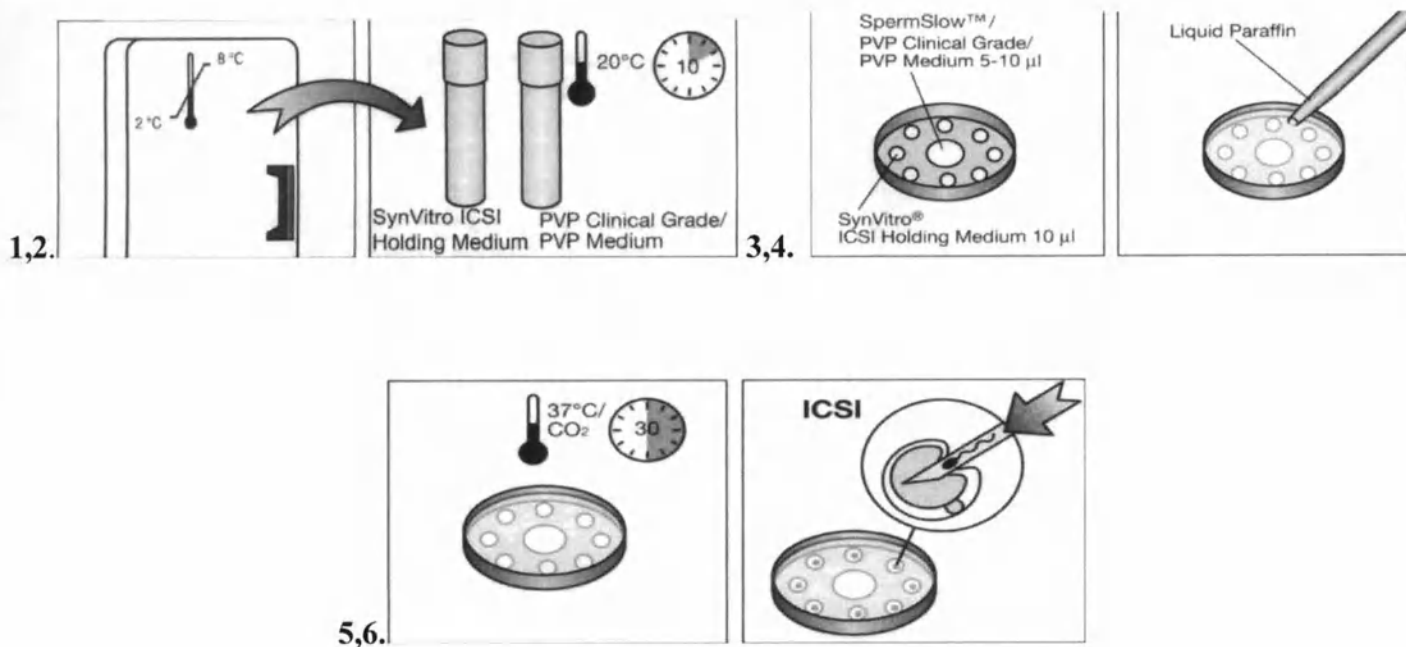
9. Чашка с изолированными бластомерами готова для проведения исследований.

29. Среда СинВитро ИКСИ Холдинг 5 x 1 мл (каталожный номер 15855001) – среда, в которой находятся ооциты во время процедуры ИКСИ.

Протокол

СинВитро ИКСИ Холдинг

(SynVidro ICSI Holding Media)



1. Предварительно подогрейте Среду СинВитро ИКСИ Холдинг (SynVidro ICSI Holding Media) и Среду PVP или PVP клинический градиент при комнатной температуре 10 минут.

2. В зависимости от числа ооцитов, используемых для процедуры ИКСИ, нанесите пипеткой соответствующее число капель по 10 мкл Среды СинВитро ИКСИ Холдинг на дно ИКСИ чашки.

3. В центр той же чашки поместите 5-10 мкл Среды PVP или PVP клинического градиента.

При использовании среды СпермСлоу для отбора сперматозоидов, пожалуйста, обратитесь к протоколу, рекомендованному для применения этого продукта.

4. Покройте чашку подготовленным жидким парафином и поместите ее перед использованием в среду CO₂(инкубатор) при температуре 37°C на 30 минут.

5. Внесите 2 мкл подготовленной отмытой спермы в каплю Среды PVP или PVP клинического градиента.

6. Непосредственно перед инъекцией, ооциты переносят в инъекционную чашку и помещают в индивидуальную каплю Среды СинВитро ИКСИ Холдинг. Процедура ИКСИ проводится внутри этой капли.



Претендувано, претендувано
31 (тридесет и еден) лет