



VITAVITRO

敞开式拉管法 (OPS)

[用户指南]

产品清单

- VitaVitro® 冷冻试剂盒 (HHM、HV1、HV2)
- VitaVitro® 解冻试剂盒 (HHM、HW1、HW2)
- VitaVitro® 玻化冻存管 (OPS 及储存套管)
- 体视显微镜
- 显微镜加热台
- 加热垫 (置于显微镜旁边)
- 1 个 4 孔皿 (4WD)
- 1 个 60 mm 有盖培养皿
- 1 个 35 mm 有盖培养皿
- 10 μ l、100 μ l 和 1000 μ l 自动移液管及相应的无菌吸头
- 镊子/小钳子
- 秒表
- 液氮及液氮盒
- 封口机

第 I 阶段 准备

- 1 所有程序均应在室温 (25 - 27°C) 下进行。
- 2 所有培养皿均应加热至 25 - 27°C。

第 II 阶段 平衡

- 请按照人 MII 期卵母细胞相应步骤进行卵母细胞玻璃化。
- 请按照人受精卵和胚胎相应步骤进行受精卵/胚胎玻璃化。

人 MII 期卵母细胞

注意：卵母细胞应在活体采卵后 2-6 小时之间（最好是 2 小时内），卵母细胞去卵丘后立即进行玻璃化。

- 1 在 60 mm 培养皿盖子中，用移液管相邻地滴入一滴 50 μ l HHM 基础液和一滴 50 μ l HV1 冷冻液（见图 1）。

- 2 将去卵丘的 MII 卵母细胞移入 HHM 基础液滴中，等待数秒后将两滴培养液连通起来。

☞ 第一次液滴连通

⌚ 等待 3 分钟

- 3 用移液管再吸取一滴 50 μ l HV1 冷冻液，在靠近连通液中间正下方处滴入。将卵母细胞移入连通液中间位置。

- 4 将新 HV1 冷冻液滴与原有连通液连通起来。

☞ 第二次液滴连通

⌚ 等待 3 分钟

- 5 在远离以上液滴处滴入 1 滴 100 μ l HV1 冷冻液，将卵母细胞移入新液滴表面上方，让其缓慢下沉，然后等待约 9 分钟。▲ 此过程请勿混合、移动或干扰液滴！小心地将培养皿底倒盖在盖子上。

⌚ 等待 9 分钟

- 6 等待期间，将一根储存套管放入液氮盒冻存架中。

- 7 9 分钟后（到目前为止总平衡时间为 15 分钟），在体视显微镜下检查卵母细胞以确定其是否已完全恢复（即卵周隙与平衡开始前一致）。

- 3 HHM、HV1、HV2 和 HW2 应加热至 25-27°C，HW1 应加热至 37°C。

- 若已完全恢复，则继续进行第 8 步。
- 若尚未完全恢复，则再等待 3-6 分钟直至其完全恢复，然后进行第 8 步。

- 8 用移液管吸取两滴新的 100 μ l HV2 冷冻液，滴入距原有液滴稍远处，且两滴新液滴彼此分开。

a) 将卵母细胞移入其中一滴新液滴中，并用移液管混合约 20 秒。

b) 然后将混合液移入另一滴新液滴中，再次混合 20 秒。

- 9 混合后，吸出 1 μ l 含卵母细胞或胚胎的冷冻液，然后进行装载和冷冻。

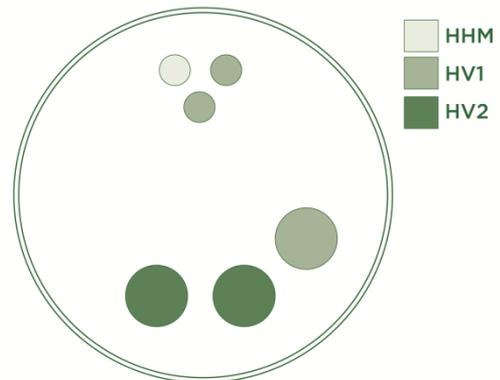


图 1. 卵母细胞玻璃化时 60 mm 培养皿盖内的液滴分布

人受精卵和胚胎

注意：受精卵和胚胎不如卵母细胞敏感，因此无需对 HV1 冷冻液进行梯度平衡。

- 1 用移液管将 50 μ l HHM 基础液滴入 60 mm 培养皿盖内（见图 2），然后将胚胎移入液滴内 2 分钟。

⌚ 等待 2 分钟

- 2 用移液管将 100 μ l HV1 冷冻液滴入 60 mm 培养皿盖内，然后将胚胎移入液滴内。小心地将培养皿底倒盖在盖子上。

- 3 按照人 MII 期卵母细胞平衡第 6-9 步继续操作。

⌚ 12-15 分钟

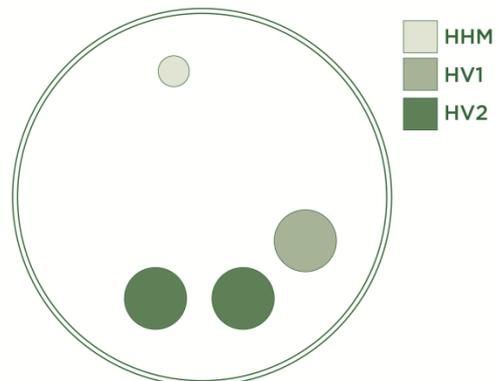


图 2. 人受精卵和胚胎玻璃化时 60 mm 培养皿盖内的液滴分布

第 III 阶段 装载和冷冻

- 1 将一微滴含有卵母细胞或胚胎的液滴滴入培养皿盖内的 9 点钟方位。
- 2 立即用 OPS 管细端轻触微滴 (见图 3)。液滴将进入 OPS 管并形成一内含样本的方形柱体。
- 3 用单次、连贯、快速的动作将 OPS 管浸入液氮盒方形槽内的 LN2 中 (见图 4)。
- 4 快速将 OPS 管插入储存套管中 (先插入 OPS 管细端)。用封口机将储存套管开口密封。

☞ 装载

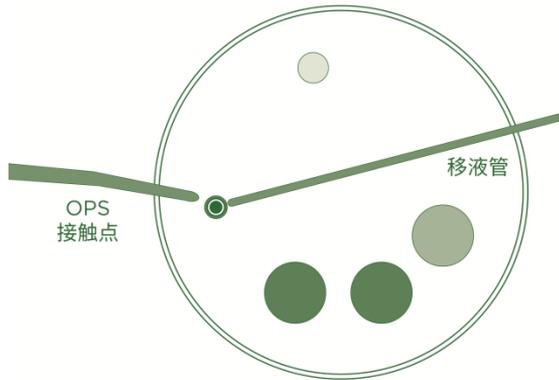


图 3. 将卵母细胞装入 OPS 管内

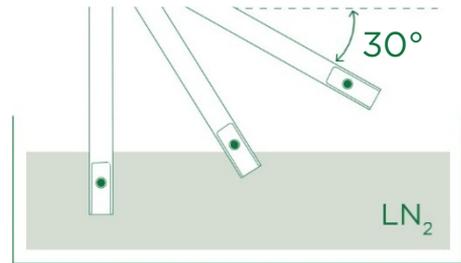


图 4. 将 OPS 管投入 LN2 中

第 IV 阶段 复苏及排出

- 1 提前 1 小时准备好复苏培养皿 (35 mm 有盖培养皿)。用移液管吸取 3,000 μ l 25-27 $^{\circ}$ C HW1 解冻液并将其加热至 37 $^{\circ}$ C。
- 2 将包含 OPS 管的储存套管转移至液氮盒冻存架上。
- 3 复苏前, 按以下步骤准备好 Nunc 四孔皿:
 - a) 用移液管吸取 900 μ l 25-27 $^{\circ}$ C HW2 解冻液滴入四孔皿第 2 个孔内
 - b) 将 900 μ l HHM 基础液滴入第 3 个孔内
 - c) 将 900 μ l HHM 基础液滴入第 4 个孔内
- 4 将储存套管前端略微提起至 LN2 蒸汽液位之上并将其用剪刀剪断。
- 5 使用小钳子将 OPS 管粗端从储存套管中夹出, 并用拇指和中指将其捏住。请确保可用食指盖住管口。▲ OPS 管细端仍须保持在液氮液面下。
- 6 取出 OPS, 并在 3 秒内将玻璃化液柱浸入 35 mm 有盖培养皿中。在体视显微镜下观察浸没过程直至看到玻璃化液柱融化且 HW1 解冻液进入 OPS 管内。
- 7 立即用食指盖住 OPS 管管口。☞ 浸没及排出

注意: 若培养液仍留在 OPS 管内, 则使用 10 μ l 或 20 μ l 微量移液器通过相应枪头连接 OPS 管粗端将空气打出, 从而使液体排出。

- 8 1 分钟后, 用移液管吸出约 10-20 μ l 含卵母细胞或胚胎的培养液, 然后进行解冻后稀释 (见下)。

第 V 阶段 解冻后稀释

- 1 采用“枕头-被子”法将卵母细胞或胚胎移入第 2 个孔中 (见图 5):
 - a. 在装有低摩尔浓度 HW2 解冻液 (0.5M 蔗糖) 的第 2 个孔底部用滴入的 HW1 解冻液 (1M 蔗糖) 做一个“枕头”;
 - b. 然后将卵母细胞或胚胎置于“枕头”上;
 - c. 最后用 HW1 解冻液做一张“被子”将其盖住。
- 2 3 分钟后, 采用“枕头-被子”法将卵母细胞或胚胎移入第 3 个孔中。等待 5 分钟。
- 3 将卵母细胞或胚胎移入第 4 个孔。本次移液无需采用“枕头-被子”法。等待 5 分钟。

🕒 等待 5 分钟

🕒 等待 5 分钟

- 4 在进行 ICSI 或胚胎植入前, 将卵母细胞移入受精用培养基 (或将胚胎移入培养基) 培养 2-4 小时。

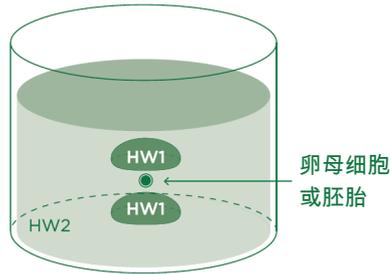
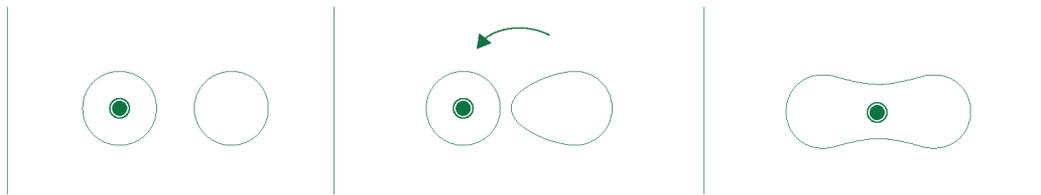


图 5. 第 2 个孔中 HW1 和 HW2 解冻液的分布

操作技巧

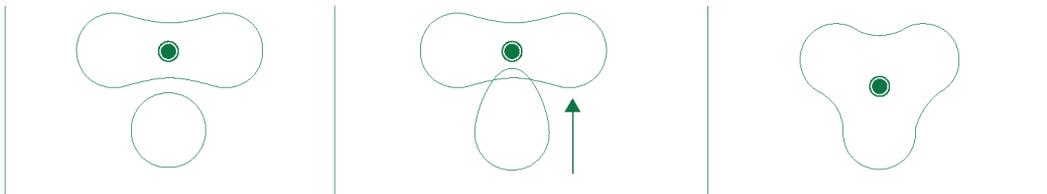
第一次液滴连通

用移液管轻触右侧液滴，轻轻向左拖动直至其与左侧液滴结合在一起。



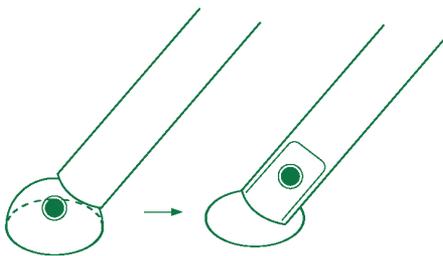
第二次液滴连通

用移液管轻触底部液滴，轻轻向上拖动直至其与原有连通液滴结合在一起。



装载

用 OPS 管细端轻触液滴。毛细作用可促使液滴进入 OPS 管内。



浸没及排出

用食指紧紧盖住 OPS 管粗端，确保没有空气泄露。由于 OPS 管内空气受热而造成气压升高，液滴将会从 OPS 管内流出。

