



Cryotec 法





目录

1 . 基本操作	• • • P. 4
实体显微镜的倍数	• • • P. 4
吸入玻璃吸管内的胚胎位置	• • • P. 4
2 . 冷冻方案	• • • P. 5
需要准备的东西	• • • P. 5
冷冻前的准备	• • • P. 5
【步骤 1】ES 平衡	• • • P. 6
【步骤 2】VS 平衡	• • • P. 9
【步骤 3】确认 VS 收缩	• • • P. 11
【步骤 3】装载	• • • P. 12
【步骤 3】超急速冷却	• • • P. 12
3 . 融解方案	• • • P. 14
需要准备的东西	• • • P. 14
融解前的准备	• • • P. 14
【步骤 4】TS 加温	• • • P. 15
【步骤 5】DS 稀释	• • • P. 17
【步骤 5】WS1 稀释	• • • P. 18
【步骤 6】WS2 洗净	• • • P. 19

1. 基本操作

【实体显微镜的倍数】

在 Cryotec 法中使用的实体显微镜的倍数仅为 2 种。

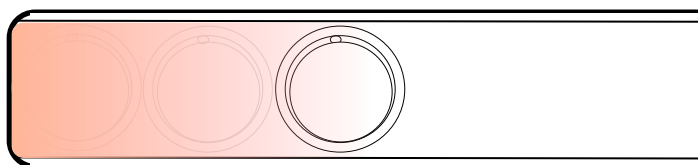
弱扩大：当操作、移动卵子/胚胎时 （ $\times 12-15$ ）
-专用皿的圆形槽体收入视野内的最大放大倍数。

强扩大：当观察卵子/胚胎时 （ $\times 45-55$ ）
-显微镜的最大扩大倍数。

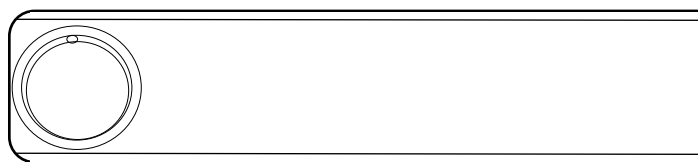
【胚胎吸入玻璃吸管内的位置】

在 Cryotec 法中所必需的胚胎操作只有以下 3 种。

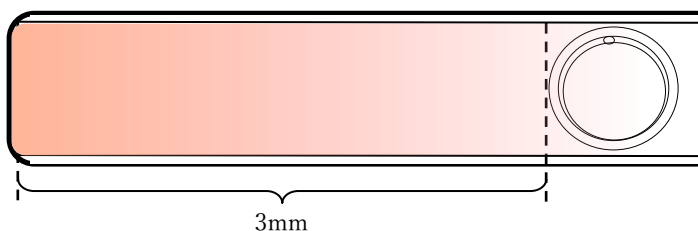
① 在卵子/胚胎之后吸入 2 个卵子/胚胎左右的少量液体。（基本位置）



② 将卵子/胚胎保持在吸管的吸头上（在玻璃化平衡时）

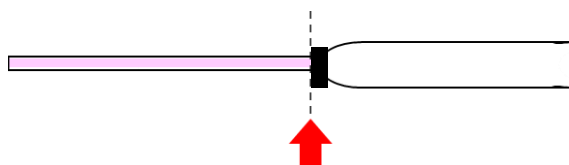


③ 在卵子/胚胎之后吸入 3mm 的液体。（在稀释时）



需要注意！

在吸入卵子/胚胎之前，事先吸入通过毛细管现象被吸入玻璃吸管内的液体（1 个气压量），这样可以让卵子/胚胎的运动稳定，并且使操作更简便。如果有必要，可将该液体的基本线用记号笔标记在吸管的外壁上。



2. 冷冻方案

所谓的“玻璃化冷冻保存”

玻璃化冷冻保存不会使卵子/胚胎的质量上升，但也不会使其下降。

无论卵子/胚胎的质量如何，该技术都能以与冷冻前相同的状态进行保存。

【需要准备的东西】

• Vitrification Kit 101

- 平衡液（ES: Equilibration Solution: 1.0 ml/小瓶×1）
- 玻璃化冷冻液（VS: Vitrification Solution: 1.0ml/小瓶×2）
- 载杆（Cryotec）4 支
- 冷冻皿 3 枚（玻璃化冷冻专用 3 孔皿）
- 实体显微镜（事先关闭加热板的电源）
- 定时器（带计数功能）
- 镊子
- 剪刀
- 用于300 μ l的微量移液管/吸头
- 巴斯德吸管（使用衔口时）
- 液氮专用箱



冷冻皿的特征

专门为Cryotec法设计的冷冻皿：①半球形槽、②用于排出液体的空间、③可以静置载杆的沟槽。由于槽底是半球形的，因此即使在显微镜下也难以通过阴影产生死角，因此很难观察不到卵子/胚胎。另外，由于球体的特点，当用显微镜从顶部观察时，槽中央正好是最深的点，所以在将卵子/胚胎放置在槽底时可以很容易地定位。

【冷冻前的准备】

1. 将操作环境设置为室温（ $26 \pm 1^\circ\text{C}$: $25\text{-}27^\circ\text{C}$ ）。
2. 使各溶液在至少一小时前达到室温（ $26 \pm 1^\circ\text{C}$: $25\text{-}27^\circ\text{C}$ ）。
（**需要注意！使用前，请务必用手指触摸液体瓶进行目视检查，以确认颜色或温度没有异常。**）
3. 准备拥有最佳内径的巴斯德吸管。
 - 卵子和卵裂期胚胎的内径为140-150 μm
 - 囊胚期胚胎大小一致，内径为160-220 μm
4. 如果冷冻尺寸为220 μm 以上的囊胚期胚胎，则需实施预先收缩（Pre-Shrink）。
 - 预先收缩的非侵害性收缩方法，适合浸渍于DS:WS=2:3的高渗溶液。

【步骤 1】

ES 平衡（8-15 分钟：室温下）

ES 平衡的目的是将冷冻保护剂（CPA）渗透到细胞中，并且随着细胞体积的完全恢复判断已经完成。

细胞收缩和恢复的机制

由于细胞内部是培养液（渗透压 300），外部是 ES（渗透压 2400），所以根据渗透压的差异，细胞内的水分会流出细胞，并且由于 CPA 会渗透进细胞膜，所以会流入细胞内。虽然这些反应同时发生，试图使细胞内外的渗透压趋于均匀，但由于与 CPA 进入细胞的速度相比，水分向外流出的速度更快，所以卵子/胚胎会先收缩，并随着 CPA 的流入再次恢复到原体积。

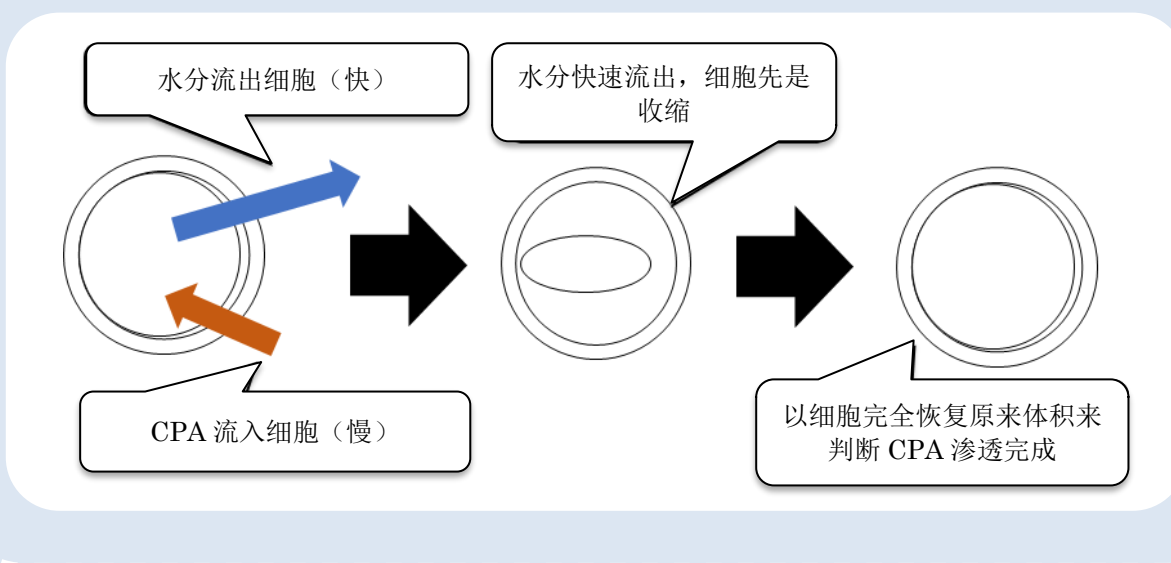
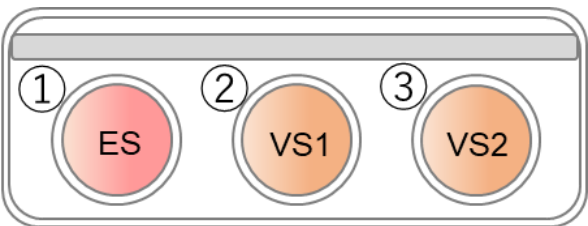


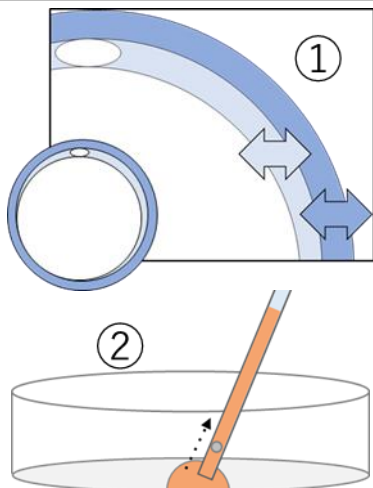
	图	步骤
1		1. 将室温下的 ES 分注到冷冻皿的槽（左侧）中 300μl（①）。 2. 将室温下的 VS 分别分注到冷冻皿的槽（其他 2 个）中 300μl（②）（③）。

需要注意！在分注过程中防止不必要的气泡产生的诀窍

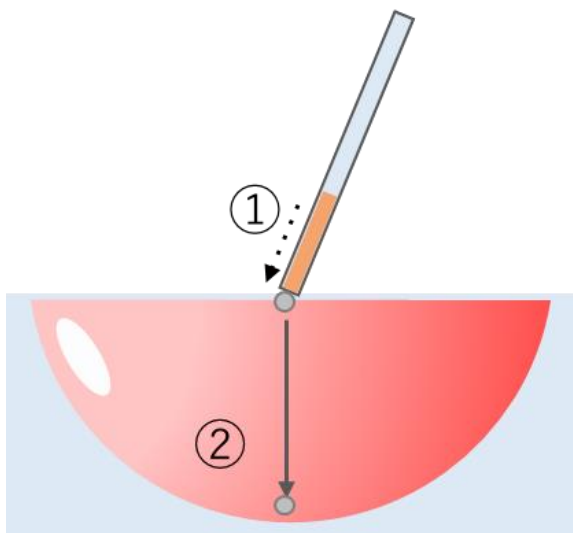
将移液管吸头安装到设定计量为 300μl 的微量吸管上。吸入 300μl 后，将所有液体返回管内。通过再次缓慢地将液体吸入吸管内并缓慢分注，吸头中就不会产生不必要的气泡。

需要注意！如果产生气泡，请静置

即使产生气泡，只要静置不动，气泡便会自然消失。如果用微量吸管将其移除，则分注到槽中的液体量会发生变化，因此不要进行此操作。

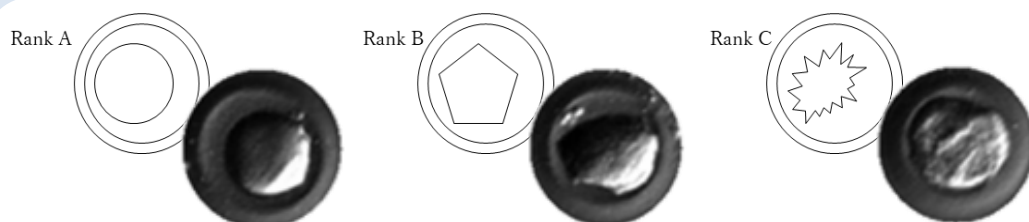
2	 培养皿	1. 观察卵子/胚胎的形态，并记录卵周隙和透明带之间宽度的比例，以便确认通过 ES 完全恢复的形态。 2. 用巴斯德吸管吸出卵子/胚胎，并附带吸出 2 个卵子/胚胎大的培养液（①）。
---	--	--

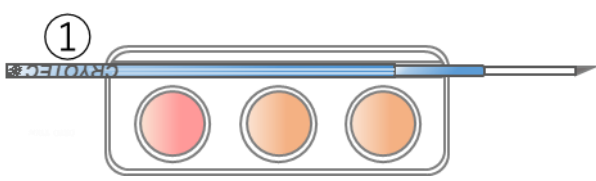
需要注意！当卵子/胚胎放置在 ES 中后，将立即开始体积收缩。

3	 ES	1. 将卵子/胚胎与步骤 2-2 中吸入的培养液一起放置在 ES 表面中央部（①）。 2. 用计时器开始计时。 3. 卵子/胚胎在收缩的过程中大约 30 秒后到达槽底（②）。到达槽部的卵子/胚胎在 90 秒时可以确认到最大限度的收缩。 4. 等待卵子/胚胎的体积从收缩状态中完全恢复。
---	--	---

通过收缩状态评估卵子/胚胎的质量

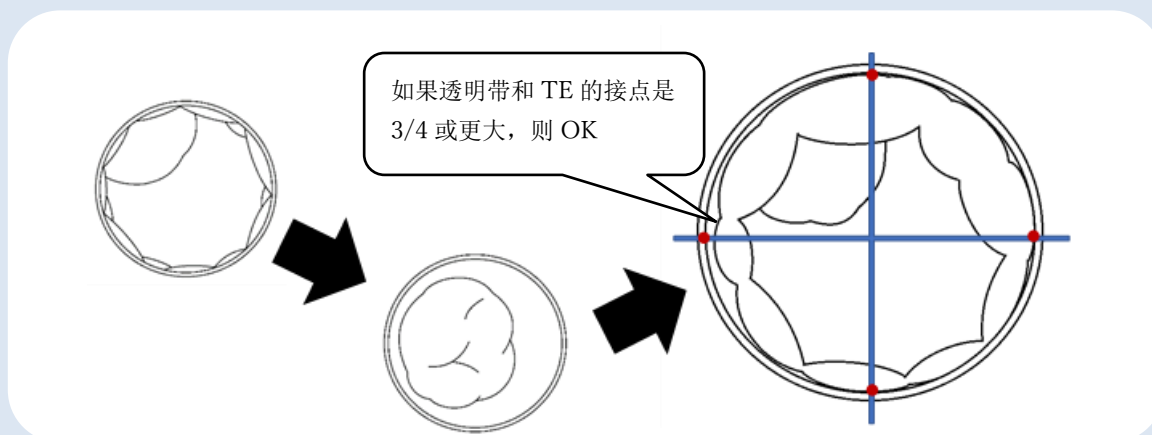
卵子/胚胎的质量可以通过细胞的膜通透性来判断，并且越是优质的卵子/胚胎，越会在保持球体均匀的同时收缩（Rank A）。如果膜通透性出现偏差，则会产生角（Rank B），进一步时，则会表现出极端不均匀的收缩（Rank C）。虽然这些 Grade（等级）不影响其存活率，但因为 Grade 代表卵子/胚胎本身的质量，所以在这之后的受精能力和着床能力会不同。



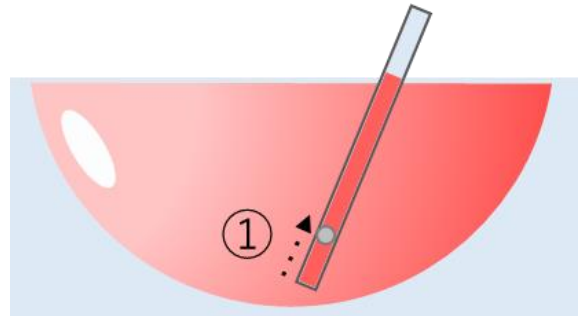
4		1. 在等待恢复的时间内，从包装中取出载杆并做准备。在手柄背面（与 Logo 面相反的一面）写上卵子/胚胎信息，将载杆的 Logo 面朝上，放置入冷冻皿的沟槽处（①）。 2. 将液氮专用箱装满冷却用的液氮。 3. 当收缩的卵子/胚胎体积完全恢复时，就可以判断 ES 平衡完成。
---	---	--

平衡完成的判断

当确认到体积恢复，或无法确定完全恢复时，则 ES 平衡完成时间为卵子和囊胚（直径 $160\mu\text{m}$ - $220\mu\text{m}$ ）15 分钟，4-8 细胞期胚胎 12 分钟，之后结束 ES 并进入下一步。这是因为，如果分别浸泡 15 分钟或 12 分钟，就可以判断已经充分平衡了。



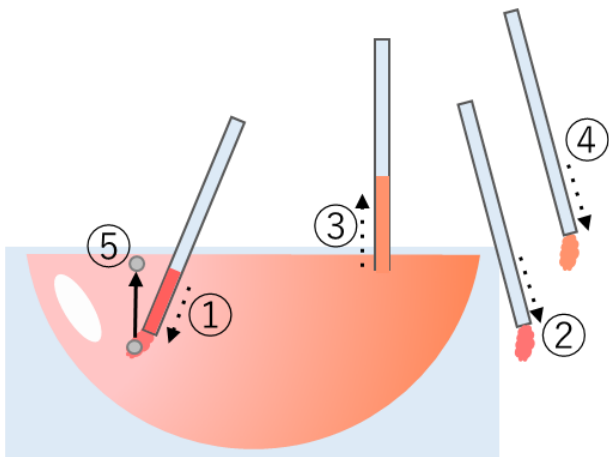
由于囊胚腔的存在，所以判断囊胚的体积是否完全恢复有些困难。因此，对于囊胚，可以如上图所示观察 TE 与透明带的接触方法，判断其恢复情况。当从上方观察囊胚时，重叠上十字架，并且 TE 和透明带在与卵周隙接触的四个点中的三个以上点处没有间隙、紧密接触，则判断已经恢复了。

5	 ES	1. 将卵子吸入巴斯德吸管后，并附带吸入少量（2 个卵子/胚胎大）的 ES（①）。
---	---	---

【步骤 2】

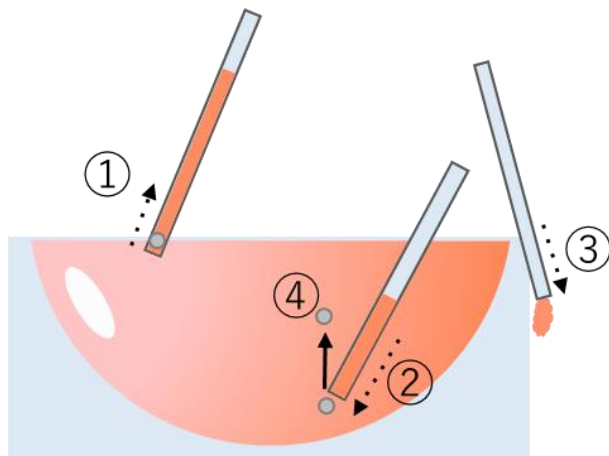
VS 平衡 VS1 （30-60 秒）

VS1 的目的是用 VS 替换所有细胞外的 ES，并且通过匹配细胞和 VS1 的重量来判断已经完成了。

	图	步骤
1	 VS1	1. 将卵子/胚胎释放到 VS1 的中间深度（①）以下。 2. 吸管预洗：将吸管中剩余的全部 ES 排放到排液槽中（②）。 3. 从圆槽的边缘吸入新鲜的 VS1（③），并快速地将其排出（④）。 4. 卵子/胚胎在被投入后后，将会立即浮到 VS1 表面上（⑤）。（在卵子/胚胎投入后立即聚焦 VS1 表面。）

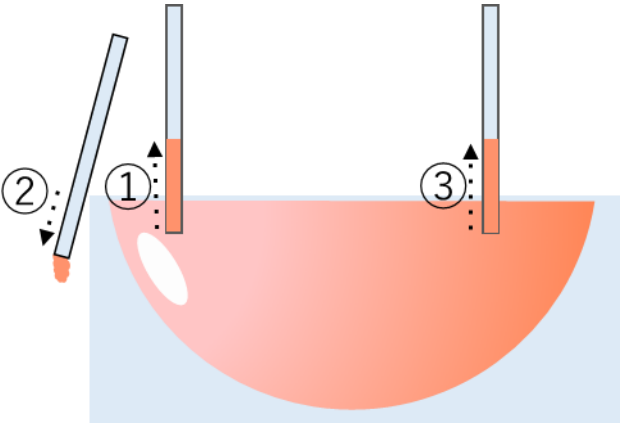
需要注意！

由于释放的卵子/胚胎会立即漂浮到表面，所以需将显微镜聚焦在液体表面以确认卵子/胚胎。

2	 VS1	1. 从槽的边缘吸出新鲜的 VS1 后，将卵子/胚胎吸到吸管的吸头中（①）。 2. 将卵子/胚胎释放到 VS1 槽底（仅释放卵子/胚胎（②））。 3. 吸管预洗：将吸管中剩余的全部 VS1 排出（③）。 4. 卵子/胚胎缓慢上升至中间深度并一定会停止（VS1 平衡完成：④）。
---	--	---

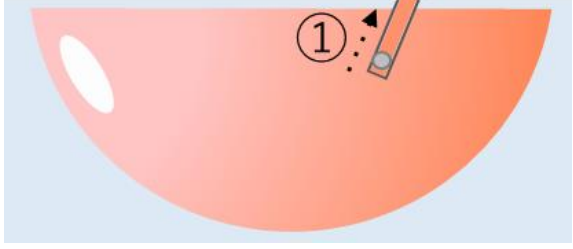
需要注意！

确认停止浮出是指，通过最大放大倍数观察卵子/胚胎并保持在相同的焦点内，以进行确认。

3	 VS2	1. 从 VS2 槽的边缘吸入并排出新鲜的 VS2 (① • ②)。 2. 再次从 VS2 槽的边缘吸入新鲜的 VS2 (③)。
----------	--	---

需要注意！

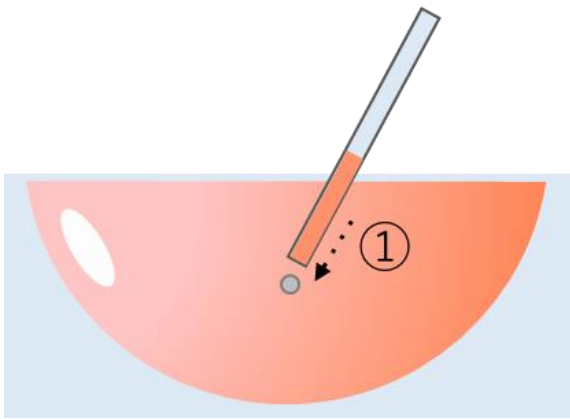
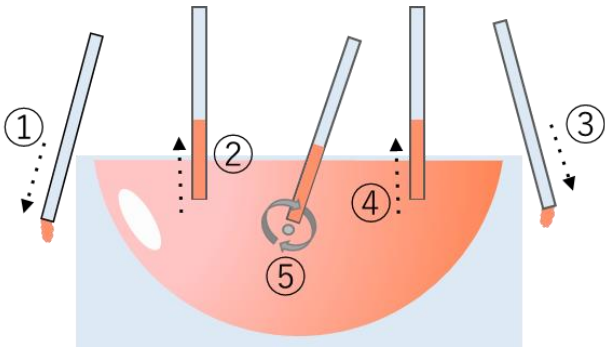
在 VS1 中吸出卵子/胚胎之前吸出新鲜 VS2 的目的是防止将 VS1 带入 VS2。

4	 VS1	1. 将 VS1 的卵子/胚胎吸到吸管的吸头前端 (①)。
----------	--	---

【步骤 3】

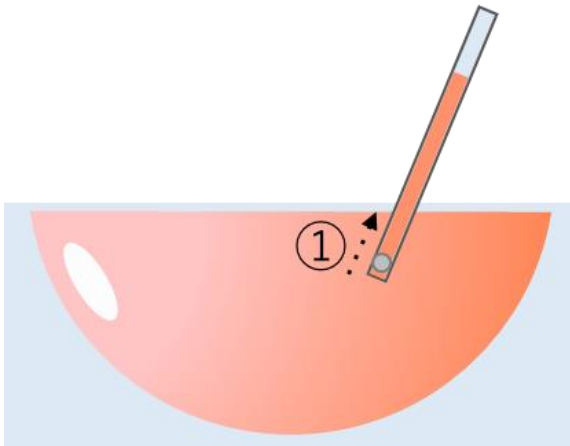
VS 收缩确认：VS2（10-20 秒）

VS2 的目的是确认 ES 已经被 VS 完全取代，细胞收缩平坦，并且不会变暗（如果 ES 仍然存在，则由浓度差异产生），以这两点判断。

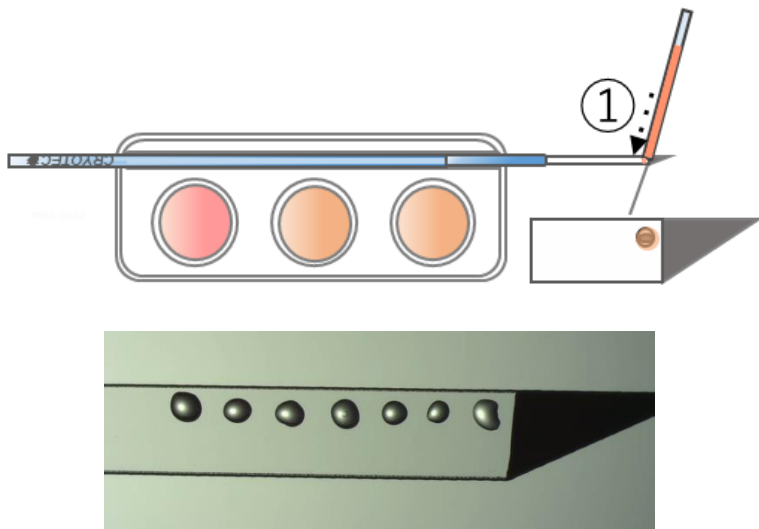
	图	步骤
1	 VS2	1. 将卵子/胚胎释放到 VS2 的中间深度（①）。
2	 VS2	1. 吸管预洗：将留在吸管中的所有 VS2 排放到排液槽（①）中，从槽的边缘吸入并排出新鲜的 VS2（②・③）。 2. 再次吸入新鲜的 VS2（④）。 3. 通过与卵子/胚胎周围的溶液一起搅拌，从多个方向观察卵子/胚胎，并确认完全收缩（⑤）。

需要注意！

如果发现卵子/胚胎自然滚动，则无需搅拌。

3	 VS2	1. 将卵子/胚胎吸到吸管的前端（①）。
---	--	-----------------------------

装载

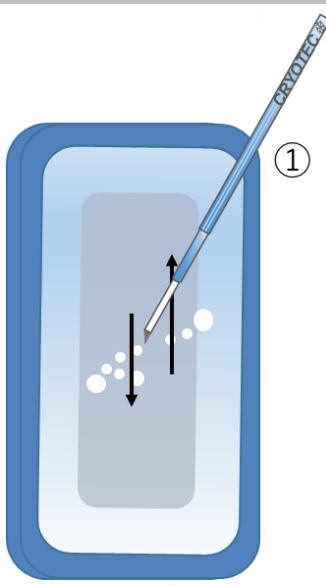
4		1. 将卵子/胚胎放置在载杆芯片尖端的标记（黑色三角形）附近，并留有少量 VS2 液滴（①）。
----------	---	--

需要注意！1 滴里 1 个卵子/胚胎。不进行液滴的最小化。

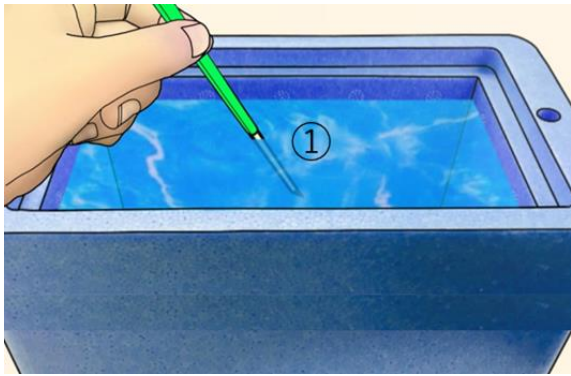
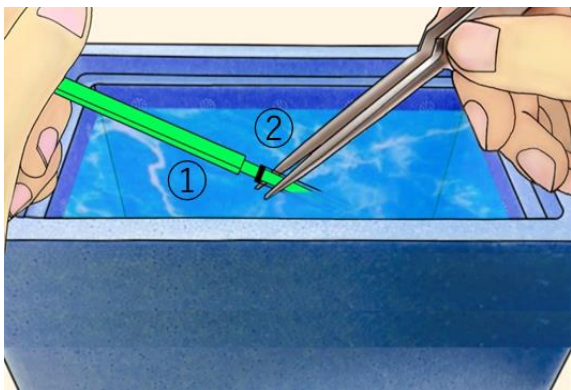
不进行液滴的最小化

在常规方法中，为了提高冷却速度，会使液滴最小化，但由于本方法的冷冻试剂具有比常规方法更高的玻璃化冷冻能力，因此不必使液滴最小化。如果使液滴最小化，则卵子/胚胎会受到表面张力压力并受损，这样的话，卵子/胚胎会粘在玻片上并且在融解时变得难以除去。TS 中的持续时间增加，这也导致卵子/胚胎受损。在本方法中，液滴不会被最小化，如果液滴变得太大或者如果一个液滴中含有两个或更多的卵子/胚胎，要重新吸出卵子/胚胎，并在芯片的其他地方制作液滴。

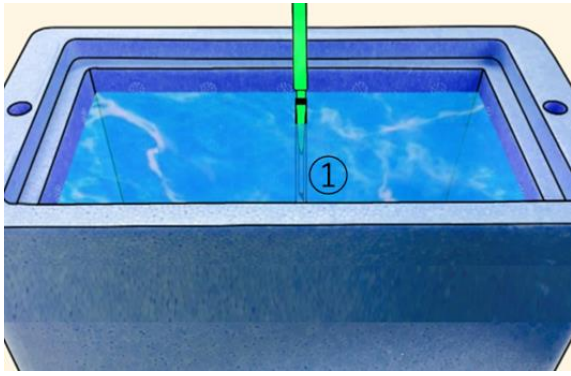
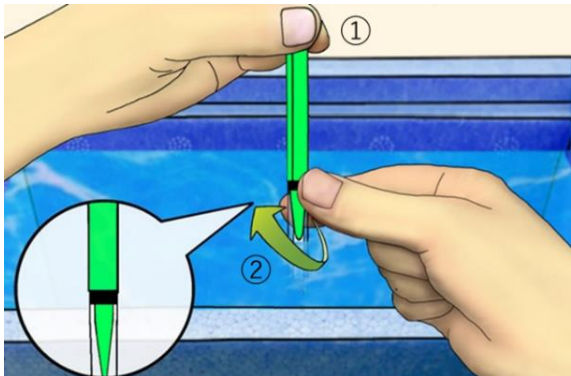
超急速冷却

5	 液氮	1. 确认到芯片上液滴中的卵子/胚胎后，立即将载杆投入到液氮中，并涮动直至不发生气泡以提高冷却速率（超快速冷却）（①）。
----------	---	---

安装罩盖

	图	步骤
1		1. 保持芯片前端在液氮中（①）。
2		1. 将罩盖投入到液氮中，在泡沫消失之后，在液氮中（紧贴在液面下）将罩盖套盖在 Cryotec 上。 2. 在将芯片的前端保持在液氮中（①），用镊子夹住罩盖的顶部（黑色标记部分）附近（②）并盖住。

需要注意！ 不要用镊子夹住罩盖的中间部分。

3		1. 用镊子套盖后，将载杆放垂直（①）。
4		1. 将芯片前端保持在液氮中（①），将罩盖的前端稍微露出液氮，用手指将罩盖用力拧紧（②）。

解冻方案

有形成冰晶风险的温度范围

在冷冻-解冻中最容易形成冰晶的是在融解时。无论冷冻速度增加多快，如果加热速率低，便会形成冰晶。重要的是如何迅速脱离形成冰晶的-80℃到-20℃的风险温度区间。

【需要准备的东西】

- Warming Kit 102
 - 解冻液（TS: Thawing Solution: 1.8 ml/小瓶×1）
 - 稀释液（DS: Diluent Solution: 0.5 ml/小瓶×1）
 - 洗净液（WS: Washing Solution: 1.0 ml/小瓶×1）
 - 解冻皿 1 枚（解冻专用 4 孔皿）
- 实体显微镜（事先关闭加热板的电源）
- 秒表（带计时功能）
- 镊子
- 用于 300 μ l 的微量吸管/吸管尖
- 巴斯德吸管（使用衔口时）
- 液氮专用箱

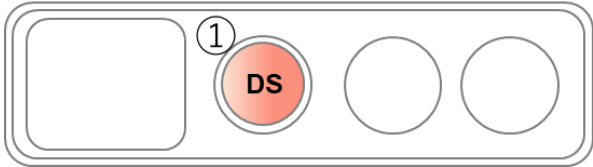


【解冻前的准备】

1. 在开始解冻的 2 个多小时前，在 37℃ 的培养箱内加热解冻皿和 TS 瓶（盖子保持关闭）（可以隔夜加热）。
 - 当使用 CO₂ 培养箱时，确认 TS 瓶的瓶盖是否被拧紧，并进行加热（同上，可以隔夜加热）。
2. 在解冻开始前至少两小时使 DS 和 WS 达到室温（26±1℃: 25-27℃）。
3. 用液氮专用箱（液氮容器）准备液氮。
4. 从液氮罐中取出载杆，在液氮中取下罩盖，并将其立放在离操作人员最近的内壁上。

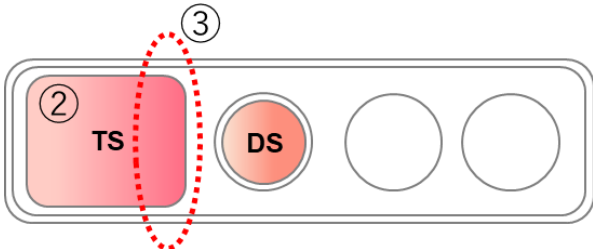
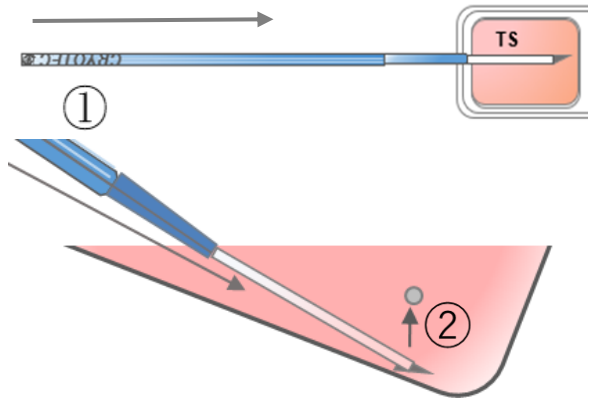
【步骤 4】

用 TS 加温（1 分钟）

	图	步骤
1		1. 将预先加热到 37℃ 的解冻皿从培养箱中取出，向第 2 个槽（第一个圆槽）分注 300μl 室温下的 DS（①）。

需要注意！

为了尽可能保持 37℃，应该在即将开始前才分注室温状态的溶液（因为会降低解冻皿的温度）。但是，由于 TS 的操作时间仅为 1 分钟且无法进行准备，因此事先分注 DS。

2		1. 将预先加热到 37℃ 的 TS 瓶（1.8ml）从培养箱中取出，并将所有溶液倒入 TS 槽（长方形槽体）中（②）。 2. 将显微镜聚焦在 TS 槽底（特别是插入 Cryotec 时芯片部分进入的位置：左图虚线部）（③）。
3		1. 从液氮中迅速将载杆取出并立即投入 TS 中（1 秒内）（①）。 2. 启动计时器并 静止 1 分钟不动 。 3. 卵子/胚胎在加温过程中，会自然地从载杆芯片上开始浮起（②）。

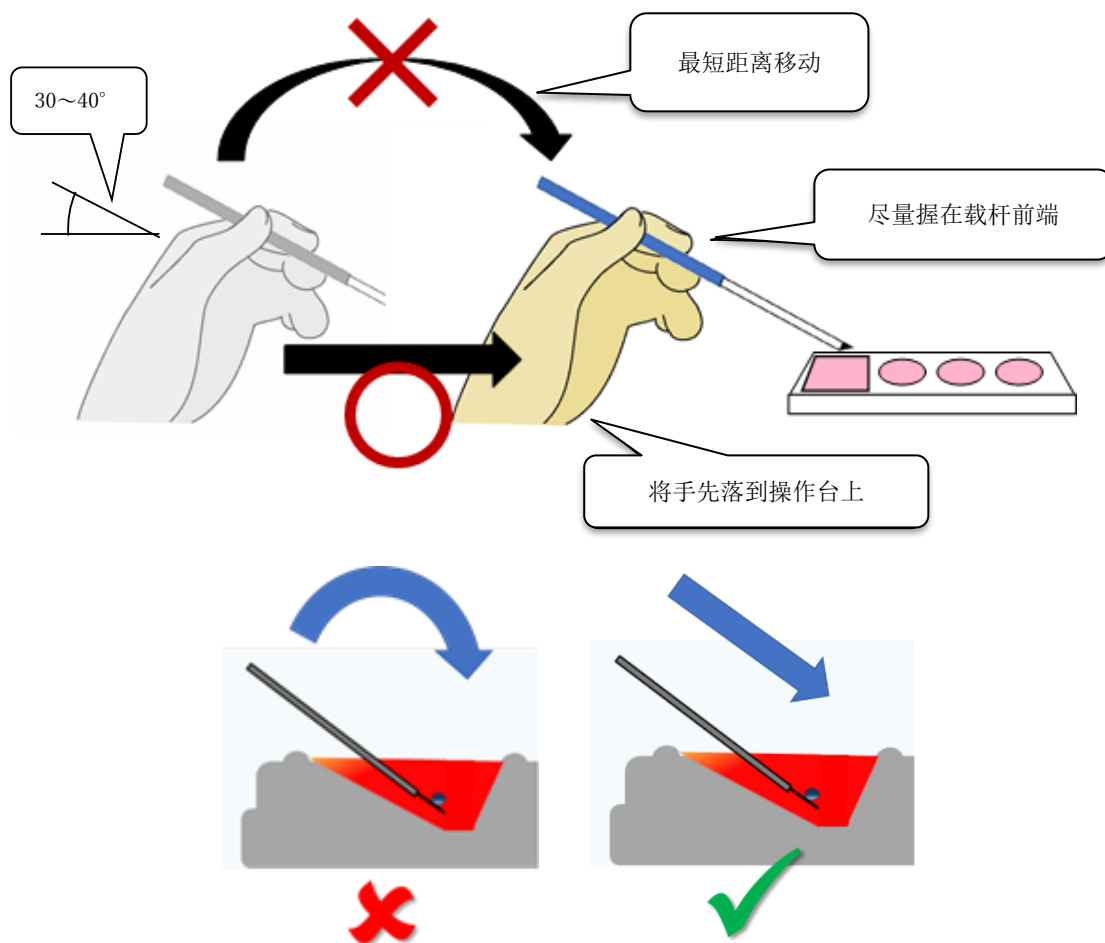
需要注意！TS 必须静止 1 分钟！

将载杆芯片浸在 TS 中时，必须静止 1 分钟不动。如果移动载杆，那么受被冷冻的载杆的影响，整个 TS 的温度会下降，而且从芯片上浮起的卵子/胚胎会因为振动而发生移动，并且变得很难观察到。即使在载杆插入时在芯片上找不到卵子/胚胎，也要耐心静止不动。

将 Cryotec 载杆安全地浸入 TS 中的诀窍

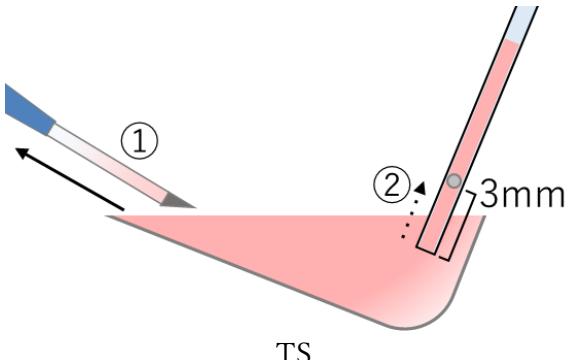
用右手准备吸管，尽可能握住载杆靠近芯片的手持部位，沿 TS 槽以 30-40° 的角度迅速插入。这时，手会无意识地画弧线，但是可以通过直线移动以保持最短距离，并且可以先让手的侧面落在操作台上，以便可以稳定地插入载杆。在手着落之前要动作迅速，之后在插入 TS 时要保持稳妥安定。

如果垂直插入 TS 槽，载杆芯片的表面部分接触到液体的面积会变得非常大，并且会带进空气，导致 TS 中形成气泡。当芯片上产生气泡时，可能很容易丢失卵子/胚胎，因此从液氮拿出时尽可能保持垂直，并沿着槽体的曲线移动到 TS 以最大限度抑制气泡的产生。



【步骤 5】

用 DS 稀释（3 分钟）

	图	步骤
1		1. 载杆静置 1 分钟后，慢慢将载杆从 TS 槽中取出 (①)。 2. 在 TS 中吸入卵子/胚胎，然后用 3 秒左右的时间往吸管内慢慢地吸入 3mm 的 TS (②)。

需要注意！

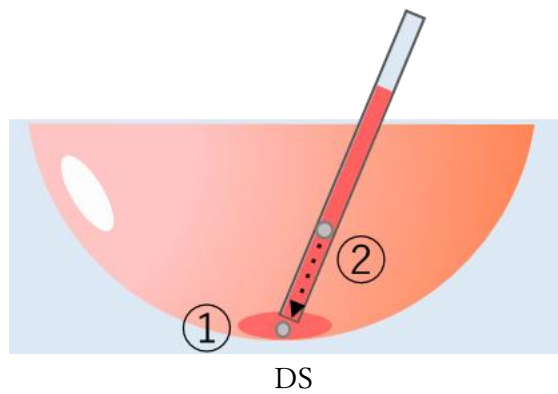
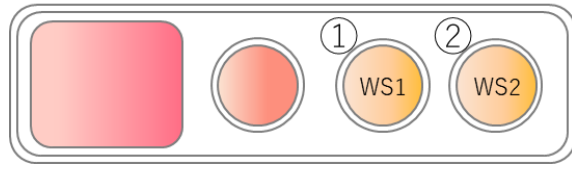
静置 1 分钟后，如果卵子/胚胎没有与载杆芯片分离，则用吸管从卵子/胚胎下面吹出溶液，使其从玻片上浮起。在此操作中注意不要触碰卵子/胚胎。

需要注意！如果看不到卵子/胚胎

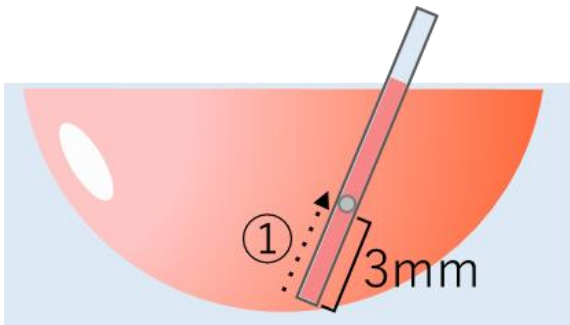
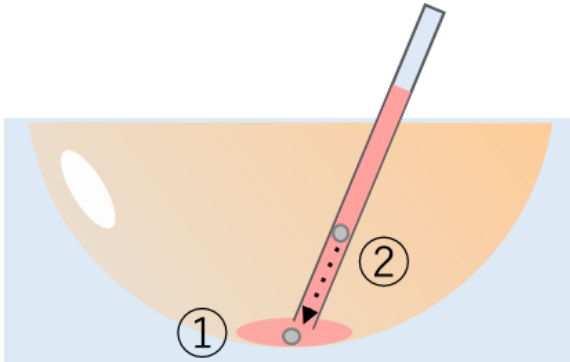
只要是在冷冻时放到载杆芯片上的话，那么 **TS 槽中就一定存在卵子/胚胎**。由于 TS 是毒性非常低的溶液，所以可以耐心寻找。

需要注意！

可以利用位于解冻皿盖上的 3mm 指示器来测量 3mm。

2		1. 将吸管前端插入 DS 底部中心，并在 3 秒内缓慢排出 TS，在底部创建一个 TS 层液池 (①)。 2. 然后将卵子/胚胎静置在 TS 层的底部 (②)。 3. 启动计时器后，关闭显微镜的灯并让其静置 3 分钟。
3		1. 在等待 3 分钟的过程中，向 WS1 和 WS2 槽分别注入 300μl 的 WS (①) (②)。

用 WS1 稀释（5 分钟）

	图	步骤
1	 DS	1. 在 DS 中吸入卵子/胚胎，然后用 3 秒左右的时间往吸管内慢慢地吸入 3mm 的 DS（①）。
2	 WS1	1. 将吸管前端插入 WS1 底部中心，并在 3 秒内缓慢排出 DS，在底部创建一个 DS 层液池（①）。 2. 然后将卵子/胚胎静置在 WS1 层的底部（②） 3. 启动计时器后，以最大放大倍数记忆卵子/胚胎形态，关闭实体显微镜的灯并让其静置 5 分钟。 4. 5 分钟后，与记忆的卵子/胚胎形态进行比较。如果可以确认收缩的卵子/胚胎体积处于完全恢复或恢复的过程中，则可以判定为存活。

需要注意！

在 WS1 步骤中确认卵子/胚胎是否因冷冻-融解而受损很重要。

存活的卵子/胚胎会发生正常的膜反应，并恢复体积。WS1 中的这种反应是因为卵子/胚胎从 DS（900）进入 WS（300）时，在试图变成等渗压时会发生冷凝而产生的。也就是说，虽然良好的卵子/胚胎会完全恢复体积，但是越是不良的卵子越是需要更长的时间来恢复体积。另外，如果是细胞膜受损的卵子/胚胎或是卵子已死亡的情况下，则不会发生正常的膜反应，且卵子/胚胎的体积“不发生反应”“什么都不会改变”。

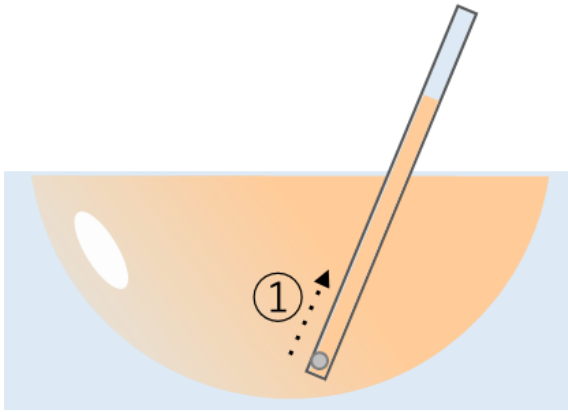
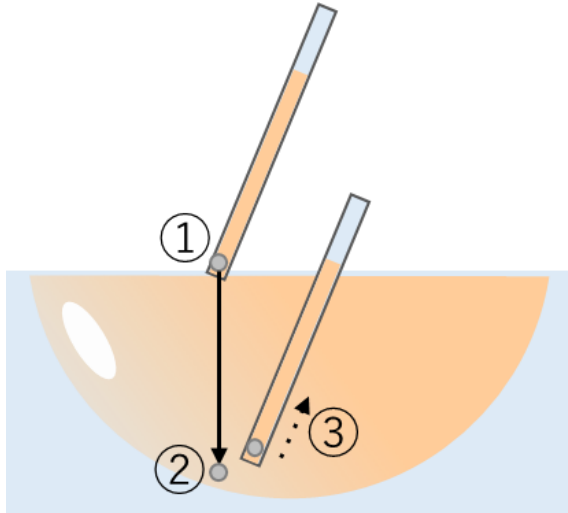
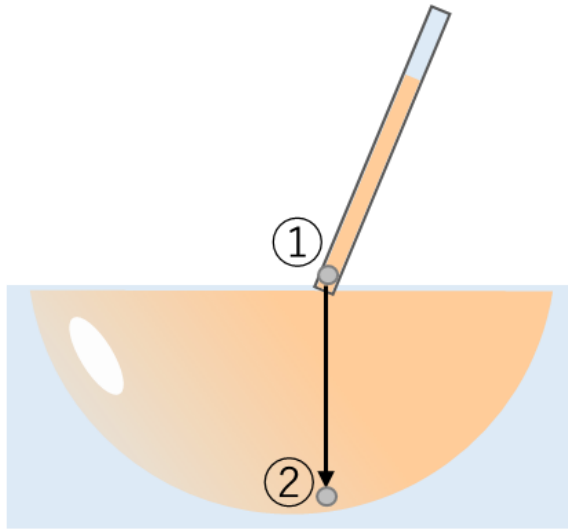
在胚胎的情况下，如果囊胚腔开始再次出现并打开，或者重新形成囊胚腔，则为“存活”。一般而言，如果确认到 30% 或更多存活分裂球，则人类胚胎将来有变成婴儿的可能性。

-2 细胞期胚胎的情况，1 个分裂球

-4 细胞期胚胎的情况，2 个分裂球

-8 细胞期胚胎的情况，3 个分裂球

用 WS2 洗净（1 分钟）

	图	步骤
1	 WS1	1. 将微少量 WS1 和卵子/胚胎吸入吸管（①）。
2	 WS2	1. 将卵子/胚胎放在 WS2 槽的左侧表面（①）。 2. 卵子/胚胎自然缓慢地下沉到槽底（②）。 3. 在卵子/胚胎到达槽底后，再次将微少量 WS2 和卵子/胚胎吸入吸管内（③）。
3	 WS2	1. 将卵子/胚胎放在 WS2 槽的右侧表面（①）。 2. 卵子/胚胎再次自然缓慢地下沉到槽底（②）。 3. 卵子/胚胎在到达槽底之后完成清洗。 4. 将卵子/胚胎返回到培养液滴中并进行恢复培养直至显微受精或胚胎移植。

需要注意！ 建议 ICSI 培养 2 小时，囊胚移植培养 1 小时或更长时间。