

**KB**

**BIOSYSTEM**

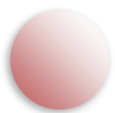
Produkte für Assistierte  
Reproduktions Techniken



**Gebrauchsempfehlung**



**SAGE In-Vitro Fertilization**  
*a CooperSurgical Company*



**BIOSYSTEM**

Produkte für Assistierte  
Reproduktions Techniken

[www.kbbiosystem.com](http://www.kbbiosystem.com)

**So erreichen Sie uns:**

**KB Biosystem** –  
**Telefon:** (+49) 07071 83958  
**E-Mail:** kb@supra-net.net

**Aeulestrasse 23**

– **72074 Tübingen**

**Fax:** (+49) 07071 83995

**Homepage:** [www.kbbiosystem.com](http://www.kbbiosystem.com)



[www.kbbiosystem.com](http://www.kbbiosystem.com)

In diesem Katalog finden Sie Gebrauchsempfehlungen zu den IVF-Medien und Zusätzen der  
Firma



Die Medien der Firma SAGE sind ausschließlich für die Verwendung im Labor zugelassen. Andere Anwendungen müssen vom Endverbraucher näher bezeichnet werden. Jedes Labor sollte selbst festlegen, welches Medium es für die spezifische Anwendung gebraucht. Sollten Sie als SAGE-Medien Anwender weitere Fragen haben oder zusätzliche Informationen wünschen, so stehen wir und Dr. Patrick Quinn, Ph.D., HCLD Ihnen gerne jederzeit zur Verfügung.

Alle Produkte der Firma SAGE haben wir in ausreichender Anzahl auf Lager. Wir können Ihnen daher eine kurzfristige Lieferung garantieren. Wir sind sicher, dass wir Sie von der Qualität der SAGE Medien und Zusätze überzeugen können, die Ihnen helfen werden, die Ergebnisse zu liefern, die Sie wünschen.

Ihr KB Biosystem Team

# Inhalt

	<b>Seite</b>
Allgemeine Produkthinweise	1 - 2
Besonderheiten der SAGE-Medien	3 - 4
Lagerung und Haltbarkeit	5 – 6
<b>pH-Wert und CO<sub>2</sub>-Begasung</b>	7
pH-Wert Tabelle	8
<b>Proteine</b>	
Protein HSA und SPS	9
HSA / SPS - Tabelle	10
<b>PATRICK QUINN:</b>	
Preparation and use of SAGE Media in a typical ART-cycle:	
Preparation of dishes	11 – 12
Schedule of dish preparation and procedure	13 – 14
IVF protocol for Single Embryo Culture	18 – 22
<b>Quinn's Advantage Sequential IVF-Medien:</b>	
Gebrauch und Prezedere einer IVF mit Quinn'e Advantage IVF-Medien	15 – 17
<b>Quinn's Advantage PROTEIN PLUS</b>	
Materialliste	23
Bildbeschreibung einer IVF mit Protein Plus Sequential IVF-Medien	24 – 26
<b>IN-VITRO Maturation</b>	
Quick Protocoll for IVM-Treatment nach Ri-Cheng Chian	27
Materialliste	28
Ablauf – Checkliste	29 – 34

# Inhalt

	<b>Seite</b>
<b>Spermienaufbereitung</b>	
Spermienaufbereitung	35 – 36
Gebrauchsempfehlung für eingefrorene Spermienprobe	36
Bildbeschreibung	37
Fehlersuche und Behebung	38
<b>Zusätze</b>	
PVP	39
Hyaluronidase	40
<b>Kryokonservierung</b>	
QA Oocyte Freezing Medium	41
QA Oocyte Thawing Medium	42
QA Embryo Freeze Kit	43 – 44
QA Blastocyst Freeze Kit	45 – 46
QA Embryo / Blastocyst Thaw Kit	47 – 48
QA Sperm Freezing Medium Water for Tissue Culture	49 – 50

## Allgemeine Produkthinweise

*SAGE a CooperSurgical Company*

### Qualitätskontrollen

Alle Medien und Zusätze der Firma SAGE sind:

Ein-Zell MEA getestet - bestanden mit 80% oder mehr Blastozysten und

„USP Endotoxin gel clot“ getestet - bestanden mit < 1 EU/ml.

Zertifikate dieser Produktanalysen werden jeder Lieferung beigelegt.

### Lieferzeiten

In der Regel sind die Produkte der Firma SAGE dank ihrer langen Haltbarkeit und aufgrund unserer Lagerhaltung innerhalb 24 Std. (Deutschland) bzw. 48 Std. (Österreich) lieferbar.

Bitte beachten Sie unsere Versandinformation für die SAGE Fertilization, Cleavage und Blastocyst Sequential Medien (im Katalog unter Register Nr. 3). Die SAGE IVF-Kulturmedien werden alle 2 bzw. alle 4 Wochen frisch produziert und sind maximal 7 Wochen haltbar.

In unserer Versandinformation steht wann welches Medium lieferbar ist. Dies bietet Ihnen die Möglichkeit immer frisches Medium mit maximalem Haltbarkeitsdatum zu bestellen.

Gerne können Sie uns auch einen Dauerauftrag erteilen. Wir schicken Ihnen dann zu den vorab mit Ihnen vereinbarten Terminen die gewünschten IVF-Medien. Sollten Sie hier kurzfristig Änderungen vornehmen wollen ist das kein Problem: ein kurzer Anruf genügt!



## Allgemeine Produkthinweise

**SAGE a CooperSurgical Company**

### **Lagerung und Haltbarkeit**

Das ungeöffnete Produkt ist bis zum Zeitpunkt des auf der Verpackung und der Flasche ersichtlichen Verfalldatums haltbar. Nach Öffnen der Medienflasche ist diese 30 Tage haltbar, vorausgesetzt man arbeitet unter ordentlichen, aseptischen Bedingungen:

1. Die Entnahme von Medium hat mit sterilen Geräten in einer sterilen Atmosphäre zu erfolgen.
2. Nach Entnahme des Produkts aus dem Medienbehälter, muss dieser wieder fest verschlossen werden. Schreiben Sie das Datum der ersten Verwendung auf das Etikett der Flasche. Verwenden Sie das Produkt nicht länger als 30 Tage nach der ersten Öffnung.
3. Einmal entnommene Lösungen dürfen nicht zurück in den Medienbehälter gegeben werden.
4. Nach Öffnung des Medienbehälters, muss dieser gut verschlossen und den Angaben auf dem Medienbehälter oder der Verpackung entsprechend gelagert werden.
5. Die Medien dürfen nicht höheren Temperaturen als 39°C ausgesetzt werden.
6. Bei Verfärbungen, Trübungen, Niederschlägen oder bakteriellem Befall dürfen die Medien auf keinen Fall weiter verwendet werden.

### **Warnung und Sicherheitsmaßnahmen**

Das Medium kommt versiegelt und verschlossen. Wenn ein Siegel gebrochen ist oder ein Verschluss fehlt, darf das Produkt nicht verwendet werden.

Bei Verfärbungen, Trübungen, Niederschlägen oder bakteriellem Befall dürfen die Medien auf keinen Fall weiter verwendet werden.

Um Kontaminationen zu vermeiden:

1. Sollte die Entnahme nur unter ordentlichen, aseptischen Bedingungen in einer angemessenen sterilen Atmosphäre erfolgen.
2. Müssen geringe Mengen von Restmedium in den Medienflaschen verworfen werden.
3. Benutzen Sie immer eine sterile Nadel um den Gummistopfen zu durchstechen. Reinigen Sie vorab den Gummistopfen mit Alkohol.
4. Sollte nicht wiederholt die gleiche sterile Pipette oder Nadel in eine Flasche mit Medium eingeführt werden.

## Besonderheiten der SAGE - Medien

*SAGE a CooperSurgical Company*

### **Warum beinhalten die SAGE-Medien EDTA?**

EDTA bindet toxische Schwermetalle und hemmt das glykolytische Enzym Phosphoglycerol-Kinase.

### **Warum beinhalten die SAGE-Medien Natriumcitrat?**

Natriumcitrat agiert als direkter Energielieferant im TCA-Zyklus. Es wurde ursprünglich an Albumin gebunden gefunden. In den SAGE-Medien ist Citrat bereits vorhanden, es muss also nicht hinzugefügt werden.

### **Weshalb haben SAGE-Medien unterschiedliche $Mg^{2+}$ -Konzentrationen?**

Eine hohe  $Mg^{2+}$ -Konzentration verringert einen Anstieg der exogenen  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Daher sollte es Medien die Embryos enthalten, beigefügt sein, um einen Mitochondrien-schaden und den daraus resultierenden abnormalen Energiemetabolismus zu verhindern. Die  $Mg^{2+}$ -Konzentration im Fertilization- Medium hingegen sollte niedrig sein, da Spermien eine hohe  $Ca^{2+}$ -Konzentration benötigen um eine Eizelle befruchten zu können.

### **Warum wird Gentamicin als Antibiotikum verwendet?**

Gentamicin hat ein breiteres Wirkungsspektrum, ist wesentlich stabiler als Penicillin / Streptomycin und schließt eine allergische Reaktion der Patientin aus.

## Besonderheiten der SAGE - Medien

*SAGE a CooperSurgical Company*

### **Weshalb sind SAGE-Medien HEPES-gepuffert?**

Die HEPES-Pufferung ermöglicht den pH-Wert des Mediums außerhalb eines CO<sub>2</sub>-Inkubators beizubehalten. Es ist NICHT erwiesen, dass HEPES eine embryotoxische Wirkung hat! Es hat bis heute mehr Embryos erhalten als getötet...

### **Warum werden SAGE-Medien vorbegast?**

Das Vorbegasen der Medien mit CO<sub>2</sub> während des Herstellungsverfahrens stabilisiert die Medien. Extreme pH-Abweichungen, wie sie bei nicht vorbegasteten Medien auftreten würden, werden so vermieden. Wenn die Medien zu alkalisch werden, fällt Kalziumkarbonat aus und bleibt als Niederschlag bestehen, auch wenn der pH-Wert wieder verringert wird.

### **Warum wird Phenolrot in SAGE-Medien verwendet?**

Phenolrot ist ein hervorragender pH-Indikator, der den Endverbraucher vor schädlichen pH-Veränderungen warnt. Es beinhaltet KEINE östrogenen Inhaltsstoffe.

## Lagerung und Haltbarkeit

*SAGE a CooperSurgical Company*

<b>Artikel-Nr.</b>	<b>Artikelbezeichnung</b>	<b>Lagerung</b>	<b>Haltbarkeit</b>
ART-1020	QA Fertilization Medium 50 ml	2 - 8°C	50 Tage
ART-1021	QA Fertilization Medium 100 ml	2 - 8°C	50 Tage
ART-1026	QA Cleavage Medium 50 ml	2 - 8°C	50 Tage
ART-1027	QA Cleavage Medium 100 ml	2 - 8°C	50 Tage
ART-1029	QA Blastocyst Medium 50 ml	2 - 8°C	50 Tage
ART-1520	QA Fertilization Protein Plus Medium 20 ml	2 - 8°C	50 Tage
ART-1526	QA Cleavage Protein Plus Medium 20 ml	2 - 8°C	50 Tage
ART-1529	QA Blastocyst Protein Plus Medium 20 ml	2 - 8°C	50 Tage
ART-1023	QA Medium w/HEPES 100 ml	2 - 8°C	10 Monate
ART-1024	QA Medium w/HEPES 500 ml	2 - 8°C	10 Monate
ART-1600	QA In-vitro Maturation Medium	2 - 8°C	10 Monate
ART-3001	Human Serum Albumin 100 ml	2 - 8°C	10 Monate
ART-3003	Human Serum Albumin 12 x 5 ml	2 - 8°C	10 Monate
ART-3010	Serum Protein Substitute 100 ml	2 - 8°C	10 Monate
ART-3011	Serum Protein Substitute 12 x 12 ml	2 - 8°C	10 Monate
ART-2080	80% PureCeption Upper Phase	2 - 8°C	10 Monate
ART-2040	40% PureCeption Lower Phase	2 - 8°C	10 Monate
ART-2100	100% Isotonic PureCeption	2 - 8°C	10 Monate
ART-2004	4 Det. Kit w/HTF	2 - 8°C	10 Monate
ART-2016	16 Det. Kit w/HTF	2 - 8°C	10 Monate
ART-2024	24 Det. Kit 2 Gradient	2 - 8°C	10 Monate

## Lagerung und Haltbarkeit

*SAGE a CooperSurgical Company*

<b>Artikel-Nr.</b>	<b>Artikelbezeichnung</b>	<b>Lagerung</b>	<b>Haltbarkeit</b>
ART-1005	Quinn's Sperm Washing Medium 12 x 12 ml	2 – 8°C	10 Monate
ART-1006	Quinn's Sperm Washing Medium 100 ml	2 – 8°C	10 Monate
ART-4008	Oil for Tissue Culture 100 ml	Raumtemp.	18 Monate
ART-4008-5	Oil for Tissue Culture 500 ml	Raumtemp.	18 Monate
ART-4005-A	PVP	2 – 8°C	2 Monate
ART-4007-A	Hyaluronidase	- 20°C	4 Monate
ART-4011	PBS	2 – 8°C	10 Monate
ART-4012	PBS mit Ca, Mg, Glukose, Pyruvat, Phenolrot	2 – 8°C	10 Monate
ART-4100	QA Ca/Mg-Free Medium w/HEPES	2 – 8°C	10 Monate
ART-4010	Water for Tissue Culture	Raumtemp.	18 Monate
ART-8017	QA Oocyte Freezing Medium	2 – 8°C	10 Monate
ART-8018	QA Oocyte Thawing Medium	2 – 8°C	10 Monate
ART-8014	QA Embryo Freeze Kit	2 – 8°C	10 Monate
ART-8015	QA Blastocyst Freeze Kit	2 – 8°C	10 Monate
ART-8016	QA Thaw Kit	2 – 8°C	10 Monate
ART-8022	QA Sperm Freezing Medium	2 – 8°C	10 Monate

## pH - Wert und CO<sub>2</sub> - Begasung

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

#### **Quinn's Advantage Sequential Medien**

**= optimaler pH-Wert**

**= erfolgreiche Embryokultur**

Die Erfahrungen von SAGE im klinischen als auch im Herstellungsbereich haben früh zur Einsicht geführt, dass das Vorbegasen mit CO<sub>2</sub> während des Herstellungsverfahrens dazu beiträgt optimale pH-Werte zu erhalten, welche die Voraussetzung für eine erfolgreiche Embryokultur sind. Es wird eindeutig eine höhere Embryoqualität erzielt, was fortlaufende Studien auch weiterhin belegen.

**Es ist wesentlich wichtiger den pH-Wert zu messen als den CO<sub>2</sub>-Gehalt!**

**SAGE hat die NaHCO<sub>3</sub>-Konzentration so eingestellt, dass die Medien in den meisten Fällen einen optimalen pH-Wert bei 5% CO<sub>2</sub> erreichen.**

Der gewünschte pH-Wert sollte möglichst kontinuierlich eingehalten werden!

Um ein Ausgasen von CO<sub>2</sub> zu verhindern, sollten die Kulturschalen nicht länger als nötig außerhalb des CO<sub>2</sub>-Inkubators gehandhabt werden.

Nach Zurückstellen der Kulturschalen in den CO<sub>2</sub>-Inkubator sollte die gewünschte CO<sub>2</sub>-Konzentration so schnell wie möglich wieder hergestellt werden.

#### **Optimale pH-Richtwerte für SAGE Medien**

Folgende pH-Wert Tabelle stellt eine Empfehlung mit den optimalen pH-Richtwerten für die Quinn's Advantage™ Sequential-Medien zur Verfügung, unabhängig davon, welche CO<sub>2</sub>-Konzentration Sie verwenden möchten.

## pH-Wert Tabelle

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

<b>Quinn's Advantage™</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>pH-Wert</b>
Fertilization Medium	ART-1020 / ART-1021	7.3 ± 0.1
Cleavage Medium	ART-1026 / ART-1027	7.2 ± 0.1
Blastocyst Medium	ART-1029	7.3 ± 0.1
PROTEIN PLUS Fertilization (HTF) Medium	ART-1520	7.3 ± 0.1
PROTEIN PLUS Cleavage Medium	ART-1526	7.2 ± 0.1
PROTEIN PLUS Blastocyst Medium	ART-1529	7.3 ± 0.1
Medium w/HEPES	ART-1023 / ART-1024	7.3 ± 0.1
PBS	ART-4011	7.5 ± 0.3
PBS mit Ca, Mg, Glukose, Pyruvate, Phenolrot	ART-4012	7.5 ± 0.3

## Protein HSA und SPS

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

Protein in Form von Patientenserum oder Albumin wird umfassend in Medien für IVF, GIFT, ICSI, Embryokultur, Embryotransfer, Kryokonservierung und Spermienaufbereitung für Intra-Uterin Inseminationen zugesetzt. Man geht davon aus, dass es die Stabilität der Zellmembran erhält und mögliche im Kulturwasser, Kulturmedium, Behälter und Kulturschalen enthaltene toxische Spurenelemente bindet.

Einige Medien und Zusätze der Firma SAGE beinhalten bereits Protein in Form von HSA oder SPS. Bei anderen Medien wird eine Protein - Zugabe empfohlen.

Beim Serum Protein Substitute (SPS) wird zusätzlich zu den vorteilhaften Effekten des Albumins auf die Zellphysiologie angenommen, dass sich die Präsenz von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globulin in bestimmten Plasma-Expander-Vorbereitungen vorteilhaft auf die Kultur der Embryos in-Vitro auswirkt (Pool & Martin, 1994). Dieser zusätzliche Nutzen ist dem im  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globulin enthaltenem hohem Gehalt des Polyhydroxy-Bereiches zugeschrieben worden, wodurch ein leicht gelartiges Umfeld entsteht, was die embryonale Entwicklung fördert (Weathersbee et al, 1995). Quinn's Advantage SPS ist eine Proteinergänzung, welche die vorteilhaften wachstumsfördernden Tätigkeiten des Albumins und  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globulins miteinander vereint.

**Bestandteile SPS** Das Produkt enthält 50 mg/ml Protein in Salzlösung. Das Protein setzt sich aus 88% Human-Serum-Albumin und 12%  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globulin zusammen.

**HSA** Das Produkt enthält 100 mg/ml Gesamtprotein in Salzlösung.

### Qualitätskontrollen

Jedes Lot wird wie folgt getestet: pH-Wert ( $7,4 \pm 0,2$ ), Osmolarität ( $280 \pm 10\text{mOsm/kg}$  Wasser), Sterilität (keine Kontamination nachweisbar) und Biokompatibilität (>80% Entwicklung der Maus-Zygoten zur Blastozyste). Alle der für die Albumingewinnung genutzten Spender waren – nach individueller Testung mit anerkannten Testmethoden – negativ für HBsAg (Hepatitis B Surface Antigen), für HCV (Hepatitis C) und HIV-Antikörper (Human Immunodeficiency Virus). Spender des Ausgangsmaterials wurden auch auf Anzeichen von CJD (Creutzfeldt Jakob-Erkrankung) getestet. Basierend auf sorgfältiger Auswahl der Spender und Qualitätskontrollen während der Produktion, ist das Risiko der Übertragung viraler Erkrankungen äußerst gering. Das theoretische Risiko einer Übertragung von CJD wird ebenfalls als äußerst gering eingestuft. Bis heute sind keine Fälle bekannt, bei denen es zu einer Übertragung viraler Erkrankungen oder CJD durch Albumin kam.

## HSA / SPS - Tabelle

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

#### Zur Herstellung von 10 ml Medium (Mengenangaben in ml)

Anwendung	Empfohlenes Medium	Medium	HSA	SPS
Punktion	QA Medium with HEPES	10	-	-
OCC - Spülen	QA Medium with HEPES	10	-	-
Aufbewahrung der Eizelle bei Punktion	QA Medium with HEPES	9,5	0,5	-
Manipulation	QA Medium with HEPES	9,5	0,5	-
Inkubation der Eizelle vor Insemination / ICSI	QA Fertilization Medium	9,5	0,5	-
Insemination der Eizelle	QA Fertilization Medium	9,5	0,5	-
Embryokultur: Tag 1 bis 3	QA Cleavage Medium	9,0	-	1,0
Embryokultur: Tag 3 bis 5/6	QA Blastocyst Medium	9,0	-	1,0
Embryo-Transfer	QA Medium mit HEPES	7,0	3,0	-
	QA Medium mit HEPES	5,0	-	5,0
ICSI	QA Medium mit HEPES	9,0	-	1,0
Kryokonservierung	QA Medium mit HEPES	8,0	-	2,0

## Patrick Quinn

### PREPARATION AND USE OF SAGE MEDIA IN A TYPICAL ART CYCLE: PREPARATION OF DISHES

Media should be supplemented with protein as follows:

Medium	Use	mL medium	mL Protein
QA Medium with HEPES	Rinsing of oocyte-cumulus complexes (OCC)	10 mL in a 60 mm diameter dish	0
QA Medium with HEPES + HSA	<ol style="list-style-type: none"> <li>Storage OCCs during the aspiration procedure.</li> <li>Fertilization assessment of oocytes on D1</li> </ol>	9.5 mL Use a Falcon Organ Culture dish with 1 mL of medium covered with oil in the center well and 5 mL of QA HEPES with no protein in the outer moat.	0.5 mL HSA
QA Fertilization Medium + HSA <b><u>(SEE NOTE 2. BELOW)</u></b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Incubation of oocytes before conventional insemination or ICSI.</li> <li>Conventional insemination of oocytes</li> </ol>	9.5 mL Use 60 mm diameter dish with 10 x 30 uL drops covered with oil.	0.5 mL HSA
QA Cleavage Medium + SPS	Culture of embryos from D1 to D3	9.0 mL Use 60 mm diameter dish with 10 x 30 uL drops covered with oil.	1.0 mL SPS
QA Blastocyst Medium + SPS	Culture of embryos from D3 to D 5/6	9.0 mL Use 60 mm diameter dish with 10 x 30 uL drops covered with oil.	1.0 mL SPS
QA Medium with HEPES + HSA or SPS	For embryo transfer (ET)	with HSA: 7.0 mL with SPS: 5.0 mL Use a Falcon Organ Culture dish with 1 mL of medium covered with oil in the center well and 5 mL of medium in the outer moat.	HSA: 3.0 mL SPS: 5.0 mL

## Patrick Quinn

### PREPARATION AND USE OF SAGE MEDIA IN A TYPICAL ART CYCLE: PREPARATION OF DISHES

**NOTE:**

The media series Protein Plus (ART-1520, ART-1526, and ART-1529) are equivalent to the respective QA series (ART-1020, ART-1026, and ART-1029) but already have the protein added so no additional protein is required.

**NOTE 1:**

All bicarbonate buffered media (QA or Protein Plus Fertilization, Cleavage and Blastocyst media (cat # ART-1020/1521, -1026/1526 and -1029/1529) require a minimum of 4 h incubation under a CO<sub>2</sub> atmosphere to fully equilibrate or incubation overnight.

If the color of the phenol red pH indicator in the bottle of medium appears excessively red, the medium can be gassed within the bottle with a sterile plugged 1 mL pipette attached to a cylinder of gas mixture containing 5% CO<sub>2</sub>.

Use aseptic precautions and avoid excessive bubbling if the medium contains protein. The gas mixture should be blown over the surface of medium containing protein, not bubbled through it.

HEPES-buffered medium does NOT require CO<sub>2</sub> equilibration.

**NOTE 2:**

There are anecdotal data that human oocytes can be stored in QA Cleavage Medium (with 5 mg/mL SPS) or Protein Plus Cleavage Medium (which is manufactured to contain SPS), inseminated in this medium in regular IVF and cultured until Day 4 or beyond with acceptable results. It has also been suggested that embryos can be cultured to the blastocyst stage on Days 5/6 in Cleavage Medium, again, with acceptable results.

It is the responsibility of the end-user to validate this methodology in their own laboratory before using it as a routine procedure. It is also recommended that if this strategy is invoked, that the embryos be transferred to fresh Cleavage Medium on Day 3 or 4.

## Patrick Quinn

### PREPARATION AND USE OF SAGE MEDIA IN A TYPICAL ART CYCLE: SCHEDULE OF DISH PREPARATION AND PROCEDURES

Day -1	Day 0
<p>(the day before oocyte collection)</p> <p>Prepare QA Fertilization and QA Cleavage dishes late in the afternoon for use on D 0</p>	<p>Prepare OCC rinse and storage dishes containing QA HEPES medium.</p> <p>Collect OCCs and mechanically dissect to reduce cumulus mass.</p> <p>Inseminate in QA Fertilization, incubate 1-2 hours, then transfer oocytes to QA Cleavage dishes; overnight incubation in QA Fertilization is another option.</p> <p>If oocytes ICSled, transfer directly to QA Cleavage dishes after procedure.</p> <p>Prepare QA Cleavage dishes late in the afternoon for use on D 1.</p>
Day 1	Day 2
<p>Prepare QA HEPES + HSA dish for fertilization assessment <u>or</u> directly assess fertilization in original insemination dishes preferably under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> or within 2-3 minutes if done in an atmosphere of air.</p> <p>Assess IVF and ICSI fertilization and then place in new overnight equilibrated QA Cleavage dishes.</p> <p>Cryopreserve ≥6 2PN zygotes if sufficient quantity and keep 6-8 in culture.</p>	<p>Embryo assessment optional. ET if minimal number of embryos (2-3). Again, one must be aware of increase in pH if the dishes are held in an atmosphere of air.</p>

## Patrick Quinn

### PREPARATION AND USE OF SAGE MEDIA IN A TYPICAL ART CYCLE: SCHEDULE OF DISH PREPARATION AND PROCEDURES

Day 3	Day 4
<p>Prepare QA Blastocyst dishes at 8 am for continued embryo culture; dishes need a minimum of 4 h incubation to equilibrate.</p> <p>Prepare QA HEPES + HSA dishes for embryo assessment <u>or</u> directly assess in culture dishes under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> or within 2-3 minutes if done in an atmosphere of air.</p> <p>Assess embryos for cleavage; select embryos for ET, cryopreservation &amp;/or continued culture.</p> <p>Transfer embryos for continued culture into QA Blastocyst Medium in early afternoon</p>	<p>Embryo assessment optional.</p> <p>Prepare QA Blastocyst dishes in late afternoon for continued culture of embryos from D5 to D6 for cryopreservation.</p>
Day 5	Day 6
<p>Assess embryo morphology.</p> <p>Prepare HEPES + HSA or SPS for ET.</p> <p>ET &amp;/or cryopreserve blastocysts if sufficient quality or transfer to fresh QA Blastocyst dish that has been equilibrated overnight.</p>	<p>Assess embryo morphology.</p> <p>Prepare HEPES + HSA or SPS for ET.</p> <p>ET &amp;/or cryopreserve blastocysts if sufficient quality.</p>

Patrick Quinn, Rev 02, 17 Oct , 2008

## Quinn's Advantage Sequential IVF - Medien

### GEBRAUCH UND PROZEDERE EINER IVF MIT QA SEQUENTIAL IVF-MEDIEN

Benötigte Medien	Art-Nummer
QA Fertilization Medium	ART-1020 oder ART-1021
QA Cleavage Medium	ART-1026 oder ART-1027
QA Blastocyst Medium	ART-1029
QA Medium mit HEPES	ART-1023 oder ART-1024
Human Serum Albumin (HSA)	ART-3001 oder ART-3003
Serum Protein Substitute (SPS)	ART-3010 oder ART-3011

Tag -1	Tag 0
<p><b>= Tag vor Follikelpunktion</b></p> <p>Am späten Nachmittag Vorbereitung der QA Fertilization Medium (+ HSA/SPS) und QA Cleavage Medium (+ HSA/SPS) Kulturschalen für Tag 0.</p> <p>Siehe auch HSA / SPS - Tabelle</p>	<p><b>Follikelpunktion</b></p> <p>Vorbereitung des OCC Spül- und Aufbewahrungsbehälters mit „QA HEPES Medium“.</p> <p>Eizellgewinnung und eventuell mechanische Entfernung überflüssiger Kumuluszellen.</p> <p>Die Insemination der Eizellen erfolgt in Kulturschalen mit „QA Fertilization Medium + HSA“ und anschließend über Nacht inkubieren.</p> <p><i>Alternativ: Inkubation für 1-2 Std. in „QA Fertilization+ HSA“; anschließend Überführung der Eizellen in Kulturschalen mit „QA Cleavage Medium + SPS“.</i></p> <p>Nach der ICSI in „Medium w/HEPES + HSA/SPS“ werden die Eizellen direkt in Kulturschalen mit „QA Cleavage Medium + SPS“ gegeben.</p> <p>Am späten Nachmittag Vorbereitung Kulturschalen mit „QA Cleavage Medium + SPS“ für Tag 1.</p>

## Quinn's Advantage Sequential IVF - Medien

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

Tag 1	Tag 2
<p><b>Befruchtungsnachweis und evtl. PN-Stadien kryokonservieren</b></p> <p>„QA HEPES + HSA/SPS“ -Schalen vorbereiten um Befruchtung der Eizellen zu bestimmen.</p> <p><i>Alternativ kann man den Befruchtungsnachweis direkt in der Kulturschale durchführen.</i></p> <p>Nach Kontrolle werden die befruchteten Eizellen in die vom Vortag frisch equilibrierte Kulturschale mit „QA Cleavage Medium + SPS“ gegeben.</p> <p><i>Soll kryokonserviert werden?</i></p> <p>Überzählige, befruchtete Eizellen in „QA HEPES + HSA/SPS“ überführen und anschließend kryokonservieren (QA Embryo Freeze Kit ART-8014 / QA Thaw Kit ART-8016).</p>	<p><b>Embryotransfer (ET)</b></p> <p>Auswahl der Embryos für den Embryotransfer.</p> <p>Vorbereitung „HEPES + + HSA/SPS“ für den Embryotransfer.</p>
Tag 3	Tag 4
<p><b>Embryotransfer</b></p> <p>Auswahl der Embryos für den Embryotransfer.</p> <p>Vorbereitung „Medium w/HEPES + HSA oder SPS“ für den Embryotransfer.</p> <p><b>...oder Weiterkultivierung:</b></p> <p>Falls Embryos weiterkultiviert werden sollen, Vorbereitung der Kulturschalen mit „QA Blastocyst Medium + SPS“.</p> <p>Am frühen Nachmittag werden die Embryos zur Weiterkultivierung in die am Morgen vorbereitete Kulturschale mit „QA Blastocyst Medium + SPS“ gegeben.</p>	<p>Embryokontrolle freigestellt (Feststellung von früh Morula-Stadien).</p> <p>Am späten Nachmittag Kulturschalen mit „QA Blastocyst Medium + SPS“ für die Weiterkultivierung der Embryos von Tag 5 bis Tag 6 vorbereiten.</p>

## Quinn's Advantage Sequential IVF - Medien

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

Tag 5	Tag 6
<p>Morphologie des Embryos bestimmen (Feststellung von frühem Blastozysten- bzw. expandiertem Blastozysten-Stadium).</p> <p>Vorbereitung „Medium w/HEPES + HSA/SPS“ für den ET und/oder Kryokonservierung der Blastozysten falls die Qualität ausreichend ist oder in eine frische „QA Blastocyst + SPS“ -Schale überführen, die über Nacht im CO<sub>2</sub> Inkubator equilibriert wurde.</p>	<p>Morphologie des Embryos bestimmen.</p> <p>Vorbereitung „Medium w/HEPES + HSA oder SPS“ für den Embryotransfer <i>und/oder</i> Kryokonservierung der Blastozysten falls die Qualität ausreichend ist (QA Blastocyst Freeze Kit ART-8015 / QA Thaw Kit ART-8016).</p>

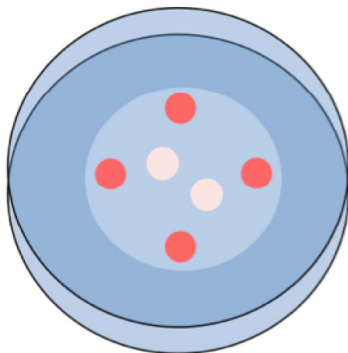
## Patrick Quinn

### IVF PROTOKOL FOR SINGLE EMBRYO CULTURE

1. With cumulus-free oocytes and embryos up to Day (D) 3, use 275-300 um diameter pipette tips to minimize medium transfer between drops; transfer volume should be < 1 uL.

#### **DAY -1**

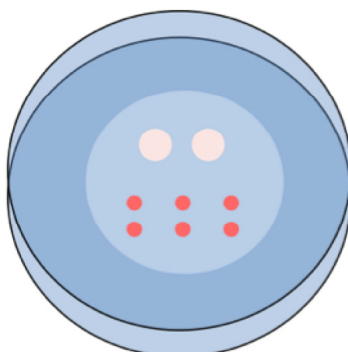
2. At ~ 4.00 pm on the day before ovum pickup (OPU), ie D-1, label 60 mm diameter Falcon Primaria dishes (Falcon # 353802; Fisher cat # 08-772-4C). An alternative dish is Falcon # 353002; Fisher cat # 08-772B. When making drops of medium, use a single-wrapped pipette tip, rinsing the tip twice with culture medium before making the drops.
3. **For IVF:** Place 6 x 30 uL drops of **QA Protein Plus Fertilization Medium** (Sage IVF Ref # ART-1520) into the dish. Four drops should be at the 3, 6, 9, and 12 o'clock positions (used for culture); the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> drops should be in the center of the dish (used for washing) – see diagram below.



● = 30 uL drops used for insemination.

● = 30 ul drops used for washing oocyte-cumulus complexes

4. Immediately cover the drops with 9 mL of oil (**Oil for Tissue Culture**, Sage IVF Ref # ART-4008) and place the dish in the CO<sub>2</sub> incubator.
5. **For ICSI:** Place 6 x 10 uL drops of **QA Protein Plus Cleavage Medium** (Sage Ref # ART-1526) in the dish and 2 x 30 uL drops for washing in the dish as indicated below.



● = 30 uL drops for washing oocytes

● = 10 uL drops for culture of individual oocytes after ICSI

## Patrick Quinn

### IVF PROTOKOL FOR SINGLE EMBRYO CULTURE

6. Immediately cover the drops with 9 mL of oil and place the dish in the CO<sub>2</sub> incubator.
7. Prepare no more than two dishes at a time to minimize out-gassing of CO<sub>2</sub> and a drift in the pH of the medium.
8. When placing the dishes in the incubator, gently remove the lid of the dish and set it at an angle on the side of the dish to allow for complete gas exchange. Dishes must gas for a minimum of 4 h before use (or overnight).

#### **DAY 0** (Day of oocyte retrieval or ovum pickup – OPU)

9. For IVF on D0 at ~ 4 pm: Prepare 60 mm diameter Falcon Primaria dishes as described in point 5 above for culture of fertilized oocytes in **QA Protein Plus Cleavage Medium** (Sage Ref # ART-1526).
10. **For both IVF and ICSI on D0 at ~ 4 pm or D1 at ~ 8am before fertilization check:** Prepare 60 mm diameter dishes with 9 x 10 uL drops of **HEPES-HTF + 5 mg/mL HSA** (HEPES+HSA: Sage Ref # ART-1023 and ART-3001, respectively). These can be prepared at ~ 4 pm on D0 and left at room temperature overnight, or prepared early on the morning of D1 and warmed in air to 37°C on a heating plate. In either case, warm the dishes to 37°C on the morning of D1 before use.
11. **For IVF on late on D0 or early on D1:** Prepare a wash dish using a Falcon organ culture dish. Use HEPES+HSA and place 1 mL of this medium in the center well and 2 mL in the moat.

**IVF PROTOKOL FOR SINGLE EMBRYO CULTURE****DAY 1** (Day of fertilization check)

12. Gently remove the cumulus cells by stripping in the insemination dish. Gently wash the stripped oocytes in the well of the organ culture wash dish. Washing entails picking up the oocyte 2-3 times and moving it around within the well. Then place fertilized oocytes in individual 10 uL drops in the HEPES+HSA dish. For ICSled oocytes, transfer fertilized oocytes to individual 10 uL drops of medium in the HEPES+HSA dish. Keep the dish containing the 10 uL drops of QA Protein Plus Cleavage Medium in which the ICSled oocytes were cultured overnight in the CO<sub>2</sub> incubator for their return after pronuclei scoring described in point 13 below and their continued culture up until D3.
  
13. Score the inseminated/ICSled fertilized oocytes under an inverted microscope for pronuclei and their alignment.
  
14. Place the fertilized oocytes individually into drops of **QA Protein Plus Cleavage Medium**, as described in point 5. Only place 6 embryos in each dish and handle one dish at a time to minimize increases in pH because of too long an exposure to air. Quickly return the culture dish to the incubator.
  
15. Follow the embryo scoring regime at the times listed on Form 020607-1 wherever possible.

## Patrick Quinn

### IVF PROTOKOL FOR SINGLE EMBRYO CULTURE

#### **DAY 3 to the Blastocyst stage**

16. On D3 before 8.30 am, label 60 mm Falcon Primaria dishes with the patient's name.
17. Prepare culture drops of **QA Protein Plus Blastocyst Medium** (Sage Ref # ART-1529) using the format described in point 5. These culture dishes must gas in the incubator for a minimum of 4 h before use.
18. **On D3 between 10.00 am and 2.00 pm after Blastocyst Medium dishes have equilibrated for at least 4 h:** For embryos that are to be cultured from D3 to D5/6, remove the embryos from the Cleavage Medium culture dishes and place in individual 10 µL drops of Blastocyst Medium in the Blastocyst Medium culture dish after washing the embryos through the 30 µL wash drops of Blastocyst Medium that are in the same dish. Only culture 6 embryos in a dish and handle one dish at a time.
19. **PLEASE NOTE:** There is anecdotal data that transferring cleaving embryos from Cleavage Medium to Blastocyst Medium on D2 **OR** D4 may result in better results than the more traditional medium exchange on D3. It is the responsibility of each individual laboratory to determine their own protocol for when this embryo exchange from Cleavage Medium to Blastocyst Medium should be undertaken. To reach this decision, it should be kept in mind that the optimal day of exchange may be patient dependent to some extent, i.e. some patients may do better if the exchange is on D2, others, if the exchange is on D3, and others again, if the exchange is on D4.

## Patrick Quinn

### IVF PROTOKOL FOR SINGLE EMBRYO CULTURE

#### **DAY 5**

20. **On morning of D5:** Score embryos for development to the blastocyst stage. For ET, select the best 2 embryos for ET. They should be at least grade 4AA (scoring by Gardner parameters – see Embryo Scoring Form 020607-1). Any blastocysts not transferred should be cryopreserved by vitrification.
21. Any embryo that has not formed a grade 3 or 4 blastocyst (ie fully expanded), should be cultured in a fresh drop of QA Protein Plus Blastocyst Medium and assessed on D6; if suitable on D6, it should be cryopreserved by vitrification. For these embryos, make up a fresh dish of Blastocyst medium on D5, as indicated in points 5 and 17 above and allow it to equilibrate in the CO<sub>2</sub> incubator for a minimum of 4 h before transferring embryos to it.

#### **REFERENCE**

Gardner DK Human embryonic development in vitro. In: In-vitro Maturation of Human Oocyte. Eds SL Tan, R-C Chian, WM Buckett. 2007 Taylor and Francis, Boca Raton, FL, Chapt 22.

© 2007 Patrick Quinn

All rights reserved. Printed in the United States of America

This publication may not be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in whole or in part, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of Patrick Quinn, 1867 Turnstone Road, Redmond, OR 97756.

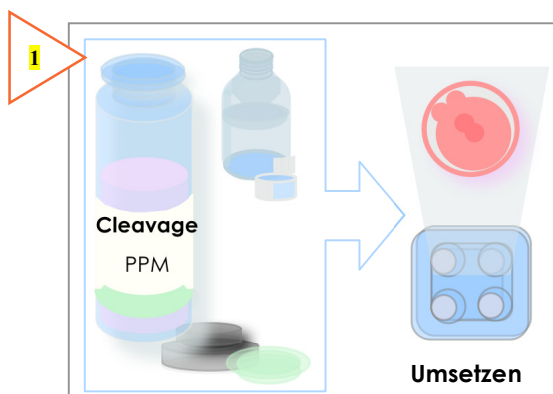
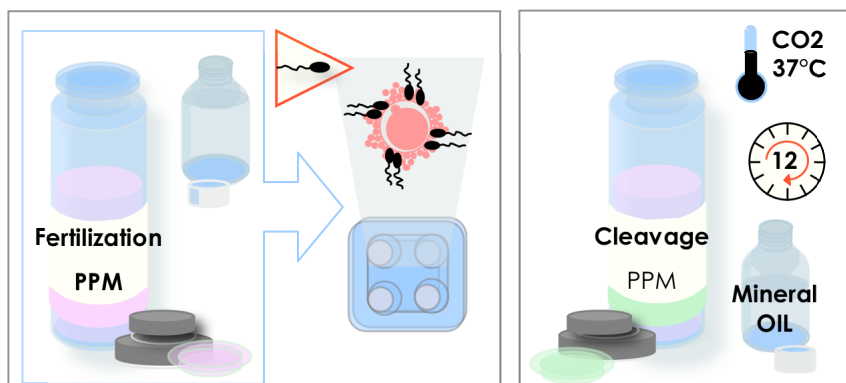
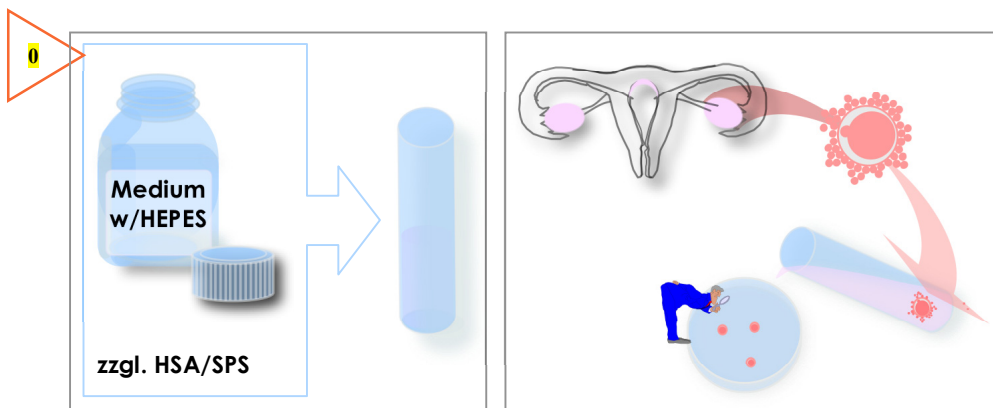
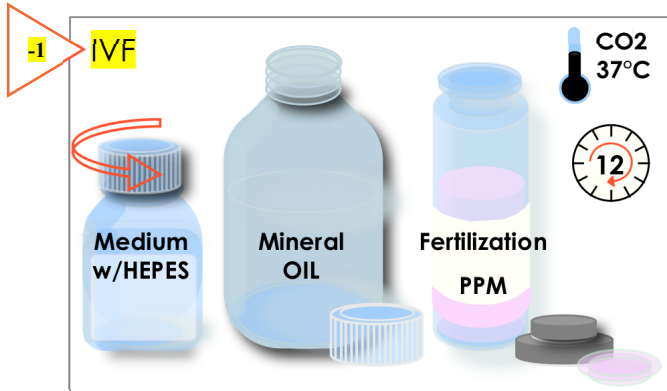
## Quinn's Advantage PROTEIN PLUS IVF - Medien

### MATERIALLISTE

<b>Benötigte SAGE – Medien (siehe auch Katalog Register Nr. 1)</b>	<b>Art-Nummer</b>
QA Fertilization (HTF) Protein Plus Medium	ART-1520
QA Cleavage Protein Plus Medium	ART-1526
QA Blastocyst Protein Plus Medium	ART-1529
QA Medium mit HEPES	ART-1023
Oil for Tissue Culture	ART-4008
PVP 7% - Ready for use	ART-4005-A
Hyaluronidase - Ready for use	ART-4007-A
Human Serum Albumin oder SPS	ART-3003 oder ART-3011
Quinn's Sperm Washing Medium	ART-1006
Dichtegradient PureCeption 40%	ART-2040
Dichtegradient PureCeption 80%	ART-2080
<b>Pipetten (The Pipette Company)</b>	siehe Katalog Register Nr. 4
ICSI-Injektionspipetten	LISR
ICSI-Halterpipetten	LHS
<b>Punktionsnadeln / Punktionsysteme (Laboratoire C.C.D.)</b>	siehe auch KB-Katalog Register Nr. 6
<b>Embryotransferkatheter (Laboratoire C.C.D.)</b>	

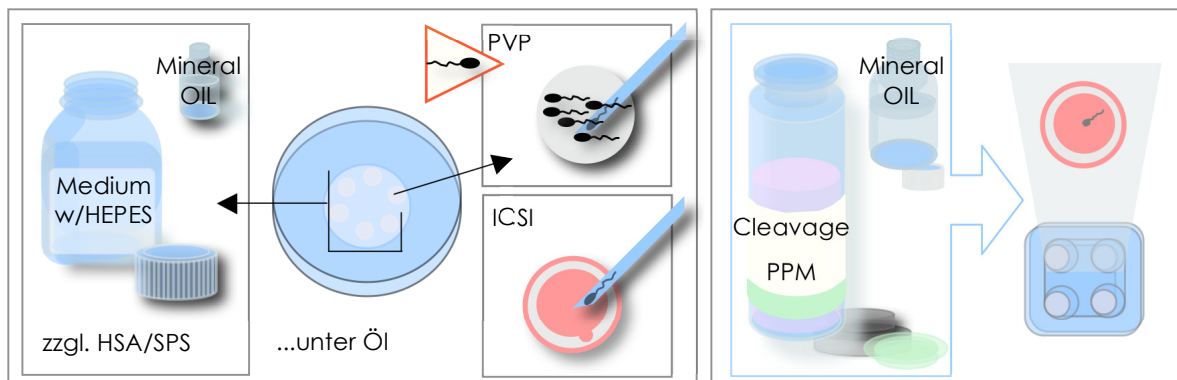
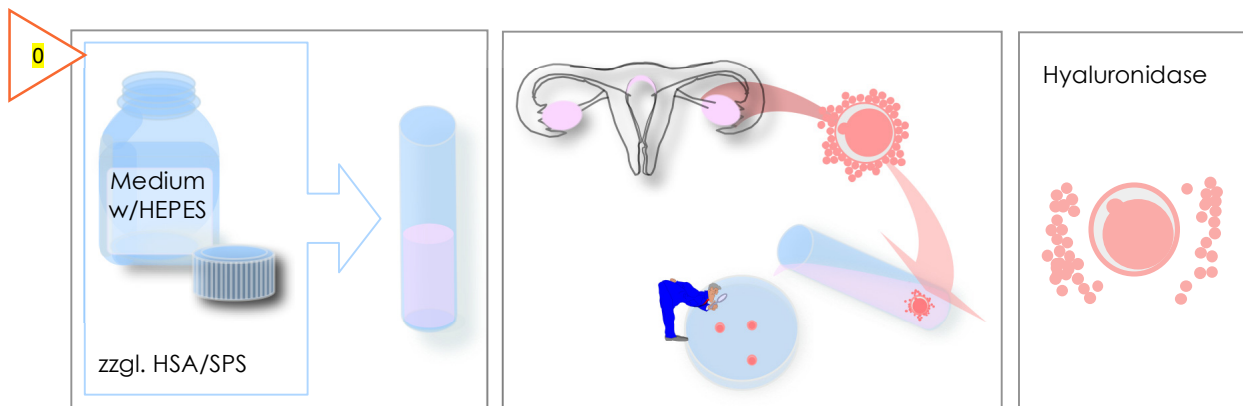
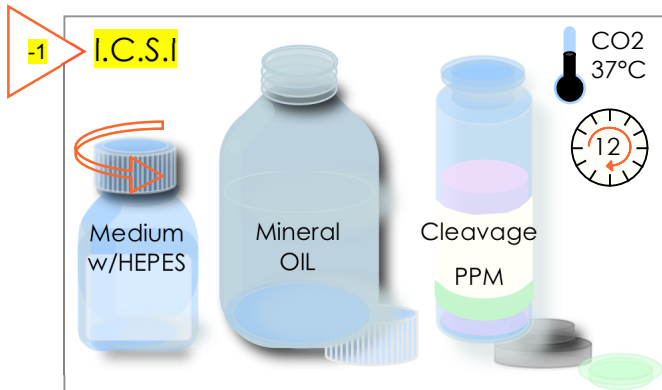
## QA Protein Plus Sequential IVF - Medien

### BILDBESCHREIBUNG ZUM MEDIUMGEBRAUCH UND PROZEDERE IM RAHMEN EINER IVF



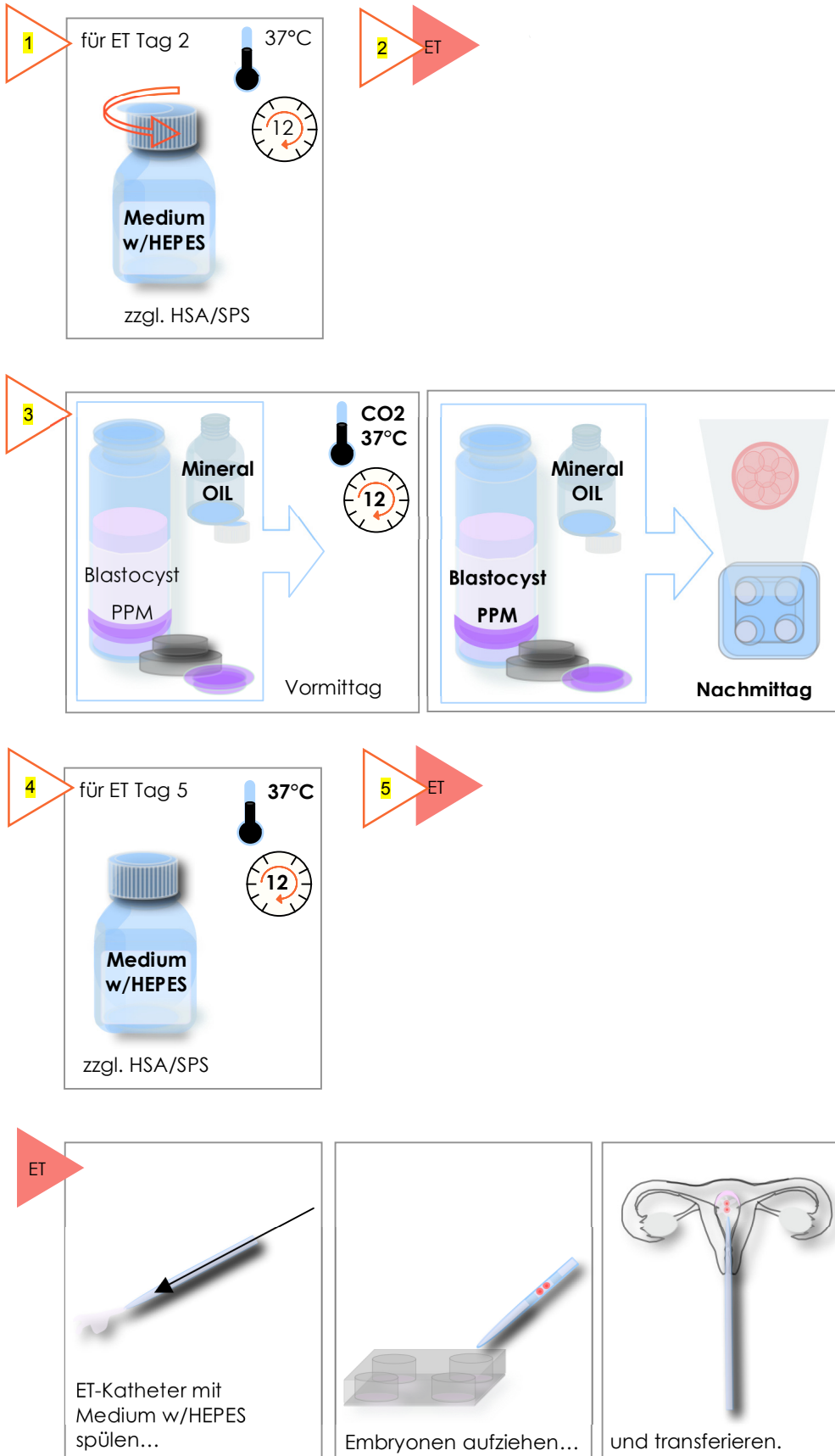
## QA Protein Plus Sequential IVF - Medien

BILDBESCHREIBUNG ZUM MEDIUMGEBRAUCH UND PROZEDERE IM RAHMEN EINER ICSI



## QA Protein Plus Sequential IVF - Medien

### BILDBESCHREIBUNG ZUM MEDIUMGEBRAUCH UND PROZEDERE IM RAHMEN EINER IVF / ICSI



## in-vitro Maturation Medium

### QUICK PROTOCOL FOR IVM-TREATMENT NACH RI-CHENG-CHIAN

Auf den folgenden Seiten haben wir mehrere Unterlagen für Sie erstellt, die Ihnen eine kleine Hilfe zur Durchführung einer IVM mit dem von Dr. Ri-Cheng CHIAN, MSc, Ph.D. entwickelten In-Vitro Maturationsmedium sein sollen. Unter anderem finden Sie das von Ri-Cheng Chian verfasste „Quick Protocol for IVM-Treatment“, eine Materialliste sowie eine Ablauf-Checkliste. Die Ablauf-Checkliste ist keine Gebrauchsempfehlung sondern eine von uns erstellte Kurzfassung des „Handbook on IVM treatment / CooperSurgical Inc.“ (siehe auch im Katalog unter Register Nr. 10).

KB Biosystem übernimmt keine Gewähr für etwaige Fehler in dieser Ablauf-Checkliste.

#### „Quick Protocol for IVM-Treatment“

Nach Dr. Ri-Cheng Chian:

1. Baseline scan for patients on Day 2 or 3  
(need blood test for FSH, LH, Progesterone and Estradiol); If the patients have no menstrual cycles or irregular, inducing menstrual bleeding by progesterone for 10 days.  
When the patients stopped the medication, the menstrual bleeding will start in three days.
2. Second ultrasound scan on Day 6-8 and schedule for Hcg injection.
3. Egg retrieval normally books on Day 10-14 after 36 h of Hcg injection.
4. Patients start to take Estrace (estradiol) on the day of egg retrieval (evening, 6-10 mg depending upon lining thickness).
5. Patients start to take Progesterone in the evening of day after egg retrieval (200 mg twice a day, a total of 400 mg).
6. The day of embryo transfer will be noticed by laboratory (normally on day 3 or 4 after egg retrieval).
7. All medications are carried on until pregnancy test, if positive continue for 13 weeks.



## in-vitro Maturation Medium

### MATERIALLISTE

#### Medikamente und Hormone für die Patientin:

3.000 mg Prometrium  
 50 mg Provera  
 10,000 IU Hcg (Profasi)- Injektion  
 400–660 mg „estradiol valerate“- Tablette (Estrace)  
 2.800 mg Prometrium  
 10.400 mg Prometrium

#### Medikamente und Hormone für das IVM Medium:

1 x Ampulle 75 IU FSH  
 1 x Ampulle 75 IU LH

Kulturschalen	Artikelbezeichnung	Menge
	10 ml Culture Tubes	1 x
	Test Tubes	2 x
	Cell Strainer 352350, 70 µm Nylon	1 x
	50 ml Flask	1 x
	Petrischale, Gewebekulturschale	1 x
	35 x 10 mm Petrischalen	4 x
	60 x 15 mm Petrischale	1 x
	30 x 10 mm Petrischale	1 x
	60 x 15 mm Organ Tissue Culture Dishes	3 x

SAGE – Medien	Artikelbezeichnung	Referenz
	In-Vitro Maturation Medium	ART-1600
	Medium w/HEPES	ART-1024
	HSA	ART-3003
	Öl	ART-4008
	Hyaluronidase	ART-4007-A
	PVP	ART-4005-A
	PureCeption Dichtegradient 80%	ART-2080
	PureCeption Dichtegradient 40%	ART-2040
	Quinn's Sperm washing Medium	ART-1006
	Oocyte Freezing Medium	ART-8017
	Oocyte Thawing Medium	ART-8018

## in-vitro Maturation Medium

### ABLAUF – CHECKLISTE

<b>ABKÜRZUNGEN</b>	ZT	= Zyklus Tag
	T	= Tag
	OWM	= Oocyte Washing Medium
	OMM	= Oocyte Maturation Medium
	EMM	= Embryo Maintenance Medium
	FT	= Falcon Tube
	CS	= Cell Strainer
	SWM	= Sperm Washing Medium
	GV	= Germinal Vesicle
	1PB	= 1 Polar Body
	GVBD	= Germinal Vesicle breakdown
	M-I	= Metaphase – I
	M-II	= Metaphase – II

Patientin
  Labor
  Ehemann
 Farblichen Kennzeichnungen zeigen an, wenn der Abschnitt betrifft.

ZYKLUS	AUFGABE	MATERIAL
BEACHTEN	Bei Patientin mit unregelmäßigem Zyklus Induktion der Blutung mit Progesteron. Die Blutung erfolgt 3 Tage nach Beendigung der Medikamentengabe.	10 Tage lang 1 x tgl. 300 mg Progesteron
ZT 2-3	Ultraschall 1 Anzahl und Größe der Follikel festhalten	
ZT 6-9	Ultraschall 2 Tag für Hcg-Injektion festlegen Endometrium anschauen, Entwicklung der Follikel kontrollieren und Festsetzung der Hcg-Injektion: das Endometrium sollte hierfür nicht dünner als 6 mm sein!	
ZT 8-12	Hcg spritzen Wenn maximale Größe des dominanten Follikel einen Durchmesser von 14 mm erreicht Hcg spritzen!	10,000 IU Hcg
ZT 10-14	Punktion Tag der Punktion = Tag der Hcg-Spritze + 36 Std.	Siehe Punktion

## in-vitro Maturation Medium

### ABLAUF – CHECKLISTE

TAG -1	AUFGABE	MATERIAL
Für die Punktion vorbereiten	Medium w/HEPES über Nacht – gut verschlossen - warm stellen (37°C).	Medium w/HEPES
OMM vorbereiten:	OMM wie folgt vorbereiten und über Nacht in den Inkubator (5% CO <sub>2</sub> / 37°C) stellen:	
1. Schritt	<u>Röhrchen A</u> 10 ml OMM plus 1 Ampulle 75 IU FSH plus 1 Ampulle 75 IU LH	10 ml Falcon Tube OMM FSH und LH
2. Schritt	<u>Röhrchen B</u> 9.9 ml OMM plus 100 µl aus Röhrchen A (OMM+FSH+LH)	10 ml Falcon Tube
3. Schritt	<u>3 Gewebe-Kultur-Schalen</u> mit Medium aus Röhrchen B wie folgt füllen: Innen 1 ml, Außen 2 ml	3x Center well: Falcon 60 x15
TAG 0	AUFGABE	MATERIAL
Samenspende	Möglich falls reife Eizellen im Punktat sind!	
2 Std. vor Punktion OWM vorbereiten	3 Schalen mit je 2 – 2,5 ml OWM unter Öl vorbereiten und warm stellen (37°C).	3 Falcon 30x10 mm 2,0-2,5 ml OWM
OWM für Cell Strainer	Für das Arbeiten mit dem Cell Strainer 25 - 30 ml OWM im fest verschlossenen Behälter warm stellen (37°C).	Falcon 50 ml 25-30 ml OWM
Für Punktat vorbereiten	FT mit je 2-3 ml equilibriertem Medium w/HEPES füllen.	FT 10 ml Medium w/HEPES
Punktion	Aspirationsdruck bei 7.5 – 8.0 kPa (85-100 mmHG). Alle sichtbaren Follikel aspirieren und in den vorab vorbereiteten FT sammeln.	IVM-Nadel: 20 g / 30 cm
Medikamente	Tägliche Einnahme von 6-10 ml Estradiol (abends). Bei einer Dicke des Endometriums von ≥ 6,0 mm erfolgt die Einnahme täglich bis zum SST nach ET.	Estradiol valerate Tabletten

## in-vitro Maturation Medium

### ABLAUF – CHECKLISTE

TAG 0	AUFGABE	MATERIAL
Cell Strainer	<p>Punktat durch den CS gießen und CS in eine Petrischale mit 3 bis 5 ml OWM stellen.</p> <p>Die im CS enthaltenen OCC's mit Hilfe einer Pipette aspirieren und in die bereits vorbereiteten Petrischalen OWM unter Öl geben und unter das Mikroskop stellen.</p>	<p>Cell Strainer</p> <p>Falcon 60x15 mm</p> <p>OWM</p>
Bestimmung der Eizellen	<p>OCC's sliding:</p> <p>Erkennung GV, 1PB, M-I, M-II</p>	Mikroskop
Reife Eizellen (M-II) befruchten	Insemination durch ICSI.	
Unreife Eizellen Waschen	Mit Hilfe einer sterilen Pasteur Pipette werden die OCC's in vorab vorbereitetes OWM transferiert und 2-3 x gewaschen.	<p>Falcon 30x10 mm</p> <p>Pasteur Pipette</p> <p>OWM</p>
Unreife Eizellen in Kultur setzen	OCC's (max. 10 / Schale) in OMM transferieren und in den Inkubator (5% CO <sub>2</sub> / 37°C) stellen.	
1 Std. vor ICSI: EMM und OWM vorbereiten	<p>20 µl Tropfen EMM unter Öl in einer Petrischale und OWM für die ICSI-Mikrotropfen vorbereiten und in den Inkubator (5% CO<sub>2</sub> / 37°C) stellen.</p> <p>OWM fest verschließen!</p>	<p>Falcon 35x10 mm</p> <p>EMM und OWM</p> <p>Öl</p>
Insemination reifer Eizellen (M-II)	Reife Eizellen durch ICSI inseminieren. ICSI in OWM durchführen, anschließend die Eizellen einzeln in die vorab vorbereitete Schale mit den EMM-Mikrotropfen unter Öl geben und in den Inkubator (5% CO <sub>2</sub> / 37°C) stellen.	<p>PureCeption 40 %</p> <p>PureCeption 80 %</p> <p>Sperm Washing</p> <p>M. PVP</p> <p>ICSI-Pipetten</p>
BEACHTEN	Restliche Spermien nicht verwerfen!	
Für Tag 1: EMM vorbereiten	20 µl Tropfen EMM unter Öl in eine Petrischale geben in den Inkubator (5% CO <sub>2</sub> / 37°C) stellen.	<p>Falcon 35x10 mm</p> <p>EMM</p> <p>Öl</p>

## in-vitro Maturation Medium

### ABLAUF – CHECKLISTE

TAG 1	AUFGABE	MATERIAL
Samenspende	...falls nicht schon am Vortag erfolgt ist.	
Medikamente	3x tgl. 200 mg intra-vaginal Progesteron oder Progesteron-Injektion bis zum SST	200 mg intra vaginal Progesteron
1 Std. vor ICSI OVM vorbereiten	OWM für die ICSI-Mikrotropfen bei 37°C warm stellen. Dies kann auch am Nachmittag des Vortages erfolgen, spätestens aber 1 Stunde vor ICSI!	
Kumuluszellen entfernen	COC's 1 Minute in Hyaluronidase setzen und mit einer feinen Glaspipette ein und aus pipettieren, um sie von den Kumuluszellen zu befreien	Feine Glaspipette Hyaluronidase
ICSI	Samenspende	Spermien
Reife Eizellen (M-II) inseminieren	Reife Eizellen durch ICSI inseminieren. ICSI in OVM durchführen, anschließend die Eizellen einzeln in die Schalen mit den EMM-Mikrotropfen unter Öl geben und in den Inkubator (5% CO <sub>2</sub> / 37°C) stellen. Die restlichen Spermien NICHT verwerfen!	PureCeption 40 % PureCeption 80 % Sperm Wash Med. PVP ICSI-Pipetten
Unreife Eizellen (GV/M-I) umsetzen	Unreife Eizellen in frisches OMM umsetzen und in den Inkubator (5% CO <sub>2</sub> / 37°C) stellen.	
Kontrolle und Umsetzung der Eizellen	Eizellen (2PN) kontrollieren, in frische OMM-Mikrotropfen unter Öl umsetzen und in den Inkubator (5% CO <sub>2</sub> / 37°C) stellen.	Petrischale OMM Öl
Für T 2 EMM vorbereiten	20 µl Tropfen EMM unter Öl in eine Petrischale geben und in den Inkubator (5% CO <sub>2</sub> / 37°C) stellen.	Falcon (35x10) EMM und OWM Öl

## in-vitro Maturation Medium

### ABLAUF – CHECKLISTE

TAG 2	AUFGABE	MATERIAL
Embryotransfer	Ultraschallkontrolle: Endometrium sollte mindestens $\geq 7,0$ mm sein!	
BEACHTEN	Hormonelle Unterstützung bis zum SST. Ist dieser positiv dann weitere 13 Wochen.	Estradiol Progesteron
1 Std. vor ICSI: OWM vorbereiten	OWM-Mikrotropfen für ICSI vorbereiten und bei 37°C warm stellen. Dies kann auch am Nachmittag des Vortages erfolgen spätestens aber 1 Stunde vor ICSI!	OWM
Reife Eizellen (M-II) inseminieren	Reife Eizellen durch ICSI inseminieren. ICSI in OWM durchführen, anschließend die Eizellen einzeln in die Schalen mit den EMM-Mikrotropfen unter Öl geben und in den Inkubator (5% CO <sub>2</sub> / 37°C) stellen.	PureCeption Sperm Wash Med. PVP ICSI-Pipetten
Kontrolle und Umsetzung der Eizellen	Eizellen (2PN) kontrollieren, in frische OMM-Mikrotropfen unter Öl umsetzen und in den Inkubator (5% CO <sub>2</sub> / 37°C) stellen.	Petrischale OMM Öl



## in-vitro Maturation Medium

### ABLAUF – CHECKLISTE

TAG 3	AUFGABE	MATERIAL
Embryotransfer	Ultraschallkontrolle: Das Endometrium sollte mindestens $\geq 7,0$ mm dick sein!	
BEACHTEN	Hormonelle Unterstützung bis zum SST. Ist dieser positiv dann weitere 13 Wochen.	Estradiol, Progesteron
Ultraschall Endometrium	Transvaginale Ultraschall-Untersuchung: Das Endometrium sollte mindestens $\geq 7,0$ mm dick sein! Ist das Endometrium $< 7,0$ mm, sollten die Eizellen kryokonserviert werden und der Embryotransfer im folgenden Zyklus erfolgen.	
OWM für ET	1 Std. vor dem Transfer OWM auf $37^{\circ}\text{C}$ erwärmen.	OWM
Katheter mit Embryonen beladen	ET-Katheter mit OWM spülen und mit den Embryonen beladen, dabei aber nicht mehr als $10\ \mu\text{l}$ Medium mit den Embryonen aufziehen: Katheter Ende $\rightarrow$ Spitze: Medium $\rightarrow$ 1 cm Luft $\rightarrow$ $10\ \mu\text{l}$ Medium mit Embryonen $\rightarrow$ 1 cm Luft	ET-Katheter
Embryotransfer		
EMPFEHLUNG	Um ein Abkühlen des biologischen Materials zu verhindern wird das Arbeiten auf einer Wärmeplatte oder warmen Unterlage empfohlen.	

## Spermienaufbereitung

### AUFARBEITUNGSEMPFEHLUNG MIT PURECEPTION UND QA SPERM WASHING MEDIUM

#### Materialliste

BENÖTIGTE SAGE - MEDIEN	ART-NUMMER
PureCeption 80% (PC 80%)	ART-2080
PureCeption 40% (PC 40%)	ART-2040
Quinn's Sperm Washing Medium (SWM)	ART-1006

#### SONSTIGE

15 ml steriles Einmal-Zentrifugenröhrchen

Sterile 5 ml Pipettierhilfe od. 3 ccm Spritzen mit 1.5"/21g Nadeln

Zentrifuge (mit 250-750g für 30 Minuten)

#### BEACHTEN

Alle Bestandteile des Kits sowie die aufzuarbeitenden Samenproben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt werden. So vermeidet man einen Kälteschock der Spermien.

Um eine Veränderung des pH-Wertes zu vermeiden, darf PureCeption nur fest verschlossen in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt werden!

PureCeption weist eine natürliche Trübung auf und sollte normal opalisierend erscheinen. Verwenden Sie keine Lösungen die extreme Trübungen oder Verfärbungen aufweisen.

Kleinere Akkumulate und sichtbare Partikel die an der Phasengrenze entstehen sind Bestandteil des PureCeption-Systems.

Verwenden Sie den Gradienten innerhalb einer Stunde nach Herstellung. Andernfalls besteht die Möglichkeit, dass sich die beiden Phasen miteinander vermischen und die scharfe Phasengrenze verloren geht!

#### Gebrauchsempfehlung für eine frische Spermienprobe

1. Geben Sie 2,0 ml PC 80% in das Zentrifugenröhrchen
2. Diese Schicht wird nun mit 2,0 ml PC 40% überschichtet: hierfür setzen Sie die Spitze der Pipette oder Spritze vorsichtig auf die Oberfläche des PC 80% und führen diese bei Zugabe des PC 40% an der Gefäßwand langsam nach oben. An der Grenze der beiden Schichten muss ein deutlicher Phasenübergang erkennbar sein.

## Spermienaufbereitung

### AUFARBEITUNGSEMPFEHLUNG MIT PURECEPTION UND QA SPERM WASHING MEDIUM

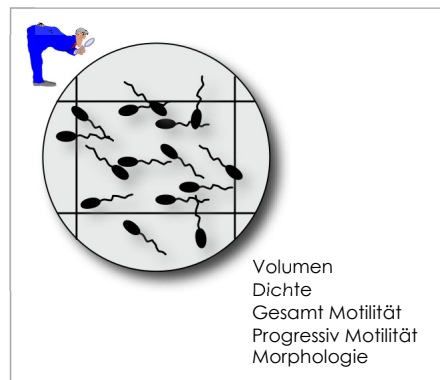
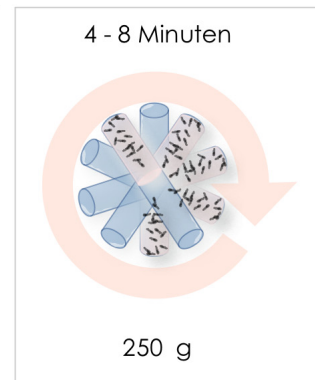
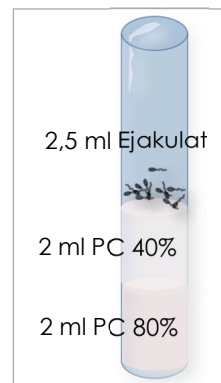
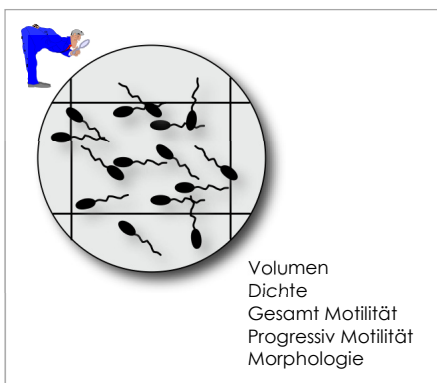
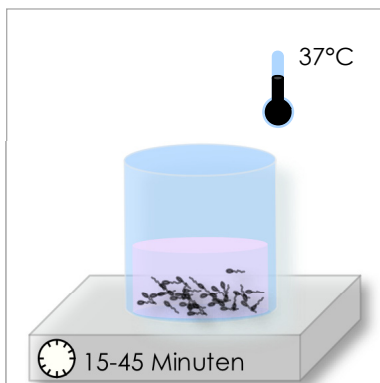
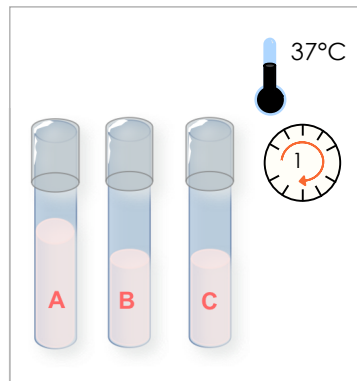
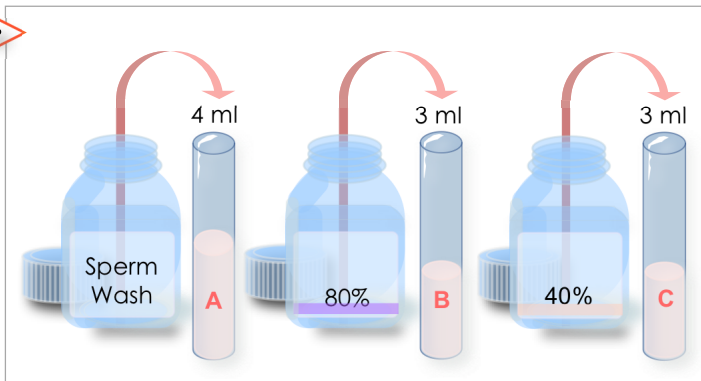
3. Platzieren Sie vorsichtig bis zu 2,5 ml verflüssigte Spermien auf die Oberfläche des PC 40% mittels einer Pipette oder Spritze.
4. Zentrifugieren Sie für 20 Minuten bei 350-400 g (oder bis zu 750 g bei hochviskosen Proben).
5. Nach der ersten Zentrifugation kann es vorkommen, dass das Pellet nicht zu erkennen ist, trotzdem ist es wichtig, die Prozedur weiterzuführen.
6. Nach der Zentrifugation entfernen Sie die Gradienten bis auf die unterste Schicht (von ca. 0,3 ml).
7. Fügen Sie 2 bis 3 ml SWM hinzu und resuspendieren es mit dem Pellet.
8. Zentrifugieren Sie die Lösung für 4 bis 8 Minuten bei 250 g. Für eine möglichst vollständige Sedimentation der gewaschenen Spermien empfiehlt sich die Zentrifugation für 8 Minuten.
9. Verwerfen Sie den Überstand und resuspendieren Sie das Pellet mit 0,5 ml SWM.

### Gebrauchsempfehlung für eine gefrorene Spermienprobe

1. Geben Sie 2,0 ml PC 80% in das Zentrifugenröhrchen
2. Diese Schicht wird mit 1,5 ml PC 40% überschichtet: hierfür setzen Sie die Spitze der Pipette oder Spritze vorsichtig auf die Oberfläche des PC 80% und führen diese bei Zugabe des PC 40% an der Gefäßwand langsam nach oben. An der Grenze der beiden Schichten muss ein deutlicher Phasenübergang erkennbar sein.
3. Platzieren Sie vorsichtig die aufgetauten Spermien auf die Oberfläche des PC 40% mittels einer Pipette oder Spritze.
4. Zentrifugieren Sie für 20 Minuten bei 350-400 g (oder bis zu 750 g bei hochviskosen Proben).
5. Nach der ersten Zentrifugation kann es vorkommen, dass das Pellet nicht zu erkennen ist, trotzdem ist es wichtig, die Prozedur weiterzuführen.
6. Nach der Zentrifugation entfernen Sie die Gradienten bis auf die unterste Schicht (von ca. 0,5 ml).
7. Fügen Sie 2 bis 3 ml SWM hinzu und resuspendieren es mit dem Pellet.
8. Zentrifugieren Sie die Lösung für 8 Minuten bei 250 g.
9. Verwerfen Sie den Überstand und resuspendieren Sie das Pellet mit 0,5 ml SWM.

# Spermienaufbereitung

## BILDBESCHREIBUNG MIT PURECEPTION UND QA SPERM WASHING MEDIUM



## Spermienaufbereitung

MIT PURECEPTION UND QA SPERM WASHING MEDIUM

### Fehlersuche und Behebung

Gelegentlich verflüssigen sich die Proben nicht vollständig und haben eine zu hohe Viskosität, so dass die Spermien den Gradienten nicht durchschwimmen können. In diesem Fall können Sie die Zentrifugationskraft bis zu 750g erhöhen (auf keinen Fall höher).

Die Resuspension des Pellets motiler Spermien, bei hochviskosen Samenproben ist, unter Verwendung des PureCeption-Systems, in der Regel kein Problem!

Wenn die prozentuale Beweglichkeit oder Motilität der Spermien unter den angegebenen Werten der WHO liegt können Sie die Mängel der ersten Samenanalyse ausgleichen, indem Sie anstatt 2 ml je 1 ml PureCeption 40- und 80% nehmen. Es ist ebenso möglich, nach der Zentrifugation die restlichen 0,5 bis 0,7 ml Lower-Phase über dem Pellet zu belassen und nicht zu verwerfen und die Spermien, die hier in der Lower-Phase hängen geblieben sind, zu waschen. Falls sie diesen Weg der Kompensation wählen, verdoppeln Sie zum Waschen das Volumen an „Sperm Washing Medium“, um die Reste der PureCeption Lower-Phase zu entfernen.

Der wichtigste Parameter für ein Pellet hochmotiler Spermien ist die Spermienbeweglichkeit. Je höher die Anzahl beweglicher Spermien, desto höher ist die Zahl der Spermien im Pellet!



## PVP

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

ART.-NR.	VE	PROTEIN	LIEFERBAR
ART-4005-A	6 x 0,5 ml	HSA	24 Std / 48 Std

1. Vor Gebrauch das PVP erwärmen (37°C). Um pH-Werte von 7,0 oder weniger zu vermeiden, sollte das PVP im CO<sub>2</sub>-Inkubator gut verschlossen sein.
2. Die aufgearbeitete Samenprobe kann zu 1 bis 2 x 10<sup>6</sup> bewegliche Spermien in 0,5 bis 1,0 ml Quinn's Sperm Washing Medium verflüssigt werden. Diese Probe wird bei hoher Umdrehung direkt vor Gebrauch zentrifugiert (ca. 1800 g für 5 Minuten).
3. Das Spermienpellet wird im selben Überstand im Röhrchen resuspendiert.
4. Die Vorbereitung der Spermien für die ICSI erfolgt durch die Zugabe von 1-2 µl Spermisuspension in 5-10 µl PVP-Tropfen unter Öl, dies erfolgt in der für die ICSI verwendeten Petrischale.
5. Die eingesetzten Volumina der Spermisuspension sowie der PVP-Lösung können verändert werden, um eine optimale Spermiedichte für die ICSI zu erhalten.
6. Platzieren Sie vorsichtig die aufgetauten Spermien auf die Oberfläche des „PureCeption 40%“ mittels einer Pipette oder Spritze.

**LAGERUNG**      Verschlossene Medienflaschen müssen bei 2°C - 8°C gelagert werden. Das Produkt darf nicht eingefroren oder Temperaturen über 39°C ausgesetzt werden. Siehe auch Seite 1 und 2 „Allgemeine Produkthinweise“.



## Hyaluronidase

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

ART.-NR.	VE	PROTEIN	LIEFERBAR
ART-4007-A	6 x 1 ml	HSA	24 Std / 48 Std

### Materialliste

SAGE - MEDIEN	ART-NUMMER
Hyaluronidase	ART-4007-A
Medium mit HEPES	ART-1023
Oil for Tissue Culture	ART-4008

### SONSTIGE

Sterile Pipettierhilfe  
Denudationspipetten

1. Vor Gebrauch im Inkubator auf 37°C erwärmen. Um pH-Werte von 7,0 oder weniger zu vermeiden, sollte die Hayluronidase im CO<sub>2</sub>-Inkubator gut verschlossen sein.
2. Der Oozyten-Kumulus-Komplex (OCC) kann in einem Hyaluronidase-Tropfen (100 µl) unter Öl platziert werden.
3. Nach 30-45 Sekunden werden die Oozyten-Kumulus-Komplexe mit einer feinen Glaspipette eingesaugt und ausgestoßen. Die Oozyte wird so von den geschwächten Kumuluszellen befreit und trägt lediglich noch die Korona-Radiata-Zellen.
4. Die Oozyte wird nun in einen 100 µl-Tropfen HEPES-HTF-Medium, welches 5 mg/ml HSA enthält, überführt.
5. Mit einer neuen Pipette werden die Korona-Radiata-Zellen durch sanftes Auf- und Abpipettieren entfernt. Der Innendurchmesser der ersten Pipette sollte hierfür zwischen 250 und 300 µm liegen und der zweiten Pipette bei ca. 135 µm.
6. Die gereinigten Oozyten werden nun in einer Reihe von 4-5 100 µl-Tropfen HEPES-HTF-Medium welches 5 mg/ml HSA enthält, gewaschen; so wird überschüssige Hyaluronidase entfernt.
7. Die Oozyten sind nun fertig für die ICSI-Prozedur.

Das ungeöffnete Produkt muss bei -20°C lagern. Nach dem Auftauen nicht wieder einfrieren oder Temperaturen über 39°C aussetzen. Auftaute, unverbrauchte Hyaluronidase kann 4 Wochen bei 2° bis 8°C gelagert werden.

## Oocyte Freezing Medium

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

ART.-NR.	VE	PROTEIN	PROZEDUREN	LIEFERBAR
ART-8017	10 ml	HSA	1	24 Std / 48 Std

Folgende Prozedur wird nur für reife Eizellen ab dem ersten Polarkörper empfohlen:

1. Die Eizellen werden nach der Punktion von den Kumuluszellen durch Standardverfahren entfernt.
2. Geben Sie die Eizellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur (20-24°C) in 1-2 ml Oocyte Freezing Medium (ART-8017). Es wird empfohlen, das Medium während des Gebrauchs mit „Oil for Tissue Culture“ zu bedecken, um ein Verdunsten von Wasser und eine daraus resultierende Veränderung der Osmolarität des Mediums zu minimieren.
3. Laden Sie 1-3 Eizellen in einen Kryo-Behälter (Vial oder Straw), welcher ungefähr 0,25 bis 1,0 ml Oocyte Freezing Medium enthält, je nach Größe des Kryo-Behälters.

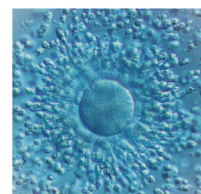
### EINFRIER-PROTOKOLL

1. Der Kryo-Behälter wird von Raumtemperatur auf -7°C mit 2°C/min abgekühlt.
2. Bei dieser Temperatur für 5 Min. halten, manuelles Seeding und bei dann bei dieser Temperatur für weitere 10 Minuten halten.
3. Die Eizellen werden dann mit etwa 0,3°C/min auf -35°C abgekühlt und dann in einen Aufbewahrungsbehälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

### LAGERUNG FÜR OOCYTE FREEZING UND THAWING MEDIUM

Verschlossene Medienflaschen müssen bei 2-8°C gelagert werden. Erwärmen Sie das Produkt vor dem Gebrauch entsprechend auf Raumtemperatur (22 - 24°C) oder Inkubator-Temperatur (37°C). Das Produkt darf nicht eingefroren oder Temperaturen über 39°C ausgesetzt werden.

Siehe auch „Allgemeine Produkthinweise“ Seite 1 und 2.



## Oocyte Thawing Medium

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

ART.-NR.	KIT	BESTEHEND AUS	ML	PROZEDUREN
ART-8018	ART-8018-A	Oocyte Thawing (0,5M Saccharose)	4 x 2	
	ART-8018-B	Oocyte Thawing (0,2M Saccharose)	4 x 2	4 / Kit
	ART-8018-C	Oocyte Wash Medium HTF w/HEPES	4 x 4	

1. Falls die Eizellen in Straws eingefroren wurden, sollten sie zügig aufgetaut werden (mindestens 275°C/min). Die einfachste Methode hierzu ist, den Straw für 30-40 Sekunden in Raumluft zu halten und anschließend in ein 30-35°C warmes Wasserbad zu legen, bis das Eis vollständig geschmolzen ist. Vials werden durch Eintauchen in ein 32°C warmes Wasserbad aufgetaut, bis alle Eiskristalle verschwunden sind. Tauen Sie jeweils nur einen Kryo-Behälter auf!
2. Überführen Sie die verflüssigte Lösung des aufgetauten Mediums auf eine trockene Schale und lokalisieren sie zügig die Eizellen.
3. Nehmen Sie die Eizellen mit möglichst wenig Flüssigkeit auf und legen Sie diese erst für 10 Minuten bei Raumtemperatur (22-24°C) in 1-2 ml Oocyte Thawing Medium 0.5 M Saccharose (ART-8018-A) und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 1-2 ml Oocyte Thawing Medium 0.2 M Saccharose (ART-8018-B). Verwenden Sie für jede Prozedur eine neue Transferpipette, um ein Übertragen des Kryokonservierungsmediums von einer Lösung in die nächste zu minimieren.
4. Es wird empfohlen das Medium während des Gebrauchs mit „Oil for Tissue Culture“ (ART-4008) zu bedecken, um eine Verdunstung von Wasser und eine daraus folgende Veränderung der Osmolarität dieses Mediums zu vermeiden.
5. Die Eizellen werden dann in 2 Kulturschalen mit 1-2 ml Oocyte Washing (ART-8018-C) bei 37°C gewaschen. Hierzu werden die Eizellen in jede Lösung 5 Minuten lang eingetaucht und für ca. 1 Minute auf- und abpipettiert. Für den ersten Waschvorgang sollten Sie eine neue Transferpipette verwenden. Für folgende Transfers kann jedoch die gleiche Transferpipette wieder verwendet werden.
6. Nach dem zweiten Waschvorgang werden die Eizellen in 3x30 µL Tropfen „Quinn's Advantage Fertilization Medium“ (ART-1020) gespült. Das Medium sollte mit 5 mg/ml Human Serum Albumin (ART-3001) angereichert sein, unter Öl, „Oil for Tissue Culture“ (ART-4008), und für mindestens 4 Stunden, noch besser über Nacht, in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 90% N<sub>2</sub> gestanden haben.
7. Die Eizellen zum Schluss in einen frischen Tropfen des equilibrierten Mediums umsetzen und für 3-4 Stunden inkubieren. Die Eizellen können dann zur ICSI. freigegeben werden.

## Embryo Freeze - Kit

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

ART.-NR.	KIT BESTEHEND AUS:	ML	Protein HSA	Prozeduren 10 / Kit	Lieferbar 24 Std / 48 Std
ART-8014	ART-8001-12	1.5 M Propandiol, 0.1 M Sucrose Freezing Medium mit 12 mg/ml HSA			
	ART-8003-12	1.5 M Propandiol Freezing Medium mit 12 mg/ml HSA			
	ART-8013-12	Diluent: HTF w/HEPES mit 12 mg/ml HSA			

Stellen Sie immer sicher, dass die Embryonen gut mit dem Gefrierpuffer vermischt sind. Aus diesem Grunde empfiehlt es sich, die Eizellen, nachdem sie in die Gefrierpuffer-Lösung gesetzt wurden, mehrmals ein- und auszupipettieren. Es empfiehlt sich auch unter Öl zu arbeiten, um das Verdampfen der Flüssigkeiten und einer damit einhergehenden Änderung der Osmolarität der Lösungen zu vermeiden.

1. 0.5 M und 1.0 M PPD-Lösungen werden durch Verdünnung der 1.5 M PPD-Stammlösung mit dem Verdünnungsmittel wie folgt hergestellt:
  - 0.5 M PPD-Lösung: 0,3 ml 1.5 M PPD-Lösung + 0,6 ml Verdünnungsmittel
  - 1.0 M PPD-Lösung: 0,6 ml 1.5 M PPD-Lösung + 0,3 ml Verdünnungsmittel
2. Bei 37°C werden die Embryonen in die Lösungen wie folgt pipettiert:
  - 5 Minuten in 1 ml 0.5 M PPD-Lösung
  - 10 Minuten in 1 ml 1.5 M PPD-Lösung
3. Anschließend werden die Embryonen in 1 ml des 1.5M PPD, 0.1 M Sucrose Freezing Medium umgesetzt und in Straws bzw. Kryo-Röhrchen aufgezogen, die ebenfalls dieses Medium beinhalten. Die Embryonen müssen vor dem Einfrieren für 5 Minuten bei 37°C in dem 1.5 M PPD, 0.1 M Sucrose-Medium verweilen.

*Alternativ* können die Embryonen 10 Minuten direkt in die 1.5M PPD-Lösung gegeben werden, bevor sie in das 1.5 M PPD, 0.1 M Sucrose-Medium transferiert werden.

## Embryo Freeze - Kit

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

#### EINFRIER-PROTOKOLL

Die Embryonen werden in der Regel in Straws eingefroren, allerdings kann man hierfür auch 1,2 ml Kryo-Röhrchen nehmen.

5. Die Embryonen werden langsam mit 2°C/Min von 37°C (=Ausgangstemperatur) auf -6°C heruntergekühlt.
6. Die Embryonen nun für 10 bis 15 Minuten konstant bei -6°C (autoseeding) halten und anschließend mit 0,3°C/Min auf ca. -35°C einfrieren.
7. Zur Lagerung werden sie in Kryo-Behälter mit Flüssigstickstoff umgesetzt.

#### LAGERUNG

Verschlossene Medienflaschen müssen bei 2-8°C gelagert werden. Erwärmen Sie das Produkt vor dem Gebrauch entsprechend auf 37°C. Das Produkt darf nicht eingefroren oder Temperaturen über 39°C ausgesetzt werden.

## Blastocyst Freeze - Kit

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

ART.-NR.	KIT BESTEHEND AUS:	ML	PROTEIN	PROZEDUREN
ART-8015	ART-8009-12 5% Glycerol Freezing Medium mit 12 mg/ml HSA	12	HSA	10 / Kit
	ART-8011-12 9% Glycerol mit 0.2 M Sucrose Freezing Medium mit 12 mg/ml HSA	12		
	ART-8013-12 Diluent: HTF w/HEPES mit 12 mg/ml HSA	12		

*Stellen Sie immer sicher, dass die Embryonen gut mit dem Gefrierpuffer vermischt sind. Aus diesem Grunde empfiehlt es sich, die Eizellen, nachdem sie in die Gefrierpuffer-Lösung gesetzt wurden, mehrmals ein- und auszupipettieren. Es empfiehlt sich auch unter Öl zu arbeiten, um das Verdampfen der Flüssigkeiten und einer damit einhergehenden Änderung der Osmolarität der Lösungen zu vermeiden.*

1. Die vollständig entwickelten Blastozysten bei 37°C für 5 Minuten in 1,0 ml Freeze / Thaw Diluent Solution (ART-8013-12) platzieren.
2. Anschließend die Blastozysten bei 37°C für 10 Minuten in 1,0 ml 5% Glycerol Freezing Medium (ART-8009-12) überführen.
3. Dann die Blastozysten bei 37°C in 1,0 ml 9% Glycerol und 0.2 M Sucrose Freezing Medium (ART-8011-12) überführen und in die Straws (\*) laden, welche bereits die gleiche Lösung beinhalten. Bei 37°C in 9% Glycerol und 0.2 M Suchrose Freezing Medium für insgesamt 10 Minuten halten, bevor Sie mit dem Einfrieren beginnen.
4. (\*) Anstelle der Straws können Sie auch, falls Sie es bevorzugen, Vials verwenden: z.B. 1,2 ml Plastik-Kryo-Röhrchen.

## Blastocyst Freeze - Kit

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

#### EINFRIER-PROTOKOLL

Die Blastozysten werden in der Regel in Straws eingefroren, allerdings kann man hierfür auch 1,2 ml Kryo-Röhrchen nehmen.

1. Die Blastozysten werden langsam mit 2°C/Min von 37°C (Ausgangstemperatur) auf -6°C heruntergekühlt.
2. Die Blastozysten für 10 bis 15 Minuten konstant bei -6°C (autoseeding) halten und anschließend mit 0,3°C/Min auf ca. -35°C einfrieren.
3. Zur Lagerung werden sie in Kryo-Behälter mit Flüssigstickstoff umgesetzt.

#### LAGERUNG

Verschlossene Medienflaschen müssen bei 2-8°C gelagert werden. Erwärmen Sie das Produkt vor dem Gebrauch auf 37°C. Das Produkt darf nicht eingefroren oder Temperaturen über 39°C ausgesetzt werden.

## Embryo / Blastocyst Thaw - Kit

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

ART.-NR.	KIT BESTEHEND AUS:	ML	PROTEIN	PROZEDUREN
ART-8016	ART-8005-12 0,5 M Sucrose Thawing Medium	12	HSA	10 / Kit
	ART-8007-12 0,2 M Sucrose Thawing Medium	12		
	ART-8013-12 Freeze/Thaw Diluent (HEPES gepuffertes HTF mit 12 mg/ml HSA)	12		

- Falls die Straws in Flüssigstickstoff gelagert wurden, nachdem sie im langsamen Einfrierverfahren zwischen  $-30^{\circ}$  bis  $-37^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden, sollten sie schnell aufgetaut werden (mindestens  $275^{\circ}\text{C}$  / Minute). Dies zerstreut schnell das Eis in der Zelle und vermeidet die Schädigung der Zellen durch die Eiskristalle. Die einfachste Methode hierzu ist, den Straw für 30-40 Sekunden in Raumluft zu halten und anschließend in ein  $30-35^{\circ}\text{C}$  warmes Wasserbad zu legen bis das Eis vollständig geschmolzen ist. Dies ermöglicht etwaigen in den Gefrierhalm eingedrungenen Stickstoff (kann bei schlecht versiegelten Röhrchen passieren) entweichen zu lassen, bevor es ins Wasserbad platziert wird. Der Verlust an Gefrierhalmen oder deren Inhalt ist mit dieser Technik minimal.
- Tauen Sie jeweils nur einen Kryo-Behälter auf. Überführen Sie die verflüssigte Lösung mit den Embryos/Blastozysten auf eine trockene, sterile Unterlage und lokalisieren Sie die Embryos.
- Nehmen Sie die Embryos/Blastozysten mit möglichst wenig Flüssigkeit auf und legen Sie diese für 10 Minuten in 3 ml 0,5M Sucrose Thawing Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Anschließend geben Sie die Embryos/Blastozysten für 10 Minuten in 3 ml 0,2M Sucrose Thawing Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Verwenden Sie hierfür jedesmal eine neue Transferpipette, um möglichst wenig Kryokonservierungs-Medium von einer Schale zur anderen mitzuschleppen. Es empfiehlt sich, unter Öl zu arbeiten, so wird der Verlust an Wasser und einer damit verbundenen Veränderung der Osmolarität des Mediums minimiert.
- Die Embryonen werden abschließend in 7 Tropfen Verdünnungsmittel bei  $37^{\circ}\text{C}$  gewaschen: 7 Tropfen ( $100\ \mu\text{l}$ ) des Verdünnungsmittels unter Öl werden auf eine breite, sterile Kulturschale gegeben. Der Embryo wird in den ersten Tropfen gelegt, jeweils für ca. 1 Minute durch Auf- und Abpipettieren gewaschen und anschließend in den nächsten Tropfen platziert. Verwenden Sie auch hier für jeden Waschschrift eine neue Pipette!
- Die Embryonen werden nach dem sechsten Waschschrift in den siebten Tropfen transferiert und dort für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  gehalten. Danach können sie transferiert oder in Kulturmedium umgesetzt werden.

## Embryo / Blastocyst Thaw - Kit

### GEBRAUCHSEMPFEHLUNG

#### LAGERUNG

Verschlussene Medienflaschen müssen bei 2-8°C gelagert werden. Erwärmen Sie das Produkt vor dem Gebrauch auf 37°C. Das Produkt darf nicht eingefroren oder Temperaturen über 39°C ausgesetzt werden.



## Sperm Freezing Medium

### FREEZING

ART.-NR.	PROTEIN	VE	PROZEDUREN	LIEFERBAR
ART-8022	HSA	6 x 12 ml	30 – 35 Ejakulate / Kit	24 Std / 48 Std

Das Ejakulat im Inkubator bei 37°C für 30 Min. verflüssigen lassen. Spermien mit PureCeption und Quinn's Sperm Washing Medium aufbereiten (siehe auch Seite 23) und resuspendieren. *Alternativ* kann der verflüssigte Samen direkt kryokonserviert werden.

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20° - 25°C) erwärmen.

1. Fügen Sie innerhalb von 30 Sekunden tropfenweise ein Volumen Sperm Freezing Medium zu einem gleichen Volumen verflüssigter oder aufbereiteter und gewaschener Spermien und mischen Sie dieses gründlich. Die tropfenweise Zugabe des Mediums innerhalb 30 Sekunden und das gründliche Mischen nach Zugabe des Mediums sind wichtig, da nur so die adäquate Equilibrierung der Lösungen mit den Spermien gewährleistet ist.
2. Nach Zugabe des Freezing Mediums läßt man das Sperm Freezing / Spermien Gemisch für 3 Min. equilibrieren.
3. Das Gemisch in Straws (oder Kryo-Röhrchen) geben, 3°C/Min. von Raumtemperatur auf -5°C abkühlen und hier für 3 Min. halten.
4. Manuelle Kristallisation: mit einer vorab in Flüssigstickstoff vorgekühlten Pinzette berührt man den Straw für ca. 1 Sekunde.
5. Weitere 7 Min. bei -5°C halten.
6. Den Container mit 10°C/Min. von -5° auf -80°C herunterkühlen.
7. Den Straw in Flüssigstickstoff tauchen und anschließend zu den Lagerbehältern transferieren. Alternativ können die Straws (oder Kryo-Röhrchen) in einen Probenständer aus Aluminium gegeben und in ein mit 600 ml Wasser gefülltem Gefäß für 30-90 Min. in den Kühlschrank (4°C) gestellt werden. Anschließend möglichst schnell am oberen Rand des Flüssigstickstoffbehälters in den Dampf des Flüssigstickstoffs für 30-40 Min. platzieren. Die Kryo-Röhrchen sollten sich hierfür 10-20 cm über der Stickstoffoberfläche befinden. Straws sollten horizontal in gleicher Höhe liegen. Schneller Transfer der Straws / Kryo-Röhrchen in die vorab beschriftete Halterung des Flüssigstoffbehälters.
8. Tauen Sie am nächsten Tag, oder ein paar Stunden später, zur Kontrolle eine der gefrorenen Proben auf und dokumentieren Sie alle Ergebnisse.

## Sperm Freezing Medium

### THAWING

#### AUFTAUEN

Proben in Straws können auf der Sterillbank bei Raumtemperatur (22°C) aufgetaut werden. Proben in Kryo-Röhrchen müssen in einem Wasserbad bei 30-35°C bewegt werden.

1. Die aufgetaute Samenprobe wird in ein Röhrchen gegeben. Langsam, tropfenweise 10 Volumen an „Quinn´s Sperm Washing Medium“ (ART-1006) hinzugeben, in einem Zeitraum von ca. 30 Sekunden unter ausreichendem Mischen, um die komplette Verdünnung des Quinn´s Sperm Freezing Medium sicher zu stellen.
2. Die motilen Spermien werden durch Zentrifugieren in PureCeption und Waschen in QA Sperm Washing Medium aus der verdünnten Lösung gewonnen.

#### LAGERUNG

Verschlossene Medienflaschen müssen bei 2-8°C gelagert werden. Erwärmen Sie das Produkt vor dem Gebrauch auf 37°C. Das Produkt darf nicht eingefroren oder Temperaturen über 39°C ausgesetzt werden.