

猪孤雌激活液使用说明书

Porcine Parthenogenetic Activation Kit — Instruction Manual

激活液 A | 激活液 B | 规格: 50 μ L/管 | 保存: -20°C 避光

产品概述

本产品为猪卵母细胞孤雌激活专用试剂套装，包含激活液 A 和激活液 B 两种液体，用于体外成熟猪 MII 期卵母细胞的孤雌激活。采用两步法工作流程：激活液 A 作用后，继续使用激活液 B 完成激活过程。经测试，使用公司配套猪相关产品进行激活和培养操作时，猪胚胎囊胚形成率大于 40%。

项目	激活液 A	激活液 B	说明
作用	激活第一步，触发卵母细胞活化级联反应	激活第二步，完成激活过程	两步法孤雌激活
处理时间	4 分钟 ($\pm$ 10 sec)	5 小时 ($\pm$ 10min)	严格控制时间
操作要求	全程避光	全程避光	光敏试剂

所需材料与设备

- 猪体外成熟 (IVM) 培养 42–44 小时后的 MII 期卵母细胞
- 激活液 A (PAM A, HY-R26-A1, -20°C 避光保存)
- 激活液 B (PAM B, HY-R26-A2, -20°C 避光保存)
- 猪胚胎培养液 (P-PZM-3, HY-R26-P1)
- 卵母细胞操作液 (P-MHM, HY-R26-M1)
- 猪卵丘细胞消化液 (P-PCDS, HY-R26-C1)
- 35 mm / 60 mm 培养皿
- CO₂ 培养箱 (38.5°C, 5% CO₂, 饱和湿度)
- 体视显微镜 + 恒温台
- 移液器及无菌枪头 (100–200 μ L)
- 超净工作台

使用前准备

解冻: 将激活液 A 和激活液 B 从 -20°C 冰箱取出，分别使用卵母细胞操作液（对应 A 液）和猪胚胎培养液（对应 B 液）将 A 液与 B 液稀释至工作浓度，均按照 100X 稀释。现配现用，禁止反复冻融。

预平衡培养液: 将操作液和 PZM-3 培养液提前放入 CO₂ 培养箱 (38.5°C, 5% CO₂) 中平衡至少 2 小时。

制备微滴: 在 35 mm 培养皿中制作激活液 A、激活液 B 和洗涤液的操作微滴（每滴 50–100 μ L，每个卵对应 1 μ L），覆盖矿物油，放入培养箱预平衡 30 分钟。

操作步骤

第一步：激活液 A 处理

1. 将体外成熟 42–44 h 的 MII 期卵母细胞用猪卵丘细胞消化液（去除卵丘细胞，在操作液中洗涤 3 次）。
2. 在体视显微镜下挑选胞质均匀、第一极体明显的优质 MII 卵母细胞。
3. 将挑选的卵母细胞移入预平衡的激活液 A 微滴中，在热台上反应 4 分钟。注意全程避光。
4. 处理结束后，迅速将卵母细胞移入 PZM-3 微滴中，充分洗涤 3 次，每次 1 分钟。

第二步：激活液 B 处理

1. 将洗涤后的卵母细胞移入预平衡的激活液 B 微滴中。
2. 放入培养箱（38.5°C, 5% CO₂）处理 5 小时。
3. 处理结束后，将卵母细胞移入 PZM-3 培养液微滴中，充分洗涤 3 次，每次 2 分钟。
4. 将洗涤后的激活胚胎移入新鲜的 PZM-3 培养液微滴（每滴 100 μL，放不多于 30 枚胚胎），放入培养箱继续培养。

流程：MII 卵母细胞 → 激活液 A (4 min) → 洗涤×3 → 激活液 B (5 h) → 洗涤×3 → PZM-3 培养

注意事项

- △ **避光操作：**激活液 A 和激活液 B 均为光敏试剂。从解冻到处理结束的全程均需避光操作，建议关闭显微镜强光源。
- △ **处理时间：**激活液 A 处理时间严格控制在 4 分钟，激活液 B 处理时间 5 小时。超时可能导致卵母细胞过度激活或死亡。
- △ **温度控制：**所有操作液和培养液必须提前在 38.5°C CO₂ 培养箱中充分平衡。操作台需使用恒温加热板，确保卵母细胞始终处于 38.5°C 环境。
- △ **保存条件：**激活液 A 和激活液 B 原液应保存于 -20°C，有效期见瓶身标签。严禁反复冻融，建议分装保存。
- △ **无菌操作：**所有操作应在超净工作台内按无菌操作规程进行。枪头、培养皿应为一次性无菌耗材。
- △ **安全防护：**操作时请佩戴手套和护目镜。避免皮肤接触和吸入。如不慎接触，立即用大量清水冲洗并就医。

常见问题

激活率偏低：① 确认卵母细胞成熟度（MII 率），未成熟卵母细胞难以激活；

② 检查激活液是否过期或保存不当；

③ 确保避光条件和处理温度（38.5°C）；

囊胚率偏低：① 是否使用公司配套试剂；

② 确认培养液 PZM-3 质量及预平衡状态；

③ 检查 CO₂ 浓度和培养箱温度是否稳定。