

猪体外成熟相关试剂使用说明书

Porcine In Vitro Maturation Reagents — Instruction Manual

成熟液 A | 成熟液 B | 卵丘细胞消化液 | 保存: A 液 4°C; B 液、消化液 -20°C 避光

产品概述

本产品为猪卵母细胞体外成熟 (IVM) 专用试剂套装, 包含成熟液 A 液、成熟液 B 液和卵丘细胞消化液。成熟液 A 液与 B 液按比例混合后配制成完整的猪卵母细胞成熟培养液, 用于猪卵丘-卵母细胞复合体 (COCs) 的体外成熟全过程 (42–44 小时)。卵丘细胞消化液用于成熟结束后卵丘细胞的温和去除, 便于后续挑选优质 MII 期卵母细胞。经测试, 使用公司配套猪相关产品进行成熟操作时, 猪卵母细胞成熟率大于 90%。

规格参数

项目	成熟液 A 液	成熟液 B 液	卵丘细胞消化液
作用	与 B 液混合配制完整成熟培养液	与 A 液混合配制完整成熟培养液	成熟结束后去除卵丘细胞
规格	45 mL/瓶	10 mL/瓶	20 mL/瓶
保存	4°C 冷藏	-20°C 避光	-20°C 避光

所需材料与设备

- 猪卵丘-卵母细胞复合体 (COCs, 采集自卵巢)
- 成熟液 A 液 (IVM A, HY-R26-01, 4°C 冷藏保存)
- 成熟液 B 液 (IVM B, HY-R26-02, -20°C 避光保存)
- 卵丘细胞消化液 (P-PCDS, HY-R26-C1, -20°C 避光保存)
- 猪卵母细胞操作液 (P-MHM, HY-R26-M1)
- 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

- 超净工作台

使用前准备

1. **回温**：将成熟液 A 液从 4°C 冰箱取出，室温回温至室温（约 20–30 分钟）。
2. **解冻**：将成熟液 B 液从 -20°C 冰箱取出，室温避光解冻 15–20 分钟。禁止水浴加热或反复冻融。
3. **配制成熟培养液**：按瓶身标注比例（10：1）将成熟液 A 液与成熟液 B 液混合，充分混匀后使用。混合后请尽快使用。
4. **预平衡**：将配制好的成熟培养液、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。
5. **制备微滴**：在培养皿中制作成熟培养液操作微滴（每滴 50–100 μL, 5μL/卵），覆盖矿物油，放入培养箱预平衡 30 分钟。

操作步骤

第一步：卵母细胞采集与挑选

6. 从卵巢采集卵丘-卵母细胞复合体（COCs），置于操作液中。
7. 在体视显微镜下挑选卵丘细胞层完整、胞质均匀的优质 COCs。
8. 将挑选的 COCs 在操作液中洗涤 3 次。

第二步：体外成熟培养

9. 将洗涤后的 COCs 移入预平衡的成熟培养液微滴中（每滴 50–100 μL，每滴放入约 25–30 枚 COCs）。
10. 放入 CO₂ 培养箱（38.5°C, 5% CO₂，饱和湿度）培养 42–44 小时。

第三步：卵丘细胞消化与 MII 卵母细胞挑选

11. 成熟培养结束后，将 COCs 移入预平衡的卵丘细胞消化液中，轻轻吹打以去除卵丘细胞（消化时间以实际观察为准）。
12. 将去除卵丘细胞的卵母细胞移入操作液中，充分洗涤 3 次。
13. 在体视显微镜下挑选胞质均匀、第一极体明显的优质 MII 期卵母细胞，用于后续受精、孤雌激活或显微操作。

流程图：COCs 采集 → 挑选洗涤 → 成熟培养液（42–44 h, 38.5°C, 5% CO₂）→ 卵丘细胞消化 → 洗涤×3 → MII 卵母细胞

注意事项

- △ **避光操作：**成熟液 B 液和卵丘细胞消化液为光敏试剂，从解冻到使用全程避光，建议关闭显微镜强光源。
- △ **配制比例：**成熟液 A 液与 B 液须严格按瓶身标注比例混合，混合后混匀再使用。
- △ **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。
- △ **保存条件：**成熟液 A 液保存于 4°C；成熟液 B 液和卵丘细胞消化液保存于 -20°C 避光。解冻后如有沉淀或变色，请勿使用。严禁反复冻融。
- △ **无菌操作：**所有操作应在超净工作台内按无菌规程进行，使用一次性无菌耗材。
- △ **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。

常见问题

成熟率偏低：① 检查 COCs 质量，卵丘细胞层不完整会降低成熟率；② 确认成熟液 A/B 配制比例是否正确；③ 检查培养温度、CO₂ 浓度和湿度是否稳定；④ 确认试剂未过期或保存不当。

卵丘细胞消化不彻底：① 适当延长消化时间并轻轻吹打；② 确认消化液解冻后未反复冻融；③ 注意消化过程需在适宜温度下进行。

卵母细胞异常/退化：① 确认操作液和培养液已充分预平衡；② 避免培养箱温度和 CO₂ 浓度波动；③ 检查无菌操作是否规范。