

羊卵母细胞成熟相关试剂使用说明书

Ovine In Vitro Maturation Reagents — Instruction Manual

成熟液 | 操作液 | 保存：成熟液/操作液 4°C 冷藏

产品概述

本产品为羊卵母细胞体外成熟（IVM）专用试剂套装，包含羊卵母细胞成熟液和羊卵母细胞操作液。羊卵母细胞成熟液为即用型完整成熟培养液，适用于屠宰场卵巢来源羊卵丘-卵母细胞复合体（COCs）的体外成熟全过程（22–24 小时）；羊卵母细胞操作液用于 COCs 的采集、挑选、洗涤以及成熟结束后卵丘细胞的去除。所有产品均为即用型设计，经测试，使用公司配套羊相关产品进行成熟操作时，羊卵母细胞成熟率大于 80%。如需继续体外培养，可配套使用本公司羊胚胎培养液。

规格参数

项目	成熟液	操作液
作用	COCs 体外成熟培养	采集、洗涤及卵丘细胞去除
规格	20 mL/瓶	50 mL/瓶
保存	4°C 冷藏	4°C 冷藏

所需材料与设备

- 羊卵丘-卵母细胞复合体（COCs，采集自卵巢）
- 羊卵母细胞成熟液（S-IVM，HY-R26-B3，4°C 冷藏保存）
- 羊卵母细胞操作液（S-MHM，HY-R26-M5，4°C 冷藏保存）
- 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**：将成熟液和操作液从 4°C 冰箱取出，室温回温至室温（约 20–30 分钟）。
2. **预平衡**：将成熟液和操作液放入 CO₂ 培养箱（38.5°C, 5% CO₂, 饱和湿度）中平衡至少 2 小时。
3. **制备微滴**：在培养皿中制作成熟液和操作液微滴（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

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

第二步：体外成熟培养

7. 将洗涤后的 COCs 移入预平衡的成熟液微滴中（每滴 50–100 μL, 每滴放入约 25–30 枚 COCs）。
8. 放入 CO₂ 培养箱（38.5°C, 5% CO₂, 饱和湿度）培养 22–24 小时。

第三步：卵丘细胞去除与 MII 卵母细胞挑选

9. 成熟培养结束后，将 COCs 移入预平衡的操作液中，轻轻吹打以去除卵丘细胞（以实际观察为准）。
10. 将去除卵丘细胞的卵母细胞在操作液中充分洗涤 3 次。
11. 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、孤雌激活或核移植。

流程图：COCs 采集 → 挑选洗涤 → 成熟培养液（22–24 h, 38.5°C, 5% CO₂）→ 去卵丘细胞 → 洗涤×3 → MII 卵母细胞

注意事项

△ **温度控制**：成熟液和操作液必须提前在 38.5°C CO₂ 培养箱中充分平衡，操作台需使用恒温加热板。

△ **培养时间**：羊卵母细胞体外成熟时间建议控制在 22–24 小时，避免成熟不足或过度成熟。

△ **保存条件**：成熟液和操作液均保存于 4°C，避免高温及频繁温差变化。若出现沉淀、浑浊或变色，请勿使用。

△ **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 确认成熟液和操作液已充分预平衡；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。

卵丘细胞去除不彻底：① 适当延长吹打时间并轻柔操作；② 使用口径适宜的无菌吸管；③ 注意在操作液中进行并保持适宜温度。

卵母细胞异常/退化：① 确认操作液和成熟液已充分预平衡；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；④ 避免培养时间过长。