

羊卵母细胞核移植相关试剂使用说明书

Ovine Oocyte Nuclear Transfer (SCNT) Reagents — Instruction Manual

操作液 | 激活液 A/B | 胚胎培养液 | 保存: 操作液/培养液 4°C; 激活液 -20°C 避光

产品概述

本产品为羊卵母细胞体细胞核移植（SCNT）专用试剂套装，适用于从去核卵母细胞开始的重构胚构建、激活及体外培养流程。整套试剂包括：羊卵母细胞操作液（用于去核及供体细胞注入等显微操作）、羊卵母细胞孤雌激活液 A/B（用于重构胚的两步法激活）以及羊胚胎培养液（用于激活后重构胚的体外发育）。所有产品均为即用型设计，批间一致性好，配套详细使用说明。

规格参数

项目	操作液	激活液 A/B	胚胎培养液
作用	去核及供体细胞注入等显微操作	重构胚两步法激活	激活后胚胎体外培养
规格	50 mL/瓶	50 μ L $\times$ 2	20 mL/瓶
保存	4°C 冷藏	-20°C 避光	4°C 冷藏

所需材料与设备

- 体外成熟 22–24 小时后的羊 MII 期卵母细胞
- 羊卵母细胞操作液（S-MHM, HY-R26-M5, 4°C 冷藏保存）
- 羊核移植细胞融合液（FM, HY-R26-F3, -20°C 冷藏保存）
- 羊卵母细胞孤雌激活液 A/B（PAM A, HY-R26-A5, PAM B, HY-R26-A6, -20°C 避光保存）
- 羊胚胎培养液（S-IVC, HY-R26-B4, 4°C 冷藏保存）
- 供体细胞（皮肤成纤维细胞等，同步化培养至适宜时期）
- 电融合液及电融合仪（用于供体细胞与卵母细胞融合）
- 35 mm / 60 mm 培养皿

- CO₂ 培养箱 (38.5°C, 5% CO₂, 饱和湿度)
- 显微操作系统 + 倒置显微镜 + 恒温台
- 拉针仪 / 磨针仪 / 断针仪 (制备去核针与注射针)
- 移液器及无菌枪头
- 超净工作台

使用前准备

1. **激活液解冻**: 将激活液 A 和激活液 B 从 -20°C 冰箱取出, 室温避光解冻。分别使用卵母细胞操作液 (对应 A 液) 和羊胚胎培养液 (对应 B 液) 将 A 液与 B 液稀释至工作浓度, 均按照 200X 稀释。禁止水浴加热或反复冻融。
2. **预平衡**: 将操作液和胚胎培养液提前放入 CO₂ 培养箱 (38.5°C, 5% CO₂) 中平衡至少 2 小时。
3. **制备微滴**: 在培养皿中制作操作液、激活液 A/B 和胚胎培养液的操作微滴 (每滴 50–100 μ L), 覆盖矿物油, 放入培养箱预平衡 30 分钟。
4. **供体细胞准备**: 供体细胞传代培养至适宜时期, 使用前消化成单细胞悬液, 置于操作液中备用。

操作步骤

第一步：去核卵母细胞的获得

5. 将体外成熟 22–24 小时的羊卵母细胞去除卵丘细胞, 在操作液中洗涤 3 次。
6. 在显微操作系统下, 挑选胞质均匀、第一极体明显的成熟卵母细胞。
7. 用去核针吸除第一极体及邻近胞质 (含中期染色体), 完成去核, 获得去核卵母细胞。

第二步：供体细胞注入

8. 将单个供体细胞注入去核卵母细胞的卵周隙中, 构成重构卵。
9. 注入时动作轻柔, 避免损伤卵母细胞胞质。

第三步：电融合

10. 将重构卵移入羊核移植细胞融合液中, 使用电融合仪施加适宜的电脉冲完成供体细胞与卵母细胞的融合。

11. 融合结束后，将重构胚移入羊胚胎培养液中，放入培养箱恢复 30–60 分钟。

第四步：重构胚激活

12. 将融合后的重构胚移入预平衡的激活液 A 微滴中，避光处理约 3 分钟。

13. 处理结束后，将重构胚移入胚胎培养液微滴中，充分洗涤 3 次。

14. 将洗涤后的重构胚移入激活液 B 微滴中，放入培养箱避光处理 2 小时。

15. 处理结束后，将重构胚移入胚胎培养液微滴中，充分洗涤 3 次。

第五步：胚胎体外培养

16. 将激活后的重构胚移入新鲜的羊胚胎培养液微滴中（每滴 100 μL ，放不多于 30 枚胚胎）。

17. 放入 CO_2 培养箱（ 38.5°C , 5% CO_2 , 饱和湿度）中培养 7–8 天。

18. 每日观察并记录胚胎发育情况，囊胚期可进行移植或冷冻保存。

流程图：去核卵母细胞 → 供体细胞注入 → 电融合 → 激活液 A (3 min) → 洗涤 → 激活液 B (2 h) → 洗涤 → 胚胎培养 (7–8 天)

注意事项

△ **避光操作：**激活液 A 和激活液 B 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。

△ **温度控制：**所有操作液和培养液必须提前在 38.5°C CO_2 培养箱中充分平衡，操作台需使用恒温加热板。

△ **保存条件：**操作液和胚胎培养液保存于 4°C ；激活液 A/B 保存于 -20°C 避光。解冻后严禁反复冻融。

△ **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。

△ **显微操作：**去核和供体细胞注入需熟练操作，建议在恒温台上快速完成，减少卵母细胞离体暴露时间。

△ **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

融合率偏低：① 检查电融合液和电融合参数是否适宜；② 确认供体细胞状态和卵母细胞成熟度；③ 融合后及时移入培养液恢复。

激活率/囊胚率偏低：① 确认激活液 A/B 是否过期或保存不当；② 确保全程避光和适宜温度；③ 检查胚胎培养液质量和培养箱条件。

胚胎发育停滞：① 确认胚胎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。