

# 中国人类遗传资源 卵母细胞冷冻保存技术规程

Technical Specification  
for the Refrigeration and Preservation of Megagametocyte  
of Chinese Genetic Resources

(讨论稿)

中国人类遗传资源平台项目组

2007年2月

## 前 言

本规程的制定目的在于规范以科研为目的的人类卵母细胞的收集和保存程序，避免重复取样，为科研人员提供技术支持、依据和后盾，同时保护卵母细胞提供者的权利。人类卵母细胞的收集和保存规程的制定将对生殖细胞遗传资源的保存与延续、资源共享和长久利用有着重要的意义。

由于对人类卵母细胞的冷冻保存的方法尚不十分成熟，本规程仅将现有的方法进行规范，相信随着科学研究的进一步深入，将会对本规程逐渐完善，并为科研工作提供优质的卵母细胞，从而造福人类。

主要包括实验室环境、仪器设备的要求、样本收集和保存程序及计算机管理等。

作为人类遗传资源收集整理保存技术规程的一部分，本规程是参照国内外相关技术和方法、标准和规范，结合实际工作经验而初步形成的。

# 目 次

前 言 .....	II
1. 范围 .....	1
2. 规范性引用文件 .....	1
3. 术语和定义 .....	1
4. 人类卵母细胞的收集和保存的规范性技术要素 .....	2
4.1 实验室要求 .....	2
4.2 主要仪器设备 .....	3
4.3 样本收集前的准备 .....	3
4.4 卵母细胞的冷冻复苏 .....	6
4.5 卵母细胞的储存 .....	7
4.6 卵母细胞的外供及反馈 .....	8
4.7 计算机管理 .....	8
5. 参考文献 .....	8

# 人类卵母细胞冷冻保存技术规程

## 1. 范围

本规程规定了人类卵母细胞低温冷冻长期保存的工作程序和技术要求。

本规程适用于作为人类遗传资源并以科研为目的的人类卵母细胞的保存。

## 2. 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本使用于本标准。

- GB/T 1.1-2000 标准的结构和编写规则
- 中国人类遗传资源采集知情同意技术规范
- 卫科教发[2003]176号 人类辅助生殖技术伦理原则
- 人类辅助生殖技术规范

## 3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本规程：

### 3.1 慢速冷冻技术(controlled slow freezing)

慢速冷冻技术的原理是通过逐步降温实现细胞的逐步脱水,以达到避免或降低细胞内冰晶形成的目的。

### 3.2 玻璃化冷冻技术(vitrification)

是一种快速冷冻方法，是活细胞在冷冻的过程中完全避免冰晶形成产生的过程。其原理是利用高浓度保护剂溶液在受冻时固化（非结晶）粘度极度增加的特点，能从液态变为无结构的玻璃状态，这种玻璃状态能保持其溶液状态的分子和离子分布。玻璃化法要求升温 and 降

温的速度必须快，避免发生广泛的去玻璃化和再结晶，维持了正常的超微结构,减少了对细胞的损害,提高了冷冻复苏率。

### 3.3 植冰 (seeding)

即诱导细胞外液冰晶形成的过程. 植冰在细胞冷冻过程中是一个非常重要的步骤, 能阻止细胞过度冷却, 启动细胞的脱水过程.

### 3.4 知情同意 (Informed consent)

保证被收集者了解并理解研究的目的是内容, 并自愿同意参加试验的原则。知情同意具有国际性, 是对所有进行人体研究或人体取样调查的研究人员的伦理要求。在以人为研究/试验对象的科研领域, 收集者必须获得研究对象/参与者的知情同意, 保护被收集者合法权益的同时保护收集者免于诉讼。

### 3.5 细胞的冻存 (cell cryopreservation)

指体外培养的细胞在加有或不加冷冻保护剂的溶液中, 以一定的冷冻速率降至零下某一温度 (一般是低于 $-70^{\circ}\text{C}$ 的超低温条件), 并在此温度下对其长期保存的过程。

### 3.6 冷冻保护剂 (cryoprotectant)

利用冷冻技术将细胞从生理温度降至低温并贮存, 需要时再从低温状态解冻至生理温度。在细胞冷冻过程中, 加入到溶液中的对细胞具有保护作用的物质, 称冷冻保护剂。冷冻保护剂可通过减少细胞内冰晶形成和稀释细胞外液中溶质的浓度减轻冷冻和复温过程中细胞的损伤, 增加细胞对冻融过程的耐受, 增加存活率。

## 4. 人类卵母细胞的收集和保存的规范性技术要素

### 4.1 实验室要求

4.1.1 人类生殖细胞-卵母细胞冷冻保存实验室须设置在有资质的体外受精-胚胎移植中心内。

要求工作环境和条件、实验室设计和布局以此为原则。

场所布局须合理,符合洁净要求, 建筑和装修材料要求无毒, 应避开对工作产生不良影响的化学源和放射源;

实验室围护结构内表面应易于清洁。地面应防滑、无缝隙, 不得铺设地毯。

工作场所须符合医院建筑安全要求和消防要求，保障水电供应。各工作间应具备空气消毒设施；

4.1.2 实验室至少由准备室、卵母细胞冷冻实验室和冷冻储藏室三部分组成。

#### 4.1.2.1 准备室

用于培养皿的清洗、包装、培养物质的准备和消毒以及供应物品的保存。内应设有上下水。

#### 4.1.2.2 卵母细胞冷冻实验室

用于卵母细胞的培养和冷冻复苏， 是进行无菌操作的实验室。基本要求为清洁、无菌、干燥、不通风，光线适宜。建议设置空气净化层流室。卵母细胞操作区必须达到百级标准。冰箱、及储物柜。

#### 4.1.2.3 冷冻储藏室

用于储存冷冻的卵母细胞所用。储存室应避免强光照射，保持恒温。

### 4.2 主要仪器设备

4.2.1 实验室常规仪器：移液器、pH 计、渗透压计、天平、电热干燥箱、水平式离心机、恒温水浴箱(37℃)、冰箱等；

4.2.2 耗材：培养皿、试管、离心管、微孔滤膜滤器（可换膜式滤器和一次性滤器）冷冻麦管等；

4.2.3 超净工作台、CO<sub>2</sub>培养箱、恒温平台和恒温试管架等。超净工作台需定期由净化设备专业人员检测净化质量标准；二氧化碳培养箱水槽用水应是无菌蒸馏水。

4.2.4 显微镜：解剖显微镜、生物显微镜和倒置显微镜。

4.2.5 冷冻设备包括：程序降温仪、冷冻卵母细胞储存罐、液氮储存罐和液氮运输罐等。

4.2.6 其它：高压蒸汽灭菌器、计算机及文件柜。

### 4.3 样本收集前的准备

#### 4.3.1 人类卵母细胞遗传资源采集范围

体外受精-胚胎移植多余的卵母细胞；

多囊卵巢综合征患者进行穿刺治疗时得到的卵母细胞；

手术取出卵巢中抽吸卵泡获得的卵母细胞；

#### 4.3.2 伦理认证及知情同意。

为了促进科研用人类卵母细胞的安全、有效、合理地采集、保存，并为科研提供卵母细胞，保障供卵者的权益，维护社会公益，应遵循以下伦理原则。

4.3.2.1 对供者进行必要的体检筛查，防止性传播疾病的传播和蔓延。

##### 4.3.2.2 知情同意的原则

供卵者应是完全自愿地参加供卵，向捐献者说明捐献卵母细胞的目的、用途，供卵者的权利和义务；说明她有义务向医生提供有关个人病史、家族遗传病史、性生活史和不良嗜好等情况，并对回答的真实性负责。在明确各自的权利、义务后，签署供卵者知情同意书。

不得采集、检测、保存和使用未签署知情同意书者的卵母细胞。

##### 4.3.2.3 保密原则

科研人员有义务为供者保密，人类生殖细胞遗传资源库-卵母细胞保存库应建立严格的保密制度并确保实施；

使用冷冻卵母细胞的科研人员无权查阅供者真实身份的信息资料。

##### 4.3.2.4 严防商业化的原则

禁止以盈利为目的的供卵行为。

禁止买卖卵母细胞，人类生殖细胞遗传资源库-卵母细胞保存库的卵母细胞不得作为商品进行市场交易；

人类生殖细胞遗传资源库-卵母细胞保存库的卵子不得用于以医疗为目的的辅助生殖技术。

#### 4.3.3 供卵者的体检及基本信息采集

所有收集的标本都必须要求有完整的临床资料，资料逐项填写，字迹清楚，填写内容应保证真实、准确，以备检索。主要包括如下内容：

4.3.3.1 供卵者的基本资料，包括姓名、年龄、民族、联系方式、身份证号等。

4.3.3.2 病史资料：询问并记录供精者的既往史、个人生活史和性传播疾病史。

既往病史：全身性疾病和严重器质性疾病，如心脏病、糖尿病、肺结核、肝脏病、泌尿生殖系统疾病、血液系统疾病、高血压、精神病和麻风病等。

个人生活史：长期接触放射线和有毒有害物质等情况，无吸毒、酗酒、吸烟等不良嗜好和同性恋史、冶游史。

性传播疾病史：淋病、梅毒、尖锐湿疣、传染性软疣、生殖器疱疹、艾滋病、乙型及丙型肝炎。

家系调查：记录遗传病史和遗传家族史。

#### 4.3.3.3 体格检查资料：

一般体格检查：记录供卵者身体健康状况，有无畸形体征，心、肺、肝、脾等检查情况；

生殖系统检查：供卵者生殖系统发育状况，有无畸形、生殖系统溃疡、尿道分泌物和生殖系统疣等疾患。

#### 4.3.3.4 实验室检查资料：

染色体检查：供卵者染色体常规核型分析；

性传播疾病的检查：供卵者乙肝、丙肝等检查；梅毒、淋病、艾滋病等检查；衣原体、支原体、巨细胞病毒、风疹病毒、单纯疱疹病毒和弓形体等检查。

- ABO 血型及 Rh 血型检查；

#### 4.3.3.5 资料归档：所有资料记录完整后转入档案室保存并输入数据库。

### 4.3.4 试剂的准备

#### 4.3.4.1 卵母细胞冷冻保护剂的选择

卵母细胞冷冻保护剂必须具备两个基本条件：对冷冻的卵母细胞无毒，具备高水溶性，保证在冰晶形成的过程中，它们的浓度增加时仍然留在溶液中而不被析出。

冷冻保护剂分为两类：

一类是能渗透至细胞内的保护剂。这类保护剂在冷冻时渗入细胞内，降低细胞内水分的蒸气压力，使其接近细胞外水分的蒸气压。当细胞外冻结时，可减轻细胞浓缩的程度和速度。由于保护剂能渗入或渗出细胞，解冻时很少发生有损细胞的渗透肿胀。

另一类为不能渗透至细胞内的冷冻保护剂，如蔗糖。由于它不能进入细胞，所以在冷冻前细胞皱缩，细胞内水分外溢，从而减少细胞内冰晶的形成；卵黄也属于这类保护剂。卵黄内含有卵磷脂，它能稳定精子的细胞膜，阻止顶体外膜破裂。

#### 4.3.4.2 卵母细胞冷冻保护剂的准备：

Dulbecco's phosphate buffer saline, DPBS: Dulbecco's 磷酸盐缓冲液，避光保

存。

1.5mol/L 的 1, 2-丙二醇 (1,2-propenadiol,PROH) 和 0.1M 的蔗糖; PROH 铂纸包裹避光保存。

含 1.5mol/L 乙二醇 (ethylene glycol,EG) 的 DPBS;

含 5.5mol/L 乙二醇和 1.0mol/L 蔗糖的 DPBS。

#### 4.3.4.3 复苏融解剂:

1.0mol/L PROH 和 0.2mol/L 蔗糖溶液、0.5mol /L PROH 和 0.2mol/L 蔗糖溶液、0.2mol/L 蔗糖溶液、PBS;

1.0mol/L、0.5mol/L、0.25mol/L 和 0.125mol/L 的蔗糖溶液

### 4.4 卵母细胞的冷冻复苏

#### 4.4.1 卵母细胞的冷冻复苏方法:

常用的卵母细胞冷冻方法有 2 种,即慢冻快融法冷冻和玻璃化法冷冻。

##### 4.4.1.1 慢冻快融法

PBS 液洗 3-5 遍。

先放入 1.5mol/L 的丙二醇和 0.1mol/L 的蔗糖中平衡 10min。

将平衡后的卵母细胞装入 0.25ml 麦管中, 要求装 2-3 段抗冻液, 各段抗冻液之间以小气泡隔开, 卵母细胞在最中间一段。

应用程序冷冻仪通过慢速冷冻程序, 从 20 °C 开始以每分钟下降 2°C 的速度降到-7°C, 平衡 5min, 将其移到-7°C 的植冰小皿中, 用从液氮中预冷的镊子安常规方法人工植冰 (seeding)。-7 °C 再等待 10min (holding), 将其移回程序冷冻仪, 继续降温以-0.3 °C/ min 的速度降至-30 °C, 然后以-30 °C/ min 的速度降至-120 °C, 然后迅速投入液氮中(-196 °C), 在液氮中储存。

复苏方法为快速复温法, 即室温空气中 40 秒, 30 °C 水浴 40 秒, 然后进入融解液中, 按保护剂的浓度梯度逐级换出冷冻保护剂。顺序如下:

1.0mol PROH 和 0.2mol 蔗糖溶液→0.5mol PROH 和 0.2mol 蔗糖溶液→0.2mol 蔗糖溶液→PBS

卵子在每种液体中停留 5 分钟,在最后阶段移至不含蔗糖的 PBS 中平衡 10 分钟,此时可将温度升至 37 度.

#### 4.4.1.2 玻璃化法冷冻

##### 冷冻保护剂

将卵母细胞置于用 DPBS 配置的 1.5mol/L 的乙二醇 (EG) 中停留 5 分钟,然后移入含 5.5mol/L 的乙二醇 EG 和 1.0mol/L 蔗糖的 DPBS 中,装入麦管或冷冻环等载体,迅速投入液氮中。

复苏:融解液是浓度分别为 1.0mol/L、0.5mol/L、0.25mol/L 和 0.125mol/L 的蔗糖溶液。将复苏的卵母细胞在 37 度的不同浓度的蔗糖液中分别停留 2.5-5 分钟,然后移入培养液中。

#### 4.4.2 卵母细胞复苏质量的判断标准:

解剖显微镜下的形态学检查。透明带和胞膜无损伤,透明带和胞质之间没有空隙,卵周间隙清楚,无胞质外漏或卵细胞萎缩,大小正常,则定为存活。

根据镜下卵子形态,将复苏后 MII 期卵子分为 3 类:

(1) 优质卵子。没有明显的胞浆溢出与皱缩;透明带与细胞膜完整;卵周间隙清晰;卵子正常大小且胞浆均质或基本均质,折光好。(2) 存活但质量不佳的卵子。镜下卵子折光尚可,虽然胞膜完整,但卵周间隙变大,且胞浆颜色变深。(3) 死亡的卵子。可见胞浆呈现均质土黄色变,卵膜破裂,卵周间隙消失,或者胞浆呈现颗粒状变性,折光性消失。

### 4.5 卵母细胞的储存

标本冷冻储存前,必须严格查对,储存时须按标本位置号放入相应的位置,并作详细记录。

应定期检查、维护使用中的液氮罐,做好记录。发现异常及时处理,并向上级报告。

定期对罐内液氮量进行测量、记录,及时添加,以确保冷冻标本浸于液氮面以下。以保证冻存样本的质量。

保持室内环境与容器的整洁,定时通风,防止过量液氮使人窒息。定期消毒。加强防

火防盗措施，确保安全。

液氮操作注意安全，带面罩及皮手套或厚的棉手套，防止冻伤。用专用特制容器运送液氮。

#### **4.6 卵母细胞的外供及反馈**

严格卵母细胞外供及反馈的管理，对卵母细胞去向及用途及时登记。

#### **4.7 计算机管理**

建立卵母细胞保存的数据库，对卵母细胞的储存和使用进行动态管理。数据库应包括供卵者信息资料管理、冷冻卵母细胞的管理及卵母细胞外供的管理。

### **5. 参考文献**

陈子江 主编 人类生殖与辅助生殖 北京:科学出版社 2005