

体外受精-胚胎移植 实验室技术

主 编 黄国宁 孙海翔



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

体外受精—胚胎移植 实验室技术

THE ART OF IVF



科学出版社
KEXUE CHUBANSHE

体外受精-胚胎移植 实验室技术

主 编

黄国宁 孙海翔

副主编

何方方 孙莹璞 孙正怡

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

体外受精-胚胎移植实验室技术/黄国宁等主编. —北京: 人民卫生出版社, 2012. 2

ISBN 978-7-117-15322-5

I. ①体… II. ①黄… III. ①体外受精-实验技术②胚胎移植-实验技术 IV. ①R321-33

中国版本图书馆CIP数据核字 (2011) 第281447号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

体外受精-胚胎移植实验室技术

主 编: 黄国宁 孙海翔

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里19号

邮 编: 100021

E-mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京人卫印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 889×1194 1/16 印张: 27 插页: 1

字 数: 836千字

版 次: 2012年2月第1版 2012年2月第1版第1次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-15322-5/R • 15323

定 价: 178.00元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

- 黄国宁 重庆市妇幼保健院
孙海翔 南京鼓楼医院
何方方 北京协和医院
孙莹璞 郑州大学第一附属医院
孙正怡 北京协和医院
陈振文 国家人口计生委科学技术研究所
范立青 中信湘雅生殖与遗传专科医院
方 丛 中山大学附属第六医院
冯 云 上海交通大学附属瑞金医院
黄元华 海南医学院附属医院
金美善 Vitrolife Sweden AB, Gothenburg, Sweden
刘德一 Melbourne IVF and University of Melbourne, Australia
孟 励 California Fertility Partners, USA
千日成 McGill University, Montreal, Canada
史庆华 中国科技大学
王维华 Houston Fertility Institute, USA
朱桂金 华中科技大学附属同济医院
谷龙杰 华中科技大学附属同济医院
韩 伟 重庆市妇幼保健院
李 刚 郑州大学第一附属医院
李婷婷 中山大学附属第六医院
刘东云 重庆市妇幼保健院
卢文红 国家人口计生委科学技术研究所
宋文妍 郑州大学第一附属医院
唐 杰 中山大学附属第六医院
严 杰 McGill University, Montreal, Canada
岳超敏 中山大学附属第六医院
遇晓敏 McGill University, Montreal, Canada
张宁媛 南京鼓楼医院

作为生殖医学，及至人类辅助生殖技术，最令人瞩目的是1978年7月第一例“试管婴儿”路易斯·布朗诞生，其创举者Robert G. Edwards获得了2010年诺贝尔生理学医学奖。中国的第一例“试管婴儿”由北大张丽珠教授完成。至今，全世界的“试管婴儿”已达数百万之众，渐为相当成熟的技术。不仅如此，各种衍生的技术接踵而至，不断深入和发展。中国的辅助生殖技术虽然起步较晚，但发展迅速，现今几与国际同步。近年又成立了中华医学会生殖医学分会，亚学科建立、专家队伍形成，还有专业杂志版，形势令人鼓舞！

正是在这种情势下，我们高兴地看到这部《体外受精-胚胎移植实验室技术》付梓出版。先前，我看到黄荷凤教授、庄广伦教授分别于2003年和2005年推出的几乎相同名字的《现代辅助生育技术》的专著，与之相比，本书更侧重于实验室技术，从实验室设计与建立、质量控制到各种辅助生育技术，甚为全面细腻，有现代技术的综合，更有自己的经验总结；有独自的特点，更注重博采众长。不仅对实验技术人员提供指导和参考，也对临床医师裨多帮助，更对临床与实验室工作的相互转化起直接的推动作用。

生殖医学、辅助生育技术的发展表明对生殖过程的细微了解和研究的极大进步，从而可以进行“有的放矢”的干预。其实，我喜欢用人类“生殖调解”(reproductive regulation)，而计划生育(family planning)更偏向于社会学称谓。生殖调解则可包括避孕、节育、绝育和不孕不育的诊治以及中止妊娠、性传播疾病的防治，颇似生殖健康的范畴，可涉及遗传因素、环境因素、优生优育以及相关基础与临床学科，成为一个多学科、网络式、立体化的专业科学。

随着技术的发展，生殖可能解脱了传统的、常规的、自然法则的羁绊，甚至成为“脱缰之马”！这时人们面对的可能已经不是技术问题，而是伦理道德问题，管理和法律就日趋显得必要。

记得前些年有几部轰动甚至令人惊悚的书，如《人的复制——一个人的无性生殖》(1980)、《自私的基因》(1981)、《克隆——人的设计与销售》(1997)等。后来，的确有了“克隆羊”，有的国家甚至明文规定禁止人的克隆实验研究。其实，科学家们早就说过，人类生殖面临的主要问题可能不是技术问题而是伦理、道德、法律等问题。仅就目前推行

的辅助生殖技术就已经可见这一严峻问题的端倪！我国政府和理性的科学家们高度重视这一问题，本书专辟一章讲述，显然是明智和必要的。希望不可小视这一章的内容，使生殖技术像要生育健康孩子一样健康发展。

感谢编著者给我呈献一部全面、系统的辅助生殖技术的书，并愿意推荐给同道们。赘言如上，是为序。

郎景和
二〇一二年一月

我国辅助生殖技术起步晚，急需提高 IVF 实验室技术，与改善临床超排卵及子宫内膜容受性技术有效地结合才能不断提高 IVF 成功率，这也是我从事辅助生殖技术二十多年来的深刻体会。今天《体外受精-胚胎移植实验室技术》一书与大家见面，正体现了我国辅助生殖技术实验室与临床经验的积累，胚胎种植率、临床妊娠率、活产率逐年提高，并与世界水平接轨。也就是说，辅助生殖技术的临床与实验室两大部分技术互相促进，临床超排卵技术为实验室提供优质的卵子，实验室技术为优质卵子和胚胎发育潜能提供更好的保护条件，从而获得理想结局。

辅助生殖技术与其他学科最大的区别在于其对胚胎实验室的依赖性和协同性，且更倾向于基础研究，需要多学科跨领域的技术支持。欲建立一个生殖医学中心，不仅需要经验丰富的临床医生，更需要实验室基础知识、研究员及相关设备建设的保障。作为胚胎实验室的研究人员，更需要严谨、认真、负责的态度来对待每一次洗精、拾卵、授精、移植这样一个人性化、标准化的操作步骤。因此，要做到这点就需要一个实验室技术良好的培训、不断再教育的过程。

展望未来，优化实验室技术是人类辅助生殖技术的重要任务。优生、生殖安全性更是从实验室做起，将付诸更多的投入与关注，将辅助生殖技术推向更高层次的研究并持续发展。

本书的主编黄国宁、孙海翔等同道均是我国辅助生殖领域的实践尖兵，一向善于发掘、创新，并致力于扩展新思路、推广新技术。参编的所有作者均在国内外担任重要的 IVF 实验室或生殖医学基础研究工作，在 IVF 实验室技术的基础理论、实践操作与管理方面有丰富的经验。本书的编写集众家之所长，共 13 章，从“体外受精-胚胎移植实验室的设计与建立”到“配子/胚胎的管理与伦理问题”，详细阐述了 IVF 实验室基础知识、基础建设、人员培养、各项操作技术及质控管理等，表达与总结了各位研究者、科学家、辅助生育技术专家在第一线长期实践所积累的丰富经验。不仅如此，对 IVF 实验技术中的疑难问题也提供了详细的帮助与解答，其内容具有临床实践性、操作可行性，是一本实用的 IVF 实验室技术指南，显示了我国胚胎实验室技术发展的现状和未来趋势。

黄国宁

中山大学第一附属医院

二〇一二年一月

2010年，世界上第一例“试管婴儿”的缔造者Robert Edwards荣获诺贝尔生理医学奖，这是对20世纪世界上最伟大的医学事件之一——体外受精-胚胎移植（IVF-ET）技术的充分肯定。近十年来，中国内地的“试管婴儿”无论从周期数还是临床妊娠率都有赶超国际先进水平的趋势。毋庸置疑，这项伟大的技术赋予了众多不育症家庭生命的希望。

IVF技术涉及妇产科学、男科学、生殖生理学、遗传学、胚胎学及发育生物学等多个学科领域，同时也是必须依赖实验室技术的临床学科。17年前，在各种IVF技术参考书匮乏的条件下，我有幸得到了重庆医科大学妇产科卞度宏教授、中山医科大学庄广伦教授、台湾长庚纪念医院宋永魁教授在IVF临床与实验室技术方面给予的无私帮助，同时深深感受到IVF实验室技术参考书对临床工作的重要指导意义。

自2001年卫生部开始规范人类辅助生殖技术以来，该项技术朝着健康、有序的方向发展。但发展中的IVF技术仍面临艰巨的挑战——如何设置人类胚胎体外培养室最大限度地保障胚胎安全、降低多胎率以达到单胎、足月、健康婴儿活产为IVF的最终目标，而稳定的实验室技术是这一目标的基本保障。2年前，孙海翔主任与我一起讨论写一部实用的IVF实验室技术手册的可能性，其后联系了孙莹璞教授、孙正怡教授和何方方教授，遂决定编撰一部IVF实验室技术方面的专著，将国内较多生殖中心成熟的实验室技术及经验与大家分享。本书汲取了编者们的成熟经验，并采用了大量的数据资料，部分观点的提出建立在大量临床及实验室数据分析的基础上。

本书共13章，从“体外受精-胚胎移植实验室的设计与建立”开始，以实际案例与大家分享我们的心得与体会，“体外受精-胚胎移植实验室的质量监控”详细介绍了实验室仪器的维护、校正、实验室技术人员的配置及培训、实验室环境及培养基的质量控制等，“配子的发生与发育”一章从生理学角度讲述了卵子和精子的发生与受精，第4~7章详细介绍了实验室精液分析与处理、胚胎体外发育、体外培养、体外评估及胚胎的异常现象，之后对配子/胚胎的冷冻保存、辅助孵化、卵子体外成熟、胚胎植入前遗传学诊断等重要的实验室操作技术分章节详细论述，最后总结了人类辅助生殖技术的伦理问题。

本书的编者均是国内外众多优秀生殖中心一线工作者和知名专家，在日常繁忙的工作中，本书的编写及反复修改无疑给每位编者增加了很多工作量，在此衷心感谢各位专家能

将自己的经验和心得与大家无私分享。同时特别感谢郎景和院士、庄广伦教授欣然为本书作序。

本书不仅对 IVF 实验室技术人员、临床医生、妇产科医生及相关学科医生及计划生育专业人员等有较高的实用价值，同时对卫生行政和计划生育部门的管理干部以及医学院校师生，也是一本有用的参考书。

编者真诚地希望本书能够对广大读者有所帮助。尽管我们竭尽全力，但限于编者的科学水平和时限性原因，文中难免存在不足之处，恳请广大读者不吝赐教并指正。

黄国宁

于北京

二〇一二年一月

第1章 体外受精-胚胎移植实验室的设计与建立	1
1.1 设计的基本原则	3
1.1.1 IVF实验室选址	3
1.1.2 IVF实验室面积	3
1.1.3 IVF实验室各功能室设置	3
1.1.4 IVF实验室的布局	4
1.1.5 新建IVF实验室的使用注意事项	4
1.1.6 气体、液氮、温度、湿度安全监控	4
1.1.7 安全性设计(防窒息、防火)	5
1.2 体外受精-胚胎移植实验室的建立	8
1.2.1 洁净要求(层流过滤装置)	8
1.2.2 室内装修	9
1.2.3 仪器配置	9
1.2.4 人员配备	11
第2章 体外受精-胚胎移植实验室的质量监控	13
2.1 实验室仪器的质量管理	15
2.1.1 仪器的维护	15
2.1.2 仪器校准与更新	17
2.2 实验室技术人员的质量控制	18
2.2.1 人员数量的确定	18
2.2.2 人员的职责分工	19
2.2.3 人员梯队建设及培训	20
2.2.4 人员操作技术的稳定性	22
2.3 实验室培养环境的质量控制	23
2.3.1 温度、湿度	23
2.3.2 尘埃	26
2.3.3 挥发性有机物	28
2.3.4 振动、噪音、光照等问题	30
2.4 胚胎培养体系的质量控制	32
2.4.1 耗材、培养基管理	32
2.4.2 耗材、培养基的质量控制方法	33

2.5 实验室安全控制	36
2.5.1 仪器设备的安全控制 (故障、污染)	36
2.5.2 操作人员的安全控制	37
2.5.3 配子/胚胎的操作安全控制	37
第3章 配子的发生与发育	47
3.1 精子的发生、成熟和获能	49
3.1.1 精子的发生和结构	49
3.1.2 精子的成熟	56
3.1.3 精子的获能	60
3.2 卵子的发生和成熟	62
3.2.1 卵子的发生	62
3.2.2 卵子的结构与功能	87
3.2.3 卵子的成熟	90
3.3 受精机制	95
3.3.1 卵母细胞激活的分子机制	96
3.3.2 卵母细胞激活: 细胞与分子机制	99
3.3.3 卵母细胞激活失败	103
3.3.4 人工卵细胞激活	106
3.3.5 顶体与顶体反应	110
3.3.6 精子穿过卵丘细胞	111
3.3.7 精子与透明带结合和穿透	111
3.3.8 精卵质膜融合	112
3.3.9 卵子的激活	113
3.3.10 原核形成与遗传物质融合	114
3.3.11 多精受精	115
第4章 精液检查与处理	133
4.1 精液分析概述	135
4.1.1 精液常规分析	135
4.1.2 精子形态学分析	141
4.1.3 精液分析质量控制	145
4.1.4 精浆生化检测	146
4.1.5 精子功能的特殊检查	148
4.2 手术取精	154
4.2.1 附睾取精术	154
4.2.2 睾丸取精术	155
4.3 精液的处理方法	156
4.3.1 精子参数与辅助生殖技术方法的选择	156

4.3.2 精液处理的方法与选择	156
4.3.3 密度梯度离心	156
4.3.4 直接上游法	157
4.3.5 简单洗涤法	157
4.3.6 特殊来源精子的处理	157

第5章 体外受精 161

5.1 常规体外受精	163
5.1.1 发展史	164
5.1.2 受精培养	166
5.1.3 受精判断	169
5.1.4 受精失败	169
5.2 显微受精	174
5.2.1 显微受精的发展史	174
5.2.2 透明带打孔/切割/透明带下受精	175
5.2.3 卵胞质内单精子注射受精	175

第6章 胚胎的体外培养 189

6.1 培养液	191
6.1.1 培养液的研究史	191
6.1.2 培养液的分类	191
6.2 培养液的组分	195
6.3 培养环境	206
6.3.1 pH	206
6.3.2 气体	208
6.4 体细胞共培养	209
6.5 培养液的保存和运输条件	211
6.6 培养方式	211
6.6.1 无油覆盖培养与有油覆盖培养	211
6.6.2 结合培养与单胚胎培养	212
6.7 体外培养的污染及处理	212
6.7.1 污染的发生率和菌种	212
6.7.2 培养系统污染的来源	212
6.7.3 菌精症对精子功能的影响	213
6.7.4 精液中微生物污染培养系统的概率	214
6.7.5 精液污染与妊娠的关系	214
6.7.6 培养液污染对胚胎的影响及处理	214
6.7.7 污染的预防	214

第7章 胚胎的评估与移植	225
7.1 卵子成熟度的评估	228
7.1.1 卵子质量评估标准	228
7.1.2 正常与异常卵子形态	229
7.1.3 卵子形态特征与受精及临床结局	231
7.2 合子评估	235
7.3 胚胎评估	235
7.3.1 分裂期胚胎形态学评估	236
7.3.2 囊胚期胚胎形态学评估	237
7.3.3 非侵入性胚胎评估	237
7.4 胚胎移植	243
7.4.1 移植胚胎的选择	243
7.4.2 移植胚胎的数量	244
7.4.3 胚胎移植技术	245
第8章 配子/胚胎的冷冻与复苏技术	257
8.1 发展史	259
8.2 冷冻复苏过程中的损伤	260
8.3 冷冻保护剂	263
8.3.1 渗透性冷冻保护剂	263
8.3.2 非渗透性冷冻保护剂	264
8.3.3 其他冷冻保护剂	264
8.3.4 冷冻保护剂的选择	265
8.4 冷冻方法	265
8.5 冷冻复苏应考虑的一些问题	272
8.6 精子的冷冻保存	275
8.7 卵母细胞冷冻保存	276
8.8 胚胎冷冻保存	278
8.9 记录与储藏	282
第9章 人工辅助孵化	301
9.1 胚胎的孵出、着床机制	303
9.1.1 透明带与胚胎孵出	303
9.1.2 胚胎辅助孵化的指征	304
9.1.3 辅助孵化的研究现状	305
9.2 辅助孵化的方法	305
9.2.1 机械法/透明带部分切割法	305

9.2.2 酸化法	306
9.2.3 酶消化法	306
9.2.4 激光法	306
第10章 人类精子、卵子及体外培养胚胎的异常现象	311
10.1 精子的异常现象	313
10.1.1 圆形(球形)头无顶体精子症	313
10.1.2 无活动精子症	313
10.1.3 精子核空泡	314
10.1.4 精子核DNA的损伤和异常	314
10.1.5 断头精子症	314
10.1.6 小头精子	315
10.2 卵子的异常现象	315
10.2.1 胞质异常	315
10.3 合子与胚胎的异常现象	317
10.3.1 受精异常	317
10.3.2 孤雌激活	319
10.3.3 胚胎发育速度及异常现象	321
10.4 ICSI受精失败	324
10.4.1 卵子原因导致的ICSI受精失败	324
10.4.2 精子原因导致的ICSI受精失败	324
第11章 植入前遗传学诊断	333
11.1 发展史	335
11.2 植入前遗传学诊断的临床应用	335
11.3 活检材料	345
11.3.1 极体	345
11.3.2 卵裂球	346
11.3.3 囊胚活检	346
11.4 活检方法	347
11.4.1 透明带打孔的方法	347
11.4.2 极体活检	348
11.4.3 卵裂球活检	349
11.4.4 囊胚滋养层细胞活检	350
11.5 遗传学诊断技术	351
11.5.1 荧光原位杂交技术	351
11.5.2 聚合酶链反应技术	363
11.5.3 光谱核型分析技术	368
11.5.4 比较基因组杂交技术	371

11.5.5 阵列 – 比较基因组杂交技术	375
11.6 植入前遗传学诊断的风险与安全性	378
11.6.1 植入前遗传学诊断有效而相对安全	378
11.6.2 植入前遗传学诊断仍存在一定的风险	378
第 12 章 未成熟卵母细胞的体外培养	389
12.1 未成熟卵母细胞体外成熟培养的历史	391
12.2 未成熟卵母细胞体外成熟培养周期的刺激方案	392
12.3 未成熟卵母细胞的收集	393
12.4 未成熟卵母细胞的体外成熟培养	393
12.5 成熟卵母细胞的体外受精及胚胎移植	394
12.6 临床效果	395
12.7 卵母细胞体外成熟培养的应用价值及适应证	395
12.8 结论	398
第 13 章 配子/胚胎的管理与伦理问题	403
13.1 配子/胚胎的冻存管理	405
13.1.1 配子/胚胎的冻存背景	405
13.1.2 配子/胚胎冻存管理	407
13.2 配子/胚胎使用的伦理问题	409
13.3 供精/供卵的管理	409
13.3.1 供精的管理	409
13.3.2 供卵的管理	411
13.3.3 配子捐赠的双盲和保密原则	412
13.4 代孕的问题	412
13.5 结语	414
索引	417

第 **1** 章

体外受精－胚胎移植实验室的 设计与建立