





图 24-4 玻璃化冷冻

氏吸管。使胚胎在 VS2 挪至不同位置至少 2 次，以彻底清洗。

(5) 将胚胎放至 cryotop 上；吸掉大部分 VS2，迅速将 cryotop 投入液氮。胚胎在 VS 中总计不得超过 60s。

#### 四、玻璃化解冻

步骤同卵子解冻。

能获得。总之，时差培养既提供了更为优质的培养环境，也为胚胎选择提供了可靠的依据，缩短了患者的助孕等待时间。

## 二、步骤

### 1. 授精方式为 IVF

(1) D0: 取卵日当天下午根据所获得卵子数预热胚胎专用培养皿和培养液，培养液为 G-I-Plus (图 26-2)。

(2) D1: 原核观察日，脱颗粒细胞后，将受精卵移入时差专用培养皿，放入时差培养箱，输入患者相关信息。



图 26-2 将受精卵移入时差专用培养皿

### 2. 授精方式为 R 或 ICSI

D0: 取卵日当天早晨 9 时预热胚胎专用培养皿和培养液，培养液为 G-I-Plus。授精方式为早补 (R) 的卵子，受精后 4 ~ 6h 脱颗粒细胞后，直接移入预热的专用培养皿。

授精方式为 ICSI 的卵子，ICSI 后直接移入专用培养皿。

胚胎培养至 D3，根据专用的胚胎 D3 评分模型对所有胚胎逐一评分，选择最优质的胚胎移植，其余可利用胚胎冷冻保存。

### 3. 时差培养的囊胚培养

(1) D3: 在胚胎常规时差培养的基础上，对卵裂期胚胎进行评分。

行囊胚培养者，将时差专用培养皿移出时差培养箱，在体视镜下按顺序逐一移出每一胚胎培养孔中的培养液 G-I-Plus 20 $\mu$ l，迅速将 37 $^{\circ}$ C 预热、7% CO<sub>2</sub> 过夜平衡的 G-II-Plus 逐一加入胚胎培养孔中，每孔 20 $\mu$ l。专用培养皿放回时差培养箱继续培养。

(2) D5: 对胚胎按专用的 D5 评分模式逐一进行评分，选择囊胚移植或冷冻。剩余胚胎继续培养。

## 内 容 简 介

越来越多的不孕不育患者通过辅助生殖技术实现了为人父母的愿望。本书以图文并茂的形式详细介绍了目前国内大多数试管婴儿相关实验室技术的操作流程,包括取卵、精子优选、体外受精、胚胎移植、胚胎培养等的基本流程,也包括胚胎植入前遗传学诊断和筛查、时差培养等新技术,为实验室工作人员提供一套规范的操作程序,让初学者依靠本书的指导即能完成人类体外受精实验室的所有相关操作。

本书适于人类辅助生殖实验室工作人员,生殖科医师、护士,妇产科医师、护士及相关科研人员阅读参考。

---

### 图书在版编目(CIP)数据

人类体外受精胚胎移植实验室操作手册 / 张学红主编. —北京: 科学出版社, 2020.5

ISBN 978-7-03-064779-5

I. ①人… II. ①张… III. ①体外受精—胚胎移植—实验室—手册  
IV. ①R321-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2020)第 055997 号

---

责任编辑: 郭 颖 / 责任校对: 郑金红

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 龙 岩

版权所有, 违者必究, 未经本社许可, 数字图书馆不得使用

**科 学 出 版 社** 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

**北京九天鸿程印刷有限责任公司** 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2020 年 5 月第 一 版 开本: 720 × 1000 1/16

2020 年 5 月第一次印刷 印张: 7 3/4

字数: 110 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

# 前言

受现代社会压力和生活方式的影响，中国育龄期不孕不育夫妇数以万计，加之生育观念的改变和国家生育政策的影响，高龄夫妇有生育需求的比例也日渐增多。我国辅助生殖技术虽然起步较晚，但发展迅速，目前已成为医疗常规，为广大人民群众所接受。目前全国共有498家生殖中心，每年完成几十万例体外受精（IVF）/卵质内单精子注射（ICSI）周期，越来越多的不孕不育患者通过辅助生殖这项20世纪的新兴技术达成了为人父母的愿望。

随着新增生殖中心的涌现和患者数量的迅猛增长，全国辅助生殖技术从业人员的数量也呈级数增加，越来越多的年轻医师需要接受规范化培训。同时，辅助生殖的相关新技术也不断产生，造福于更多患者。这些都促使生殖医学从业者在日常工作中不仅要注重基础理论、基本技能的学习，还要不断更新思想、更新知识，在保证成功率的前提下寻求自身突破。

兰州大学第一医院生殖医学专科医院成立于2001年，率先在西北地区开展试管婴儿及其衍生技术的科研和临床工作，成功填补了该专业西北地区的9项技术空白，2006年被评为卫生部人类辅助生殖技术十大培训基地之一。迄今为止，我院已培养合格的生殖专业临床和实验室医师400余名，故而深知广大生殖医学工作者的具体需求。编者本着服务广大实验室医师及临床医师的初衷编写本书，结合多年来的实践经验，详细介绍了目前国内大多数试管婴儿相关实验室技术的操作流程，包括胚胎植入前遗传学诊断和筛查及时差培养等新技术。本书注重理论基础和实践操作的结合，旨在为实验室工作人员提供一套规范的操作程序，目标是让初学者依靠本手册的指导即能完成IVF实验室的所有相关操作。

由于编者经验有限，尽管竭尽全力仍难免存在不妥之处，恳请广大读者提出宝贵意见。

张学红

兰州大学第一医院生殖医学专科医院 院长

中华医学会生殖医学分会 常务委员

甘肃省生殖医学专业委员会 主任委员

# 操作视频目录

---

## ICSI操作

ICSI



去除颗粒细胞1



去除颗粒细胞2



睾丸穿刺精子挑选



精子制动



洗针



装针



时差培养

卵裂期



囊胚期



活检



# 换液和评价受精

## 一、原理

换液和评价受精包括去除卵周颗粒细胞（仅限授精方式为IVF者）、将受精卵/卵母细胞移至新的G-I-Plus皿和在相差显微镜下观察原核。原核在受精后16~18h出现，融合后即消失。

## 二、步骤

1. 评价受精情况前，拉制无菌吸管，解剖镜下检查口径是否合适，一般直径为150~180 $\mu$ m即可。

2. 授精方式为IVF，授精后18~20h，用拨卵针将受精卵/卵母细胞周围的颗粒细胞清除干净。拉制的无菌吸管将所有受精卵/卵母细胞转入D0准备、预热平衡的G-I-Plus漂洗皿中清洗3~4次。挑出具有2PN（2-pronucleus）的正常受精卵以及1PN及0PN者放置于新的G-I-Plus皿。倒置显微镜下再次确认原核情况，并进行原核评分。三气培养箱继续培养。

3. 授精方式为ICSI，G-I-Plus漂洗皿清洗后挑出具有2PN的正常受精卵放置于新的G-I-Plus皿。倒置显微镜下再次确认原核情况，并进行原核评分。三气培养箱继续培养。

4. 授精方式为EARLY RESCUE，拉制的无菌吸管将所有受精卵/卵母细胞转入G-I-Plus漂洗皿中清洗3~4次。挑出具有2PN的正常受精卵以及1PN及0PN者放置于新的G-I-Plus皿。倒置显微镜下再次确认原核情况，并进行原核评分。三气培养箱继续培养。

5. 所有的多倍体（>2PN）和退化的卵子都是无法生存的，应丢弃。

6. 在胚胎记录单上记录所有卵子的受精情况，去除颗粒细胞过程中有卵子损伤或空透明带等情况都应如实记录。

7. 原核评分标准见附录2，受精情况描述如下。

0PN：胞质中未见原核，有1个或2个极体。

1PN：胞质中可见1个原核，有1个或2个极体。

2PN：胞质中可见2个原核为正常受精合子。

多PN：胞质中可见 $\geq 3$ 个原核，丢弃。

第20章	D2、D3胚胎评分	62
第21章	囊胚培养	64
第22章	胚胎移植标准和操作步骤	65
第23章	卵子冷冻与解冻	67
第24章	胚胎冷冻与解冻	69
第25章	辅助孵化	73
第26章	时差培养	74
第27章	胚胎植入前遗传学诊断	77
第28章	胚胎植入前遗传学筛查	80
<b>附录</b>		<b>83</b>
附录1	卵子成熟度分级	85
附录2	原核评分标准 (Scott评分)	86
附录3	囊胚期胚胎评分标准	87
附录4	质控内容表	89
附录5	登记本一览表	90
<b>参考文献</b>		<b>114</b>

## 第一部分▶

# IVF实验室的建立



## 实验室的选址、布局

胚胎实验室是进行人类配子以及胚胎体外操作和培养的場所，是辅助生育技术的核心部门。设置合理的胚胎实验室是辅助生殖技术成功的基本条件之一。以下将从胚胎实验室的选址、布局及净化等方面一一阐述。

### 一、选址

胚胎实验室的选址应充分考虑周围环境是否对配子及胚胎存在潜在的不利影响。现有研究已经证明，周围环境与人类生殖和发育密切相关，如外环境中的射线、高温、噪音，职业接触麻醉药物，嗜好烟、酒等均对妊娠及胎儿存在不利影响。而植入前的胚胎，即辅助生殖过程中的配子及胚胎，因缺乏母体的保护，理论上更易受到伤害，当外环境的刺激超过配子和胚胎自身的修复能力时，必然影响胚胎的发育潜能。据文献报道，空气质量与辅助生殖的妊娠率存在一定负相关性。因此，胚胎实验室的选址应远离建筑工地、污染严重的工厂、繁忙的交通要道等。在医院内部，胚胎实验室还应避免毗邻手术室、病理科、传染科、放射科、洗涤室、消毒室等。建议将胚胎实验室设置在相对独立和较高的楼层。

### 二、布局及净化区域设置

胚胎实验室主要由手术室、实验室和辅助房间组成。其中，手术室包括取卵室和移植室；实验室包括胚胎培养室、精液处理室和冷冻储存室；辅助房间包括取精室、耗材试剂库、液氮和气瓶储存室、麻醉复苏区及其他办公用房等。

根据原卫生部《卫生部人类辅助生殖技术与人类精子库技术规范基本标准和伦理原则》（卫科教发〔2003〕176号）的规定，取卵室面积应不小于 $25\text{m}^2$ ，移植室面积应不小于 $15\text{m}^2$ ，胚胎培养室应不小于 $30\text{m}^2$ ，精液处理室应不小于 $10\text{m}^2$ 。但这是最基础的要求，按此规定建立的胚胎实验室仅能满足年周期数较少的中心。随着辅助生殖技术的迅猛发展和助孕患者的增多，在设计布局之初，即应考虑到胚胎实验室的面积布局能否满足未来数年周期数日益增长的需求。否则，狭小的空间将最终限制生殖中心的长远发展。

在胚胎实验室内，应根据具体需求设置不同级别的空气净化层流室。胚胎培养室应为千级净化，其中操作配子及胚胎的工作站内为百级净化；手术室和其他实验区域为万级净化；取精室为十万级净化；其他辅助房间如耗材试剂库、液氮

和气瓶储存室及其他办公用房可设置在非净化区域。

### 1. 手术室

(1) 取卵室：用于取卵手术，与胚胎培养室以传递窗相通。取卵手术实施麻醉的中心须准备呼吸机等急救设备。

(2) 移植室：用于胚胎移植手术，与胚胎培养室之间以传递窗或门相通，方便移植时传递装载胚胎的移植管。

### 2. 实验室

(1) 胚胎培养室：用于配子和胚胎的体外操作及培养。数个培养箱、工作站和显微操作仪等许多重要设备都摆放于此。培养室内所有设备的摆放必须合理规划，以方便使用，保证配子及胚胎的安全。

(2) 精液处理室：用于精液优选及冷冻等，与取精室以传递窗相通。

(3) 冷冻储存室：用于存放冷冻的胚胎、卵母细胞及精液。随着生殖中心的发展，储存的冷冻胚胎及配子数量必然不断增加，因此应预留较大的储存空间备用。

### 3. 辅助房间

(1) 取精室：与精液处理室相邻。至少设置两个或两个以上的取精室为宜。

(2) 其他：储存试剂、耗材、液氮、气瓶等区域以及人员办公区。储存耗材的房间可分为两部分。为方便使用，在风淋室外可储备少量耗材，如储备胚胎实验室1周的用量，这部分耗材需拆除外包装后才能带入。其余大部分耗材储存在专门的耗材库房。

## 三、胚胎实验室的装修与运行

胚胎实验室在建成、装修或整改时，不可避免地会使一些化合物长期存在于实验室内。如果存在较高浓度的对胚胎有毒性的挥发性化合物，必然会影响胚胎的发育潜能。胚胎实验室装修装饰时，不建议使用任何油漆。必要的漆料建筑材料应在使用前加以处理。实验室使用的粘合胶、密封剂等材料不能含有甲醛、苯甲醛、苯酚等。

新建成的胚胎实验室可通过提高室内温度和通风率的方法加快挥发性有机物的释放。新的实验室正式运行前，要有专门的机构检测各个房间的压力，送风口的风速是否达标；最好请专门的检测机构检测室内实际挥发性有机化合物（VOC）和微粒水平。

胚胎实验室正式运行后，每年需定期更换高效滤网。在更换滤网及之后的2周内，胚胎实验室停止培养工作。此时，也可通过提高室内温度和通风率的方法，加快高效滤网VOC的释放和排出。

# 实验室的主要设备

实验室的仪器设备是正常开展工作的基本保障,《人类辅助生殖技术规范》(卫科教发〔2003〕176号)对胚胎实验室应具备的基本设施有明确的规定。以下仅就重点设备加以阐述。

### 一、培养箱

培养箱是体外培养配子与胚胎的关键仪器。是否具备稳定合理的温度、湿度和气体浓度直接影响胚胎的发育潜能。目前市场上有多种培养箱可供选择。按加热方式的不同,二氧化碳培养箱可分为水套式和气套式两类。两类培养箱各有特色,水套式培养箱散热均匀,培养箱内温度波动较小;气套式培养箱加热快,温度恢复迅速。对培养箱内二氧化碳的调节主要是为了控制培养基的pH值。不同公司的培养基所要求的最佳pH并不相同,应以每日质控测得的培养基实际pH值为依据,设定培养箱的二氧化碳浓度。

有关体外培养胚胎是否需要低氧环境已经有大量的研究。多数研究认为,低氧(5%氧气)环境在卵裂期及囊胚培养期,特别是在囊胚培养期更有利于胚胎发育。在使用中,为了维持培养箱内培养环境的稳定,应尽量减少开启培养箱门的次数,避免或者减少培养环境的波动对胚胎及配子的影响。新型的桌面培养箱容积非常小,与传统培养箱比较,温度和气体浓度恢复迅速,有利于维持稳定的培养环境。

### 二、超净工作台

超净工作台用于配子和胚胎的体外操作以及备液等工作,应选择符合胚胎实验室的洁净标准以及满足胚胎实验室不同需求的不同种类的工作台。譬如选择噪声小、易清洁、运行稳定、配置体视显微镜以及自带热台的超净工作台用于胚胎操作;而洁净度高、噪声小、易清洁,没有配置体视显微镜的超净工作台可用于精液处理。在超净工作台的使用过程中,应注意定期维护以满足洁净要求。

### 三、显微镜

配子和胚胎的体外操作需要在显微镜下进行。市面上显微镜种类繁多,胚胎

实验室根据需求常配置生物学显微镜、解剖镜和倒置显微镜。

生物学显微镜：用于常规精液分析和精液优化前、后的评估。

解剖镜：又称体视镜。用于选卵、授精、转移胚胎、冷冻、解冻、移植等。由于用途广泛，应配置数台，方便使用。

倒置显微镜：用于显微操作、观察卵子、原核及胚胎评分。

#### 四、显微操作系统

显微操作系统目前有多个品牌可供选择。按照微量注射器的压力系统可分为油压和气压两类。油压系统的优点是灵敏度高，缺点是要向管道内加油；管道内不能有气泡，否则会影响操作。气压系统的优点是不用加油，缺点是压力传导相对欠缺，操作时会有“滞后”感。实验室的重要仪器如显微操作仪，除了满足日常使用外，至少应有一台使用良好的备用仪器以备不时之需（图2-1）。



图2-1 显微操作仪

#### 五、其他

医用冰箱用于储存各种试剂；离心机用于精液优选；CO<sub>2</sub>浓度测定仪用于测定和校准培养箱内CO<sub>2</sub>浓度；室内空气净化设备，对实验室内局部的空气进行净化和处理（表2-1）。

表 2-1 生殖医院常用仪器设备列表

设备名称	放置位置	备注
二氧化碳培养箱 (1)	胚胎室	二气
二氧化碳培养箱 (2)	胚胎室	二气
二氧化碳培养箱 (3)	胚胎室	二气
二氧化碳培养箱 (4)	胚胎室	二气
二氧化碳培养箱 (5)	胚胎室	二气
二氧化碳培养箱 (6)	胚胎室	二气
二氧化碳培养箱 (7)	胚胎室	二气
二氧化碳培养箱 (8)	精液处理间	二气
二氧化碳培养箱 (9)	人工授精室	二气
二氧化碳培养箱 (10)	胚胎室	未通气, 仅供恒温培养箱使用
二氧化碳培养箱 (11)	胚胎室	未通气, 仅供恒温培养箱使用
二氧化碳培养箱 (12)	胚胎室	三气
二氧化碳培养箱 (13)	胚胎室	三气
二氧化碳培养箱 (14)	胚胎室	三气
桌面培养箱 (1)	胚胎室	标准气
桌面培养箱 (2)	胚胎室	标准气
桌面培养箱 (3)	胚胎室	标准气
桌面培养箱 (4)	胚胎室	标准气
桌面培养箱 (5)	胚胎室	二气, 仅供捡卵时临时存放卵子
时差培养箱	胚胎室	三气
显微操作系统 (ICSI-1)	胚胎室	
显微操作系统 (ICSI-2)	胚胎室	
生物无菌操作台 (-1)	胚胎室	装有体视显微镜
生物无菌操作台 (-2)	胚胎室	装有体视显微镜
生物无菌操作台 (-3)	胚胎室	装有体视显微镜
生物无菌操作台 (-4)	精液处理间	无体视显微镜
微量分析天平	人工授精室	
桌上型离心机	精液处理间	
桌上型离心机	精液处理间	
桌上型离心机	精液处理间	
普通显微镜	精液处理间	
普通显微镜	人工授精室	
空气净化器 (1)	胚胎室	
空气净化器 (2)	胚胎室	

# 耗材与培养液

## 一、必备耗材

胚胎实验室常用耗材包括各种型号的培养皿、离心管、移液管等。为了保障工作的正常进行,胚胎实验室的耗材应由专人负责,每月至少清点一次库存。如物品未能按时送达应及时追踪。每日工作结束之后,清点胚胎培养室内的库存,及时补充消耗。培养室内仅存放两三天的用量即可。所有耗材在使用前经严格的质控实验合格后方能用于胚胎培养。

1. 培养皿 IVF实验室常用的培养皿品牌有BD Falcon<sup>TM</sup>、Nunc<sup>TM</sup>及Corning<sup>TM</sup>等。按直径区分,培养皿有35mm、60mm和100mm等规格。一般35mm培养皿用于培养胚胎以及常规IVF,60mm和100mm的培养皿用于卵母细胞的收集,60mm的培养皿还可用于胚胎或卵母细胞冷冻。其他特殊用途的培养皿,如Falcon 353653双井皿用于胚胎移植或胚胎解冻;Falcon 351006用于显微操作,包括卵胞浆(质)内单精子显微注射(ICSI)和卵裂期及囊胚期胚胎活检;四孔板用于胚胎或卵母细胞解冻。

每日工作结束,确定不再开启培养箱门后,大致估计第2日所用培养皿的数量。根据预计值,拆封培养皿的塑料包装,置于超净工作台内待用。

2. 显微操作针 显微操作针是IVF实验室必备的耗材之一,包括持卵针、注射针及活检针,主要用于显微授精和胚胎活检。显微操作针的品牌繁多,不同品牌的操作针在具体参数上存在差异,同一品牌也有多个型号可供选择。ICSI常用显微操作针的角度为30°或35°。持卵针用于固定卵母细胞,常用的持卵针外径(OD)约为120 $\mu\text{m}$ ,口径过小易导致卵母细胞固定不稳而发生转动。注射针用于将精子注入卵母细胞胞质,一般内径(ID)为5 $\mu\text{m}$ 左右,ID过小可能会损伤精子的头部;但ID过大,相应的OD也会增大,注射时会增加卵母细胞的损伤。胚胎活检的固定针可与ICSI的持卵针通用。活检针可根据活检类型选择不同的口径以及根据操作者的习惯选择平口或斜口的活检针。活检的类型一般为卵裂期活检卵裂球,囊胚期活检滋养层细胞和极体。

3. 胚胎实验室常用的其他耗材 见表3-1。