

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS XXXX—XXXX

人类辅助生殖技术实验室 卵子/胚胎冷冻 解冻技术操作规程

Technical code of operation for freezing and thawing technology of
eggs or embryos in human assisted reproductive technology laboratory

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

广西标准化协会 发 布

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 基本要求 1

 4.1 人员 1

 4.2 场所及设施设备 1

 4.3 试剂及耗材 1

5 卵母细胞冷冻解冻 2

 5.1 冷冻 2

 5.2 解冻 2

6 卵裂期胚胎冷冻解冻 2

 6.1 冷冻 3

 6.2 解冻 3

7 囊胚期胚胎冷冻解冻 3

 7.1 冷冻 3

 7.2 解冻 4

8 档案记录 4

参考文献 5

前 言

本文件参照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西医学会提出、归口并宣贯。

本文件起草单位：南宁市第二人民医院、山东中医药大学附属医院、武汉大学人民医院、广东省第二人民医院、华中科技大学同济医学院附属协和医院、南昌大学第一附属医院、宜春市妇幼保健院、广西医科大学第一附属医院、广西壮族自治区生殖医院、贵港市人民医院、玉林市妇幼保健院、桂平市人民医院、右江民族医学院附属医院、柳州市妇幼保健院、桂林医学院附属医院。

本文件主要起草人：许常龙、蒋满喜、江莉、牛向丽、舒德峰、李荣、聂玲、宋景艳、于艺、王雅琴、段超群、胡林林、杨其、杨曾瑜、张顺、王俊婷、欧湘红、翟丹梅、覃爱平、朱露露、陆清芳、刘冠良、马小星、潘晓、许定飞、陈自洪、邓志华、杨华、邹彦、李春苑、丘苗苗、曾建伟、韦永全、韦雅环、吴雨茵、韦秋敢、吴卓、谭庆英、张剑、邓李文、周玲、李宁、史秋雯、廖兰英、朱艺萍、朱俞欢、曾江辉、周元圆、苑丽华、相珊、曹现岭、郭子珍、牟珍妮、张良、刘聪、邓星、罗小琼。

人类辅助生殖技术实验室 卵子/胚胎冷冻解冻技术操作规程

1 范围

本文件界定了人类辅助生殖技术的术语和定义，确立了卵子/胚胎冷冻解冻技术操作的程序，规定了药品及耗材选择以及卵母细胞、卵裂期胚胎、囊胚期胚胎冷冻解冻的操作指示，描述的操作过程信息的追溯方法。

本文件适用于人类辅助生殖技术实验室进行的卵子/胚胎玻璃化冷冻解冻技术操作。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人类辅助生殖技术 human assisted reproductive technology;ART

运用医学技术和方法对配子，合子、胚胎进行人工操作，使不育夫妇妊娠的技术，包括人工授精和体外受精-胚胎移植技术及其各种衍生技术。

[来源：YY/T 0995-2015, 2.1]

3.2

玻璃化冷冻 vitrification

用高浓度的冷冻保护剂溶液置换细胞内水分，经超高速降温由液态转化为玻璃状非晶体化固体状态，从而避免细胞损伤的技术。

4 基本要求

4.1 人员

应符合《人类辅助生殖技术规范》的规定。

4.2 场所及设施设备

4.2.1 场所

应符合《人类辅助生殖技术规范》的规定。

4.2.2 设施设备

各类大中小型培养箱、超净台、体视显微镜、恒温设备（热板、恒温试管架、水浴锅）、液氮罐、冰箱等。

4.3 试剂及耗材

4.3.1 试剂

选择符合国家规定的玻璃化冷冻液（一般包括平衡液和冷冻液）、玻璃化解冻液（一般包括解冻液、稀释液和基础液）、受精培养液和囊胚培养液。

4.3.2 耗材

包括但不限于冷冻皿、解冻皿、吸管、剥卵针、液氮桶/盒、冷冻支架/套管、冷冻载体等耗材。

5 卵母细胞冷冻解冻

5.1 冷冻

5.1.1 操作前准备

- 5.1.1.1 试剂 2 种：平衡液和玻璃化冷冻液。
- 5.1.1.2 冷冻载体：玻璃化冷冻载体，载体标注的患者信息、卵母细胞编号及个数，载体颜色对应卵母细胞。
- 5.1.1.3 套管：标注的患者信息、储存罐号、冷冻日期、操作人员名字，套管使用不同颜色。
- 5.1.1.4 冷冻皿：标注患者信息。
- 5.1.1.5 液氮桶/盒：注入的液氮量应在载体装配操作时漫过载体。

5.1.2 实施操作

- 5.1.2.1 500 μ L 平衡液和 800 μ L 冷冻液在超净台内复温至室温。
- 5.1.2.2 将卵母细胞放到平衡液中静置 15 min，期间卵母细胞收缩又恢复。
- 5.1.2.3 将卵母细胞转入冷冻液，在其中轻缓转移至少 3 处，然后把卵母细胞放到载体前端，立刻浸入液氮，该步骤应在 1 min 内完成。
- 5.1.2.4 套紧杆帽后，放入套管，液氮罐中冻存。

5.1.3 注意事项

- 5.1.3.1 单人单皿，双人核对患者信息。
- 5.1.3.2 应用最少量的冷冻液在载体前段形成微滴，以获得最佳冷冻效果。
- 5.1.3.3 一支载体应冻存 ≤ 3 枚卵母细胞。
- 5.1.3.4 应避免反复冻融。
- 5.1.3.5 冷冻皿及时盖上皿盖，尽量避免渗透压改变。

5.2 解冻

5.2.1 操作前准备

- 5.2.1.1 试剂 3 种：解冻液、稀释液和基础液。
- 5.2.1.2 解冻皿：标注患者信息。
- 5.2.1.3 玻璃化冷冻液氮桶：注入的液氮量应在载体装配操作时漫过载体。
- 5.2.1.4 培养皿：受精培养液。

5.2.2 实施操作

- 5.2.2.1 500 μ L 解冻液复温至 37 $^{\circ}$ C，稀释液、基础液 1 和基础液 2 复温至室温。
- 5.2.2.2 在液氮中拔去载体帽，将载体前端插入解冻液中轻摇，让卵母细胞脱落，该步骤在 1 min 内完成。
- 5.2.2.3 将卵母细胞转入稀释液底部，静置 3 min。
- 5.2.2.4 将卵母细胞转入基础液 1 底部，轻缓清洗，静置 5 min。
- 5.2.2.5 将卵母细胞转入基础液 2 底部，轻缓清洗，静置 5 min。
- 5.2.2.6 应在 37 $^{\circ}$ C 条件下将卵母细胞移入培养皿，置于 37 $^{\circ}$ C 6%CO₂培养箱培养。

5.2.3 注意事项

- 5.2.3.1 单人单皿，解冻前应双人核对患者信息、冷冻日期、存放具体位置、冷冻套管颜色、载体颜色以及需解冻卵母细胞的序号。
- 5.2.3.2 应避免反复冻融。
- 5.2.3.3 解冻皿应及时盖上皿盖，尽量避免渗透压改变。

6 卵裂期胚胎冷冻解冻

6.1 冷冻

6.1.1 操作前准备

- 6.1.1.1 试剂 2 种：平衡液和玻璃化冷冻液。
- 6.1.1.2 冷冻载体：玻璃化冷冻载体，载体标注的患者信息、胚胎编号及个数，载体不同颜色对应胚胎发育天数。
- 6.1.1.3 套管：标注的患者信息、储存罐号、冷冻日期、操作人员名字，套管使用不同颜色。
- 6.1.1.4 冷冻皿：标注患者信息。
- 6.1.1.5 液氮桶/盒：注入的液氮量应在载体装配操作时漫过载体。

6.1.2 实施操作

- 6.1.2.1 500 μ L 平衡液和 800 μ L 冷冻液在超净台内复温至室温。
- 6.1.2.2 将胚胎放到平衡液中静置 7 min，期间胚胎收缩又恢复。
- 6.1.2.3 将胚胎转入冷冻液，在其中轻缓转移至少 3 处，然后把胚胎放到载体前端，立刻浸入液氮，该步骤应在 1 min 内完成。
- 6.1.2.4 套紧杆帽后，放入套管，液氮罐中冻存。

6.1.3 注意事项

- 6.1.3.1 单人单皿，双人核对患者信息。
- 6.1.3.2 应用最少量的冷冻液在载体前段形成微滴，以获得最佳冷冻效果。
- 6.1.3.3 一支载体应冻存 \leq 2 枚胚胎。
- 6.1.3.4 应避免反复冻融。
- 6.1.3.5 冷冻皿应及时盖上皿盖，尽量避免渗透压改变。

6.2 解冻

6.2.1 操作前准备

- 6.2.1.1 试剂 3 种：解冻液、稀释液和基础液。
- 6.2.1.2 解冻皿：标注患者信息。
- 6.2.1.3 玻璃化冷冻液氮桶：注入的液氮量应在载体装配操作时漫过载体。
- 6.2.1.4 培养皿：囊胚培养液。

6.2.2 实施操作

- 6.2.2.1 500 μ L 解冻液复温至 37 $^{\circ}$ C，稀释液、基础液 1 和基础液 2 复温至室温。
- 6.2.2.2 在液氮中拔去载体帽，将载体前端插入解冻液中轻摇，让胚胎脱落，该步骤在 1 min 内完成。
- 6.2.2.3 将胚胎转入稀释液底部，静置 3 min。
- 6.2.2.4 将胚胎转入基础液 1 底部，轻缓清洗，静置 5 min。
- 6.2.2.5 将胚胎转入基础液 2 底部，轻缓清洗，静置 5 min。
- 6.2.2.6 应在 37 $^{\circ}$ C 条件下将胚胎移入培养皿，置于 37 $^{\circ}$ C 6%CO₂培养箱培养。

6.2.3 注意事项

- 6.2.3.1 单人单皿，解冻前应双人核对患者信息、冷冻日期、存放具体位置、冷冻外套管颜色、载体颜色以及需解冻胚胎的序号。
- 6.2.3.2 应避免反复冻融。
- 6.2.3.3 解冻皿及时盖上皿盖，尽量避免渗透压改变。

7 囊胚期胚胎冷冻解冻

7.1 冷冻

7.1.1 操作前准备

7.1.1.1 试剂 2 种：平衡液和玻璃化冷冻液。

7.1.1.2 冷冻载体：玻璃化冷冻载体，载体标注的患者信息、胚胎编号及个数，载体不同颜色对应囊胚发育天数。

7.1.1.3 套管：标注的患者信息、储存罐号、冷冻日期、操作人员名字，套管使用不同颜色。

7.1.1.4 冷冻皿：标注患者信息。

7.1.1.5 液氮桶/盒：注入的液氮量应在载体装配操作时漫过载体。

7.1.1.6 激光法使囊胚塌陷，以利于冷冻时脱水。

7.1.2 实施操作

7.1.2.1 500 μ L 平衡液和 800 μ L 冷冻液在超净台内复温至室温。

7.1.2.2 将囊胚放到平衡液中静置 10 min，期间囊胚收缩又恢复。

7.1.2.3 将囊胚转入冷冻液，在其中轻缓转移至少 3 处，然后把囊胚放到载体前端，立刻浸入液氮，该步骤应在 1 min 内完成。

7.1.2.4 套紧杆帽后，放入套管，液氮罐中冻存。

7.1.3 注意事项

7.1.3.1 单人单皿，双人核对患者信息。

7.1.3.2 应用最少量的冷冻液在载体前段形成微滴，以获得最佳冷冻效果。

7.1.3.3 一支载体应冻存 1 枚囊胚。

7.1.3.4 应避免反复冻融。

7.1.3.5 冷冻皿应及时盖上皿盖，尽量避免渗透压改变。

7.2 解冻

7.2.1 操作前准备

7.2.1.1 试剂 3 种：解冻液、稀释液和基础液。

7.2.1.2 解冻皿：标注患者信息。

7.2.1.3 玻璃化冷冻液氮桶：注入的液氮量应在载体装配操作时漫过载体。

7.2.1.4 培养皿：囊胚培养液。

7.2.2 实施操作

7.2.2.1 500 μ L 解冻液复温至 37 $^{\circ}$ C，稀释液、基础液 1 和基础液 2 复温至室温。

7.2.2.2 在液氮中拔去载体帽，将载体前端插入解冻液中轻摇，让囊胚脱落，该步骤在 1 min 内完成。

7.2.2.3 将囊胚转入稀释液底部，静置 3 min。

7.2.2.4 将囊胚转入基础液 1 底部，轻缓清洗，静置 5 min。

7.2.2.5 将囊胚转入基础液 2 底部，轻缓清洗，静置 5 min。

7.2.2.6 应在 37 $^{\circ}$ C 条件下将囊胚移入培养皿，置于 37 $^{\circ}$ C 6%CO₂ 培养箱培养。

7.2.3 注意事项

7.2.3.1 单人单皿，解冻前应双人核对患者信息、冷冻日期、存放具体位置、冷冻外套管颜色、载体颜色以及需解冻囊胚的序号。

7.2.3.2 避免反复冻融。

7.2.3.3 解冻皿及时盖上皿盖，尽量避免渗透压改变。

8 档案记录

应对卵子/胚胎冷冻解冻技术操作的药品及耗材选择以及卵母细胞、卵裂期胚胎、囊胚期胚胎冷冻解冻过程进行记录，并妥善保管记录档案。

参 考 文 献

- [1] 人类辅助生殖技术规范(卫科教发〔2003〕176号)
 - [2] 中国医师协会生殖医学专业委员会. 人类卵母细胞与胚胎玻璃化冷冻中国专家共识(2023年)
 - [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2023, 43(9):879-886.
 - [3] YY/T 0995 人类辅助生殖技术用医疗器械 术语和定义
 - [4] 孙莹璞, 邓成艳, 等. 人类辅助生殖技术医生必读[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2023. 2
 - [5] 杨爱军, 牛焕付, 李晓云, 王雪楠, 等. 人类辅助生殖技术评审手册[M]. 北京: 科学出版社. 2024. 11
-