ICS 11.040.30
C 30

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1688—2021

人类辅助生殖技术用医疗器械 囊胚细胞染色和计数方法

Medical devices for human assisted reproductive technology—A method for blastocyst cell staining and counting

2021-03-09 发布　　2022-04-01 实施

国家药品监督管理局　发布

手机发送防伪码至13720982315
网站www.cntw315.com
电话4006982315
刮涂层 查真伪

中华人民共和国医药
行业标准
人类辅助生殖技术用医疗器械
囊胚细胞染色和计数方法
YY/T 1688—2021
*
中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销
*
开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 10 千字
2021年3月第一版 2021年3月第一次印刷
*
书号:155066·2-34569 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由中国食品药品检定研究院归口。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院、南京优而生物科技发展有限公司、中国科学院遗传与发育生物学研究所。

本标准主要起草人：韩倩倩、金星亮、尹艳云、王迎、方玉、王春仁。

人类辅助生殖技术用医疗器械
囊胚细胞染色和计数方法

1 范围

本标准规定了对小鼠囊胚细胞进行染色和计数的试验方法。

本标准适用于与配子和/或胚胎直接或间接接触的人类辅助生殖技术用医疗器械的安全性评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

YY/T 0995 人类辅助生殖技术用医疗器械 术语和定义

YY/T 1434 人类体外辅助生殖技术用医疗器械 体外鼠胚试验

3 术语、定义和缩略语

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 术语、定义

YY/T 0995 和 YY/T 1434 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

扩张囊胚 expanded blastocyst

囊胚腔已充分扩展，透明带变薄的囊胚。

3.1.2

孵化囊胚 hatching or hatched blastocyst

囊胚细胞部分或全部从透明带中逸出的囊胚。

3.1.3

内细胞团 inner cell mass

囊胚内层的一个细胞群，成团状分布，最终主要发育成胎儿。

3.1.4

滋养层细胞 trophectoderm cell

囊胚外层细胞，最终主要发育成胎盘。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PBS：磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline)

Hoechst 33342：双苯酰亚胺(bisbenzimide)

PFA：多聚甲醛(paraformaldehyde)

BSA：牛血清白蛋白(bovine serum albumin)

UTF1：未分化的胚胎细胞转录因子1(the undifferentiated embryonic cell transcription factor 1)
NANOG：(nanog homeobox)
DABCO：(1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane solution)
DNA：脱氧核糖核酸(deoxyribonucleotide acid)
PI：碘化丙啶(propidium iodine)
DAPI：4,6-联脒-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole)

4 试验方法

4.1 概述

囊胚期胚胎细胞主要包括内细胞团细胞和滋养层细胞。本试验利用DNA染色试剂与细胞核结合，对囊胚细胞进行染色，在荧光显微镜下观察，从而确定囊胚细胞总数。通过免疫荧光染色对内细胞团细胞表达的标记物进行染色，确定内细胞团细胞数。本标准中室温系指20 ℃～25 ℃。

注：anti-UTF1抗体、anti-NANOG抗体或其他经验证的抗体可用于内细胞团染色。

4.2 试剂

试剂如下：

a) 胚胎漂洗液：PBS(pH 7.2～pH 7.4)或其他。
b) DNA染色试剂：Hoechst 33342，DAPI，PI或其他。
c) 固定液：2%PFA或其他常用固定液。
d) 透膜液：固定液加0.3% 吐温-20和0.2%聚乙二醇辛基苯基醚(曲拉通 X 100)或其他。
e) 封闭液：30%与二级抗体同源的血清。
f) 抗体缓冲液：含2%BSA的PBS缓冲液或其他。
g) 初级抗体：anti-UTF1抗体或anti-NANOG抗体或能特异性识别内细胞团细胞的抗体。
h) 二级抗体：偶联荧光素并与初级抗体特异性结合的抗体。
i) 封片剂：凡士林或其他。
j) 抗淬灭剂：DABCO或其他。

4.3 耗材

耗材如下：

a) 眼科镊。
b) 载玻片。
c) 盖玻片。
d) 培养皿。

4.4 仪器

仪器如下：

a) 体视显微镜。
b) 荧光显微镜。

4.5 试验过程

4.5.1 囊胚收集

按照YY/T 1434进行囊胚培养，收集供试样品组和阴性对照组所有发育良好的囊胚，包括扩张囊

胚和孵化囊胚。

4.5.2 染色及计数程序

染色及计数程序如下：

a) 室温下，用 PBS 漂洗囊胚 3 次，放入 2% PFA 中固定 30 min；
b) 将囊胚转移至透膜液中，室温下 30 min；
c) PBS 漂洗囊胚 3 次，每次 10 min；
d) 囊胚置于 30%的动物血清（与二抗同源）1 h～3 h，以封闭非特异性的抗体结合位点；PBS 漂洗囊胚 1 次。
e) 4 ℃下与初级抗体结合 12 h；
f) PBS 漂洗囊胚 3 次，每次 10 min；
g) 室温、避光条件下与二级抗体结合 1 h；
h) PBS 漂洗囊胚 3 次，每次 10 min；
i) 根据二级抗体所联结的荧光色谱，将胚胎移至合适的 DNA 染色液（如 Hoechst 33342 染色液或 PI 等）中，室温避光条件下 30 min；
j) 制片：取抗淬灭剂 DABCO 滴于载玻片上，将囊胚置于 DABCO 液滴中，液滴四周以凡士林支撑，将盖玻片轻轻压到液滴上，与凡士林接触后适当加压，使囊胚充分延展；
k) 置于室温避光条件下 20 min；
l) 荧光显微镜下直接计数或根据染色囊胚的照片进行计数，初级抗体染色的细胞为内细胞团细胞，DNA 染色的细胞为囊胚总细胞。

注：本部分描述为通用操作步骤，可采用商品化的免疫荧光试剂盒完成。

4.6 结果分析

4.6.1 囊胚质量判断

发育良好的囊胚总细胞数≥50 个，内细胞团细胞数≥12 个。

4.6.2 结果统计

收集供试样品组和阴性对照组所有囊胚，每组样本量不少于 30 个囊胚，进行统计学分析。

4.7 试验报告内容

试验报告应包含如下信息：

a) 供试品信息和对照品信息；
b) 试验动物信息；
c) 试验条件；
d) 试验步骤；
e) 试验结果；
f) 试验结论。

YY/T 1688—2021

参 考 文 献

[1] Ganeshan L,Jin XL,O'Neill C. The induction of tumour suppressor protein P53 limits the entry of cells into the pluripotent inner cell mass lineage in the mouse embryo. Exp Cell Res. 2017 Sep 15;358(2):227-233.

[2] Pfeffer PL. Building Principles for Constructing a Mammalian Blastocyst Embryo. Biology (Basel). 2018 Jul 23;7(3).

[3] Wigger M,Kisielewska K,Filimonow K,Plusa B,Maleszewski M,Suwińska A. Plasticity of the inner cell mass in mouse blastocyst is restricted by the activity of FGF/MAPK pathway. Sci Rep. 2017 Nov 9;7(1):15136.

[4] Jin XL,O'Neill C. Systematic analysis of the factors that adversely affect the rate of cell accumulation in mouse embryos during their culture in vitro. Reprod Biol Endocrinol. 2014 May 8;12:35.

YY/T 1688-2021

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·2-34569

定价: 16.00 元