

长爪沙鼠超数排卵与取卵

Superovulation and Collection of Eggs in Mongolian Gerbils

杜小燕, 郭萌, 路静, 王妍, 李长龙, 陈振文*

基础医学院, 首都医科大学, 北京 100069

*通讯作者邮箱: c澤wen@ccmu.edu.cn

引用格式: 杜小燕, 郭萌, 路静, 王妍, 李长龙, 陈振文. (2021). 长爪沙鼠超数排卵与取. *Bio-101* e1010926. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010926.

How to cite: Du, X. Y., Guo, M., Lu, J., Wang, Y., Li, C. L., and Chen, Z., W. (2021). Superovulation and Collection of Eggs in Mongolian Gerbils. *Bio-101* e1010926. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010926. (in Chinese)

摘要: 超数排卵和取卵是建立一种实验动物的胚胎操作和基因工程等工作的基础。我们综合年龄、激素浓度和间隔时间等3方面因素,探索了长爪沙鼠超数排卵和取卵的方法。结果表明,年龄8周、激素10IU和间隔72小时是长爪沙鼠最佳超排方案,可获得数量较多质量较好的受精卵,为后续进行显微注射等工作奠定了良好基础。

关键词: 长爪沙鼠, 超数排卵, 激素浓度, 周龄, 激素间隔

材料与试剂

1. 35 mm无菌塑料培养皿 (Corning, catalog number: 430165)
2. PMSG (孕马血清促性腺激素) (中国宁波第二激素厂)
3. hCG (人绒毛膜促性腺激素) (中国宁波第二激素厂)
4. 氯化钠生理盐水注射液 (中国山东华鲁制药有限公司)
5. M2 培养基 (Sigma, catalog number: M7167)
6. M16 培养液 (Sigma, catalog number: M7292)
7. 透明质酸酶 (Sigma, catalog number: H3506)
8. 石蜡油 (Sigma Aldrich, catalog number: M8410)
9. 生理盐水 (国产)
10. 75%酒精 (国产)

11. 孕马血清促性腺激素（pregnant mare serum gonadotropin, PMSG）注射液（见溶液配方）
12. 人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin, hCG）注射液（见溶液配方）

仪器设备

1. 体视显微镜（Nikon）
2. 倒置显微镜（Nikon）
3. CO₂ 培养箱（美国Thermo Fisher Scientific公司）
4. 超净工作台（北京半导体设备一厂）
5. 灭菌手术器械（眼科剪、眼科镊、显微剪和显微镊等）

实验步骤

1. 长爪沙鼠超数排卵

选取6~8周雌性长爪沙鼠作为受精卵的供体沙鼠，体重45±10 g，以10 IU/只的剂量进行PMSG和hCG腹腔注射，注射间隔时间为70 h。具体步骤如下：在第1天16~17时腹腔注射PMSG，第4天14~15时腹腔注射hCG，剂量均为10 IU/只，即0.1 ml，注射激素后，将每只雌性沙鼠分别与一只雄性沙鼠合笼至第5天8时。

2. 取卵

①取卵前准备：取卵前1天制作微滴培养系统：向35 mm 细胞培养皿中滴加M2培养基，每一滴约20 μl，并加入2 ml石蜡油完全覆盖M2 培养液滴，将该培养系统放置于CO₂培养箱中平衡过夜，培养条件为37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度。同时将分装M2 培养基放置于CO₂ 培养箱中平衡过夜。

②取输卵管：在激素注射的第5天9~10时，将沙鼠于超净工作台中断颈处死，腹部朝上置于擦手纸上，用75%酒精喷洒沙鼠腹部进行消毒。用手术剪和镊子剖开腹部，暴露腹腔，并沿其子宫找到沙鼠的输卵管和卵巢，剪下沙鼠输卵管，移到预热的M2 培养基中。

③取卵：向35 mm 细胞培养皿中滴加200 μl 预热的M2 培养基，并在体视解剖镜下依次将沙鼠输卵管放入M2 液滴，体视显微镜下用显微镊划开输卵管膨大部时沙鼠

受精卵团流出。然后将获得的沙鼠受精卵用100 μl 透明质酸酶消化约1 min，期间用200 μl 移液器进行吹打，辅助消化。

④洗卵和培养：向35 mm 细胞培养皿中滴加4滴预热的M2 培养基，每滴约50 μl 。将获得的消化完全的沙鼠受精卵用口吸管移到新的M2 微滴中进行清洗，共清洗3~4 次，直至卵丘细胞完全脱落，获得形态好的单个受精卵。用口吸管将洗净的受精卵转移到事先准备好的微滴培养基中，放置于CO₂培养箱中进行培养。

溶液配方

1. 孕马血清促性腺激素（pregnant mare serum gonadotropin, PMSG）注射液
将一支PMSG 粉末（1000 IU/支）溶于10 ml 生理盐水中，充分溶解后，1 ml/管分装冻存，使用前低温溶解。
2. 人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin, hCG）注射液
将一支hCG 粉末（1000 IU）溶于10 ml 生理盐水中，充分溶解后分装冻存，使用前低温溶解。

致谢

感谢国家自然科学基金项目（Nos. 31572341, 31572348, 31772545）和国家科技支撑计划项目（No. 2015BAI09B00）的资助。

参考文献

1. 路静, 朱祥宇, 王超, 王迎, 陈振文 和 杜小燕 (2012). [周龄和激素水平对长爪沙鼠超数排卵效果的影响](#). 中国比较医学杂志 22(008): 15-17.
2. 唐旺, 李长龙, 杜小燕 和 陈振文 (2015). [PMSG和hCG诱导长爪沙鼠超数排卵方案的优化](#). 中国比较医学杂志 000(007): 59-63.
3. 唐旺. (2016). [长爪沙鼠CRISPR/Cas9基因敲除方法的初步建立](#). 首都医科大学.
4. 王妍, 陈振文. (2019). 利用CRISPR/Cas9技术构建基因敲除长爪沙鼠动物模型. 首都医科大学硕士学位论文.