长爪沙鼠胚胎显微注射（胞浆注射）

Embryo Microinjection(Cytoplasm Injection) in Mongolian Gerbils

郭萌¹, 王妍¹, 李长龙¹, 杜小燕¹, 陈振文^{1*}

¹基础医学院, 首都医科大学, 丰台区, 北京市

*通讯作者邮箱: czwen@ccmu.edu.cn

引用格式: 郭萌, 王妍, 李长龙, 杜小燕, 陈振文. (2021). 长爪沙鼠胚胎显微注射（胞浆注射）. *Bio-101* e1010929. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010929.

How to cite: Guo, M., Wang, Y., Li, C. L., Du, X., Y., and Chen, Z., W. (2021). Embryo Microinjection(Cytoplasm Injection) in Mongolian Gerbils. *Bio-101* e1010929. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010929. (in Chinese)

摘要: 由于长爪沙鼠（*Meriones unguiculatus*）特殊的生殖生理学和生殖行为学特点，其胚胎显微注射与小鼠稍有差别。本文介绍了长爪沙鼠胚胎显微注射的详细流程，通过这些操作可达到与小鼠相似注射成功率。本技术为构建基因编辑长爪沙鼠奠定了技术基础。

关键词: 长爪沙鼠，胚胎显微注射，原核期

材料与试剂

1. M2 培养基（美国 Sigma Aldrich 公司, catalog number: M7167）
2. 石蜡油（美国 Sigma Aldrich 公司, catalog number: M8410）
3. 透明质酸酶（美国 Sigma Aldrich 公司, catalog number: H3506）
4. 35 mm、10 cm 细胞培养皿（美国 Corning 公司, catalog number: 430165, 430167）
5. 显微注射针（德国 Eppendorf 公司, catalog number: D264750N）
6. 移卵用 2.5 mm 毛细玻璃管（北京正天易科贸有限责任公司, catalog number: BJ40）
7. 透明质酸酶溶液（见溶液配方）

仪器设备

1. 显微操作注射系统（德国 Eppendorf 公司, model: 51760018）
2. 荧光倒置相差显微镜（德国 Leica 公司, model: DMi8）

3. 恒温二氧化碳培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，model: Heracell VIOS 250i）
4. 煅针仪（日本成茂公司，model: MF-900）

实验步骤

1. 取卵前准备

取卵前一天即制作微滴培养系统：向 35 mm 细胞培养皿中滴加 M2 培养基，每一滴约 20 μ l，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 培养基和自制 M2 培养液放置于 CO₂ 培养箱中平衡过夜。

2. 取输卵管

在激素注射的第五天（即 hCG 注射并合笼后的第二天早上）9~10 时，将沙鼠于超净工作台中断颈处死，腹部朝上放置于擦手纸上，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，并沿沙鼠子宫找到沙鼠的输卵管和卵巢，剪下沙鼠的输卵管，收集到预热的 M2 培养基中。

3. 取卵

向 10 cm 细胞培养皿中滴加 200 μ l 预热的 M2 培养基，并在体视解剖镜下依次将沙鼠输卵管放在 M2 液滴中，在镜下用显微镊划开输卵管膨大部时沙鼠受精卵团流出。之后将获得的沙鼠受精卵用 100 μ l 浓度为 300 μ g/ml 的透明质酸酶消化约 1 分钟，期间用 200 μ l 移液器进行吹打，辅助消化。

4. 洗卵和培养

向 10 cm 细胞培养皿中滴加 4 滴预热的 M2 培养基，每滴约 50 μ l。将获得的与卵丘细胞分离的沙鼠受精卵转用口吸管移到新的 M2 微滴中进行清洗，一共清洗 3~4 次，直至卵丘细胞完全脱落。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。

5. Cas9/gRNA 注射体系准备

用 DEPC 水稀释 gRNA 和 Cas9 蛋白质（M0646T，NEB），使 gRNA 的终浓度为 50 ng/ μ l、Cas9 蛋白质为 32 ng/ μ l。稀释后的混合液在 4 °C 下 14,000 $\times$ g 离心 30 分钟，上清液分装后-80 °C 保存，注射前冰上融化。

6. 显微注射系统的安装

在带有金属支架的玻璃注射皿中滴加 M2 液滴，用石蜡油进行覆盖，并在 CO₂ 培养箱中 37 °C 平衡 2 小时以上。之后调节显微注射显微镜和显微操作仪。其中，显微注射 Cas9/gRNA 体系冰上溶解后，4 °C 下 14,000 rcf 离心 15 分钟，用移液器将上清液加到注射针中，去除气泡。

7. 胞质显微注射

在下午 2 时左右（沙鼠原核期受精卵比例最高），将上午 10 时左右培养的沙鼠受精卵取出，在 M2 培养基中清洗一次后，用口吸管将受精卵转移到显微注射的 M2 微滴中，用显微注射仪将 Cas9/gRNA 体系注射到长爪沙鼠受精卵的胞质中，注射剂量为 3~10 pL。显微注射完成后，用口吸管将存活的受精卵转移到新的 M2 微滴中，在 CO₂ 培养箱中继续进行培养或进行胚胎移植。

溶液配方

1. 透明质酸酶溶液

将 30 mg 透明质酸酶加入到 3 ml M2 培养基溶解，获得 10 mg/ml 储备溶液。储存于 -20 °C 冰箱。

使用时用 M2 培养基稀释至 300 µg/ml 的最终工作浓度。

致谢

1. 本研究得到国家自然科学基金（31672375, 31872308, 31970512, 31572348）和“十三五”时期北京市属高校高水平教师队伍建设支持计划(IDHT20170516)资助。
2. 感谢清华大学实验动物中心常在主任和中国科学院动物研究所实验动物中心多曙光主任在受精卵注射方面的支持与帮助。

参考文献

1. 王妍. (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.
2. Wang, Y., Zhao, P., Song, Z., Du, X., Huo, X., Lu, J., Liu, X., Lv, J., Li, C., Guo, M. and Chen, Z. (2020). [Generation of gene-knockout Mongolian gerbils via CRISPR/Cas9 system](#). *Front Bioeng Biotechnol* 8: 780.