

小鼠体外受精

In Vitro Fertilization of Mouse

杨伟伟¹, 顾美儿¹, 桂飞¹, 宋晓明¹, 孙筱品¹, 唐蔚², 吴宝金² *

¹ 实验动物中心, 杭州师范大学, 杭州, 浙江; ² 动物实验技术平台, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海

*通讯作者邮箱: baojin.wu@sibcb.ac.cn

引用格式: 杨伟伟, 顾美儿, 桂飞, 宋晓明, 孙筱品, 唐蔚, 吴宝金. (2022). 小鼠体外受精. *Bio-101* e1010947. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010947.

How to cite: Yang, W. W., Gu, M. E., Gui, F., Song, X. M., Sun, X. P., Tang, W. and Wu, B. J. (2022). In Vitro Fertilization of Mouse. *Bio-101* e1010947. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010947. (in Chinese)

摘要: 小鼠体外受精实验是基因工程小鼠的辅助生殖及遗传工程小鼠精子库的重要支撑技术。在常规 In Vitro Fertilization(IVF)操作的基础上, Nakagata 改良法在 modified human tubal fluid (mHTF)中加入 Reduced glutathione(GSH)作为受精液 (mHTF-GSH), 在 modified Krebs-Ringer's bicarbonate medium 中加入 Methyl- β -cyclodextrin 作为获能液 (TYH with M β CD), 显著提升了体外受精效率。该法适用于新鲜及冷冻复苏精子的体外受精操作。

关键词: 小鼠, mHTF-GSH, TYH with M β CD, 体外受精

材料与试剂

材料

- 1.培养皿 35mm×10mm (Corning, 货号: 430588)
- 2.胚胎移植口吸管 (北京吉田生物科技有限公司, 规格: 1.0×500mm)
- 3.吸头 (Axygen, 货号: T-300-R-S、T-1000-B-R-S、T-200-Y-R-S)
- 4.无菌注射器 (上海米沙瓦医科工业有限公司, 规格: 1mL)
- 5.50mL 离心管 (BD, 货号: 352070)
- 6.滤纸 (宝威德, 规格: 60 × 60 cm)

动物: 3-6 月龄成年雄鼠, 1-2 只/品系。4-5 周龄雌性供体小鼠, 4-5 只/品系 (根据雄性小鼠背景品系选用)。本实验室所用动物来自杭州师范大学实验动物中心 (生产许可

证号：SCXK（浙）2016-0004，使用许可证号：SYXK（浙）2016-0014），饲养在独立换气笼盒系统，动物自由饮水、自由采食经 Co⁶⁰ 辐射的灭菌饲料。

试剂

- 1.注射用血促性素（PMSG, Pregnant Mare Serum Gonadotropin）(宁波市三生药业有限公司, 规格:1000IU×10 瓶)和注射用绒促性素（hCG, human Chorionic Gonadotropin,）(宁波市三生药业有限公司, 规格:1000IU×10 支)
- 2.矿物油（Sigma, 货号：M8410）
- 3.mHTF：按表 1 配制。
- 4.mHTF-GSH：按表 2 配制。
- 5.TYH with M β CD（TYH with Methyl- β -cyclodextrin）按表 3 配制。

仪器设备

- 1.100mL 烧杯（蜀牛，货号：GG-17）
- 2.100mL 容量瓶（天玻，货号：TB9）
- 3.生物安全柜（Thermo Scientific, 型号：1384 ）
- 4.超净工作台（苏净安泰，型号：HS-840-U）
- 5.CO₂ 培养箱（Thermo Scientific, 型号：3111 ）
- 6.体视显微镜（Nikon, 型号： SMZ745T）
- 7.电子天平（Sartorius, 型号：MSA125P-CE）
- 8.电热恒温水浴锅（上海精宏实验设备有限公司，型号：DK-S22 型）
- 9.微量移液器（eppendorf, 货号：3120000224、3120000240）
- 10.手术剪（上海金钟，型号：J21010）
- 11.医用镊（上海金钟，型号：J40120）
- 12.维纳斯剪（上海金钟，型号：YC0040）
- 13.显微镊（上海金钟，型号：WA3030）
- 14.眼科直剪（上海金钟，型号：Y00030）
- 15.眼科直镊（上海金钟，型号：JD1050）

实验步骤

一、准备工作

- 1.超数排卵：供体小鼠腹腔注射 PMSG，每只 5IU（0.1mL）。46-48h 后，腹腔注射 hCG，每只 5IU（0.1mL）。
- 2.精子获能滴（TYH with M β CD，如图 1-A）：用 TYH with M β CD 液在培养皿内做一个 100 μ L 液滴（冻存精液滴为 90 μ L），加 3-4mL 矿物油覆盖，在培养箱（37 $^{\circ}$ C、5%CO₂）孵育至少 30min。
- 3.受精滴（mHTF-GSH，如图 1-B）：用 mHTF-GSH 液在培养皿内做两个 200 μ L 液滴（冻存精液滴为 90 μ L），加 3-4mL 矿物油覆盖，在培养箱（37 $^{\circ}$ C、5%CO₂）孵育至少 10min。
- 4.清洗滴（mHTF，如图 1-C）：用 mHTF 液在培养皿内做 3 个 80 μ L 液滴和 1 个 160 μ L 液滴，加 3-4mL 矿物油覆盖，在培养箱（37 $^{\circ}$ C、5%CO₂）孵育至少 30min。
- 5.水浴准备：恒温水浴锅开启 37 $^{\circ}$ C 水浴。



图 1. 小鼠体外受精实验培养滴 A. 精子获能滴（TYH with M β CD） B. 受精滴（mHTF-GSH） C. 清洗滴（mHTF），胚胎按照图中白色箭头方向清洗转移

二、操作流程

1.精子的采集及获能

- a.新鲜精液的采集（如图 2-A,B）及获能：打开生物安全柜，准备手术剪、医用镊、眼科镊、眼科剪等。紫外灯消毒 15min。小鼠脱颈椎处死，酒精消毒，打开腹腔取出附睾尾，去除脂肪并在滤纸上吸干。将附睾尾放入 TYH with M β CD 滴培养皿的矿物油中，显微镜下用维纳斯剪剪开，释放精液，并用显微镊牵引精液团至 TYH with M β CD 滴中。将其放入培养箱（37℃、5%CO₂）孵育 50-60min 获能。
- b.冷冻精子的复苏（如图 2-C）及获能：从液氮内取出冻存麦管，在空气中停留 5sec，快速放入 37℃的水浴锅中，孵育 10min。取出麦管擦干，麦管上端密封口和 mHTF 液之间剪开，用食指密封固定麦管一端，同时在另一端密封口位置剪开麦管，慢慢释放精液至 TYH with M β CD 滴中（勿将上端的 mHTF 放入），再将其放入培养箱（37℃、5%CO₂）孵育 50-60min 获能。
- 2.卵母细胞采集（如图 2-D,E,F）：将注射 hCG 的供体小鼠（15-17h 后）断颈处死，酒精消毒。剪开背部皮肤，快速找到输卵管，在滤纸上吸干，放入受精滴培养皿的矿物油中。在显微镜下找到膨大部，牵引卵丘团流出，并将其拖入 mHTF-GSH 滴中（取至 4-6 簇卵丘团）。注意：为保证质量，在处死动物到卵丘团放入液滴的过程中，务必在 30sec 内完成。
- 3.体外受精（如图 2-G,H）：精液孵育 50-60min 后，观察精子活力，并沿着 TYH with M β CD 滴的外围用移液器吸取 4-5 μ L 精液（冷冻复苏精液可根据精子活力及浓度增加量至 10-20 μ L），放入含有卵母细胞的 mHTF-GSH 滴中，并将其放入培养箱（37℃、5%CO₂）培养 3h。
- 4.清洗：受精后培养 3h，将细胞先转入 80 μ L 的 mHTF 滴中，3 次清洗后，转入 160 μ L 的 mHTF 滴培养 6h，去除未受精的卵母细胞和含有单原核的孤雌生殖卵母细胞，保留含有第二极体和两个原核的受精卵细胞（如图 2-I,J）。
- 5.受精卵过夜培养：次日挑选发育正常的 2-细胞（如图 2-K），用胚胎移植口吸管转移至 mHTF 的第 4 个滴中，移植或者胚胎冻存储备用。同时记录 2-细胞、单细胞和异型细胞的数量，计算受精率。

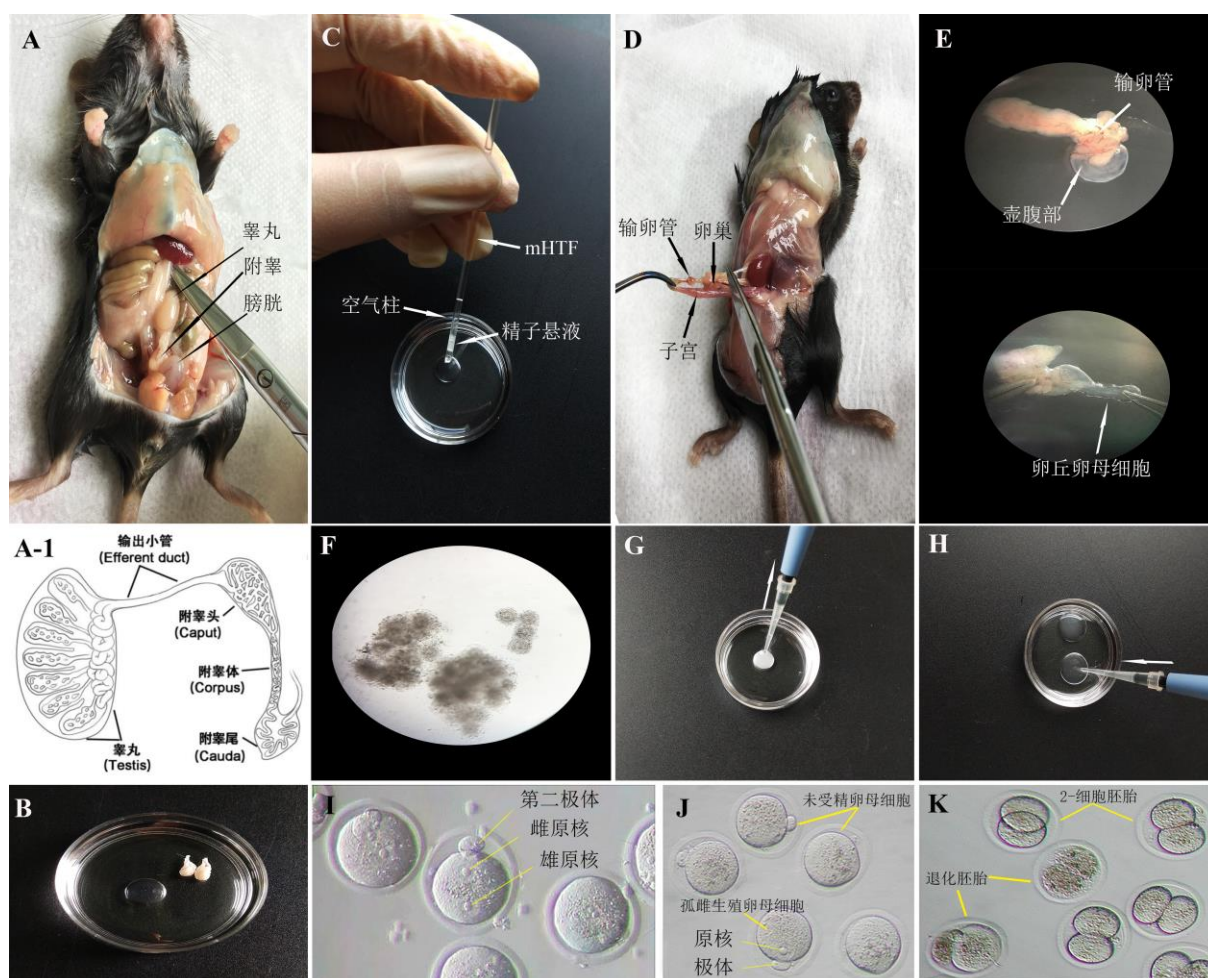


图 2. 小鼠体外受精过程. A. 附睾的解剖位置 A-1. 附睾组织结构图 B. 取出的附睾尾 C. 冷冻精子复苏精液 D. 输卵管解剖位置 E. 输卵管壶腹部 F. 卵母细胞-卵丘团 G. 获能完成的精子悬液 H. 受精 I、J. 受精 6 小时后细胞形态 K. 受精 24 小时后细胞形态

溶液配方

1.mHTF 配制表

2.mHTF-GSH 配制表

3.TYH with M β CD 配制表

表 1: mHTF 配制表 (100mL 体积)

名称	重量 (mg)	品牌	货号
NaCl	593.8	Sigma	S-5886
KCl	35.0	Sigma	P-5405
CaCl ₂	57.0	Sigma	G-5670
Glucose	50.0	Sigma	G-6152
MgSO ₄	2.4	Sigma	M2643
KH ₂ PO ₄	5.4	Sigma	P-5655
Sodium pyruvate	3.5	Sigma	P-4562
60% sodium lactate	0.34mL	Sigma	L-7900
NaHCO ₃	210.0	Sigma	S-5761
Penicillin G	7.5	BD	C15935000
Streptomycin	5.0	Sigma	S-1277
Bovine serum albumin	400.0	Sigma	B2064
0.5% phenol red	0.04ml	Sigma	P-0290

配制方法: 在 100mL 的烧杯中, 加入 80mL 的灭菌水(Sigma,W1503), 将上述药品依次加入混匀, 容量瓶定容至 100mL。0.22μm 针式过滤器过滤分装在 1.5mL 的离心管内。4℃保存可用 30 天。

表 2: mHTF-GSH 配制 (1mL 体积)

名称	重量 (mg)	品牌	货号
GSH	1.5	Sigma	G4251
mHTF	1 (mL)	-	无

注: “-” 为混合试剂, 配方参见表 1

配制方法: 称取 1.5mg(冷冻精液取 3.1mg)的 GSH, 溶解在装有 mHTF(1mL)的 1.5mL 离心管内, 再分次将 100μL 上述溶液转移至装有 mHTF (900μL) 的 1.5mL 离心管内, 混匀密封, -20℃冷冻保存备用, 有效期约 30 天。

表 3: TYH with M β CD 配制 (100mL 体积)

名称	重量 (mg)	品牌	货号
NaCl	697.6	Sigma	S-5886
KCl	35.6	Sigma	P-5405
CaCl ₂ ·2H ₂ O	25.1	Sigma	G-5670
Glucose	100.0	Sigma	G-6152
MgSO ₄	14.3	Sigma	M2643
KH ₂ PO ₄	16.2	Sigma	P-5655
Sodium pyruvate	5.5	Sigma	P-4562
Polyvinyl alcohol	100.0	Sigma	P-8136
Penicillin G	7.5	BD	C15935000
Streptomycin	5.0	Sigma	S-1277
Methyl- β -cyclodextrin	98.3	Sigma	C-4555
NaHCO ₃	210.6	Sigma	S-5761

配制方法: 在 100mL 烧杯中加入 70mL 的灭菌水 (Sigma,W1503), 将上述药品依次加入, 混匀; 同时, 100mg (Polyvinyl alcohol) 放入含有 10mL 灭菌水的离心管中, 60℃ 水浴 10min, 溶解后加入烧杯中, 再依次加入其它试剂溶解, 最后定容至 100mL。0.22 μ M 针式过滤器过滤分装在 1.5mL 的离心管内。4℃ 保存可用 30 天。

PMSG 配制方法: 将 1000IU /支的 PMSG 稀释在 20mL 灭菌水中, 制成 50IU/mL 的备用液。 -20℃ 冷冻保存可使用 14 天。

hCG 配制方法: 将 1000IU/支的 hCG 稀释在 20mL 灭菌水中, 制成 50IU/mL 的备用液。 -20℃ 冷冻保存可使用 14 天。

经验体会

1. 供体小鼠年龄的要求, 常用 4-5 周龄背景品系雌鼠, 超排效果较好, 获取的卵母细胞数量较多。6-8 周龄小鼠的超排效果相对较差。8 周龄以上的雌鼠, 在超排时, 根据体重适当加大超排剂量, 超排效果尚可。
2. 体外受精对雄鼠的要求不高, 健康雄鼠精液质量较好, 受精率较高一般均能达到 90%

上。若雄鼠年龄偏大，精液质量欠佳，受精率会相对较低一般在 50-80%左右。个别品系及个体差异出现过 30%左右的受精率。可根据雄鼠状态相应准备足够数量的供体雌鼠。

- 3.卵母细胞的采集，尽可能在小鼠断颈后 30sec 内完成，如果无人配合，可单只处死快速采集，可减少异形细胞或孤雌生殖卵母细胞的出现。
- 4.体外受精时精液的用量一般为 3-5 μ L，可根据精液的浓度和精子活力适当调整加液量。冷冻复苏时精液应加倍。
- 5.在受精后 6h，可观察到含有第二极体和两个原核的受精卵细胞，同时含有单原核的孤雌生殖卵母细胞，这种细胞需剔除。
- 6.移卵针的挑选。如果是自行制作的，应保证移卵针前端圆润，以免伤到细胞，同时应注意孔径大小，若过大，在吸放卵细胞时不好控制，导致清洗不干净；若过小，有可能会损伤细胞，吸放比较费力。目前有商品化的移卵针，可根据情况自行选用。
- 7.在 TYH with M β CD 配制过程中，因聚乙烯醇可溶性不好，需要先溶于水，涡旋混匀，在 60 $^{\circ}$ C 水浴锅内温浴 10min，之后再加入总的液体中。
- 8.加入还原性谷胱甘肽的 HTF 作为受精液，可有效提高受精率，尤其对冷冻复苏精子尤为明显。

致谢

本实验方法源自日本熊本大学动物资源与开发中心。撰稿人顾美儿曾经得到 Naom i Nakagata 教授和 Toru Takeo 博士的大力帮助，尤其在实验技术要点及操作细节方面得到悉心指导，杭州师范大学实验动物中心及中科院分子细胞中心动物实验技术平台及在多年实践中全面掌握并成功应用了此技术方法。

参考文献

- 1.Takeo, T. and Nakagata, N. (2011). [Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin](#). *Biol Reprod* 85(5): 1066-1072.
- 2.Takeo, T., Szein, J. and Nakagata, N. (2019). [The CARD Method for Mouse Sperm Cryopreservation and In Vitro Fertilization Using Frozen-Thawed Sperm](#). *Methods Mol Biol* 1874: 243-256.
3. Guan, M., Bogani, D., Marschall, S., Raspa, M., Takeo, T., Nakagata, N. and Fray, M. (2014). [In vitro fertilization in mice using the MBCD-GSH protocol](#). *Curr Protoc Mouse Biol* 4

- (2): 67-83.
4. Nakagata, N., Takeo, T., Fukumoto, K., Haruguchi, Y., Kondo, T., Takeshita, Y., Nakamuta, Y., Umeno, T. and Tsuchiyama, S. (2014). [Rescue in vitro fertilization method for legacy stock of frozen mouse sperm.](#) *J Reprod Dev* 60(2): 168-171.
 5. Takeo, T. and Nakagata, N. (2010). [Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- \$\beta\$ -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm.](#) *Lab Anim* 44(2): 132-137.
 6. Takeo, T., Hoshii, T., Kondo, Y., Toyodome, H., Arima, H., Yamamura, K., Irie, T. and Nakagata, N. (2008). [Methyl- \$\beta\$ -cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells.](#) *Biol Reprod* 78(3): 546-551.