

小鼠人工授精技术

Artificial Insemination in Mice

王苗苗, 陆晓雨, 张静, 李桂琳, 吴兴龙, 李相运*

河北农业大学动物科技学院, 保定, 河北

*通讯作者: Lxyun@hebau.edu.cn

引用格式: 王苗苗, 陆晓雨, 张静, 李桂琳, 吴兴龙, 李相运. (2022). 小鼠人工授精技术. *Bio-101* e1010961. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010961.

How to cite: Wang, M. M., Lu, X. Y., Zhang, J., Li, J. L., Wu, X. L. and Li, X. Y. (2022). Artificial Insemination in Mice. *Bio-101* e1010961. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010961. (in Chinese)

摘要: 建立稳定的人工授精技术以代替体外受精技术对于扩群有繁殖障碍的突变系小鼠具有重要的实践意义。体外受精技术需要收集大量卵母细胞, 通过体外受精获得胚胎并将胚胎移植假孕母鼠而获得后代, 操作流程费时费力, 环节多, 且技术要求较高, 而人工授精技术简便快捷。由于小鼠人工授精技术涉及环节较多, 成功率不稳定, 始终没有得到普遍应用。本文结合超数排卵、同时发情、定时输精和胚胎移植技术, 建立了令人满意的小鼠人工授精技术。

关键词: 小鼠; 超数排卵; 同期发情; 定时输精; 胚胎移植; 子宫颈

研究背景: 在众多辅助生殖技术中, 人工授精技术是高效的繁殖技术手段之一, 不仅能快速繁殖良种畜群, 而且可以有效预防疾病的传播, 在牛、猪、绵羊、山羊等家畜实际生产中得到广泛应用。在实验动物中, 对于有繁殖障碍的突变小鼠品系的扩群, 可以用人工授精取代体外受精, 因为体外受精技术需要收集大量卵母细胞, 通过体外受精获得胚胎再将胚胎移植假孕母鼠从而获得后代, 操作环节多, 费时费力, 且技术要求较高, 而人工授精技术环节少, 更加简便快捷。小鼠人工授精可以采用非手术法, 即将精液通过子宫颈输入子宫角, 也可以采用手术法, 直接将精液输入输卵管或卵巢囊膜下。手术法人工授精最大的优点是精液用量少, 但技术要求高, 需要麻醉小鼠并打开腹腔, 对小鼠损伤大, 易感染, 而非手术法简单易行, 损伤小, 不易感染,

符合实验动物福利伦理原则。非手术法人工授精主要涉及授精时间的确定以及假孕受体母鼠的准备。利用激素刺激可以较准确判断小鼠排卵时间，但激素刺激显著影响随后的胚胎发育和着床，降低妊娠率，同时，受体母鼠与结扎公鼠交配后形成的阴道栓也严重妨碍精液经子宫颈向子宫角的输入，如果用人造阴道栓代替公鼠的交配刺激，则妊娠率显著下降，因此，小鼠人工授精技术的成功率一直不稳定。本文结合超数排卵、定时输精和胚胎移植技术，建立了令人满意的小鼠人工授精技术。

材料与试剂

1. 小鼠人工输精器（保定正木生物科技有限公司）



图 1. 小鼠人工输精器

2. 胚胎操作管（保定正木生物科技有限公司）
3. 口吸管（保定正木生物科技有限公司）
4. 开膈管（保定正木生物科技有限公司）
5. 一次性 1 mL 注射器（江西洪达医疗器械集团有限公司）
6. 小鼠饲养笼
7. 婴儿棉签
8. 眼科剪刀
9. 阿佛丁
10. 48 孔板
11. 移液器

12. 30G 针头
13. CD-1 成年母鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司）
14. CD-1 成年公鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司）
15. CD-1 结扎公鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司）
16. 马绒毛膜促性腺激素（eCG）（宁波三生生物科技股份有限公司）
17. 人绒毛膜促性腺激素（hCG）（宁波三生生物科技股份有限公司）
18. DPBS 磷酸盐缓冲液

仪器设备

1. 体视显微镜（Nikon SMZ 745）
2. CO₂ 培养箱（Thermo Fisher 311）
3. 恒温热台（北京比威克生物技术有限责任公司）
4. 纤维冷光源（南京博城光电科技有限公司 LED-100）

实验步骤

1. 第 1 天，挑选 6 只未发情 CD-1 母鼠在下午 14:00 每只腹腔注射 eCG 7.5 IU，第 3 天下午 14:00，腹腔注射 hCG 7.5 IU。
2. 第 3 天下午 18:00，挑选近 4 周内与母鼠有过多次交配记录并成功冲出胚胎的成年 CD-1 公鼠 1 只，取两侧附睾尾，经 37℃ 预热的 DPBS 液洗涤 3 次后置 48 孔板内。加入 37℃ 预热的 DPBS 液 0.7mL，用眼科剪刀将附睾尾剪碎，置 CO₂ 培养箱孵育 40 min（37℃，5% CO₂，95% 空气，饱和湿度）。
3. 第 3 天下午 19:00，左手固定小鼠尾根，让小鼠两前肢抓在鼠笼上，将开腔管插入阴道，借助纤维冷光源，确认子宫颈口，并用婴儿棉签蘸取温热的 DPBS 清洗子宫颈口（图 2）。



图 1. 利用开腔管打开小鼠生殖道

4. 取出 48 孔板，轻轻摇动，混匀精液，用输精器吸取上层精液，然后将输精器插入子宫颈口，输精器前端黄管约进入四分之三即可，左手固定小鼠，右手向下缓慢按压手柄，每只小鼠缓慢推注 0.1 mL 精液，随后拔出输精器和开腔管。极个别小鼠的子宫颈口可能很紧，可用一个未吸取精液的输精器提前疏通一下子宫颈口，疏通深度不要超过 5 mm（图 3）。



图 2. 将小鼠输精器插入子宫颈

5. 第 4 天下午 17:00，挑选 10 只外阴部肿胀的自然发情 CD-1 母鼠与 CD-1 结扎公鼠 1:1 合笼，第 5 天上午 8:00 检查阴道栓，见栓者记为假孕 0.5 d。

6. 第 5 天上午 8:00 至下午 14:00，利用钝头 30G 针头和温热的 DPBS 液冲洗人工输精小鼠的输卵管，收集 2-细胞胚胎，DPBS 液清洗后，进行手术法输卵管胚胎移植，在输卵管膨大部靠近卵巢且避开血管的部位扎一小口，将装有 2-细胞的胚胎操作管轻轻插入小口后，朝子宫方向吹出胚胎，将 2-细胞胚胎移植到假孕 0.5 d 小鼠输卵管内，每只小鼠单侧输卵管移植 6-15 枚胚胎，如有需要，可用剪刀在左耳或右耳剪缺口标记，移植后 19 d 小鼠分娩（图 4）。

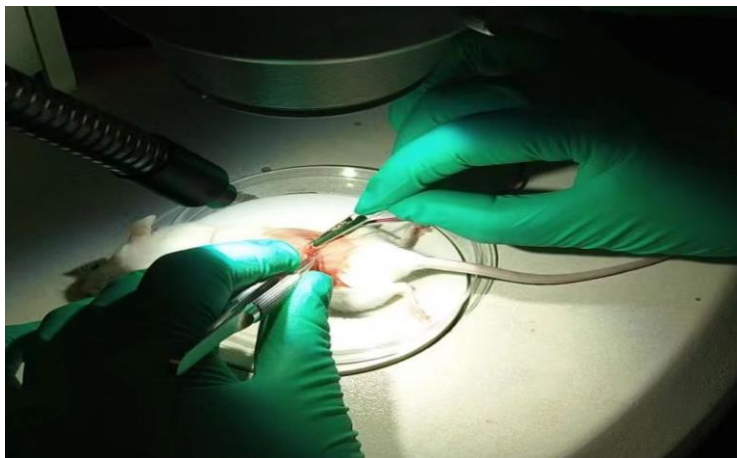
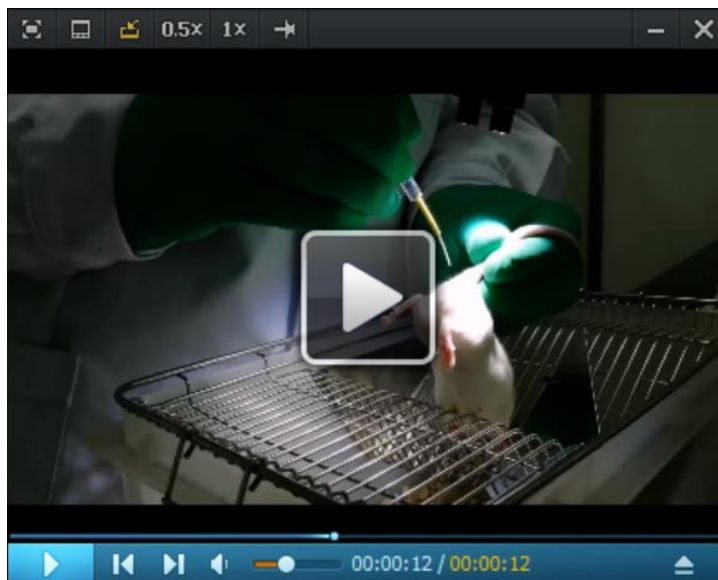


图 3. 输卵管胚胎移植



视频 1. 小鼠人工输精视频

溶液配制

1. DPBS 液

称取 NaCl 8 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ 1.15 g、KH₂PO₄ 0.2 g，加入 500 mL 超纯水，震荡溶解；再称取 CaCl₂ 0.1 g 和 MgCl₂·6H₂O 0.1 g，加入 500 mL 超纯水，震荡溶解，将以上两种溶液混合均匀后，加入 2 g 牛血清白蛋白，静置 30 min，0.22 μm 滤器过滤除菌，分装，冷藏保存。

2. 阿佛丁

称取 2.5 g 三溴乙醇（Sigma T48402）置 200 mL 烧杯，加入 5 mL 叔戊醇（成都艾科达化学试剂有限公司）溶解，再加入 195 mL 生理盐水，60℃ 磁力搅拌溶解，完全溶解后室温冷却，0.22 μm 过滤除菌，避光冷藏保存。

参考文献

1. Bohacek, J., von Werdt, S. and Mansuy, I. M. (2016). [Probing the germline-dependence of epigenetic inheritance using artificial insemination in mice.](#) *Environ Epigenet* 2(1): dvv015.
2. De Repentigny, Y. and Kothary, R. (2018). [Surgical Artificial Insemination in Mice.](#) *Cold Spring Harb Protoc* 2018(9).
3. Duselis, A., Veres, M., Dewey, M. and Vrana, P. (2018). [Nonsurgical Artificial Insemination in Mice.](#) *Cold Spring Harb Protoc* 2018(9).
4. Duselis, A. R. and Vrana, P. B. (2007). [Harvesting sperm and artificial insemination of mice.](#) *J Vis Exp* (3): 184.
5. Sato, M. and Kimura, M. (2001). [Intrabursal transfer of spermatozoa \(ITS\): a new route for artificial insemination of mice.](#) *Theriogenology* 55(9): 1881-1890.
6. Sato, M., Nagashima, A., Watanabe, T. and Kimura, M. (2002). [Comparison of intrabursal transfer of spermatozoa, a new method for artificial insemination in mice, with intraoviductal transfer of spermatozoa.](#) *J Assist Reprod Genet* 19(11): 523-530.
7. Sato, M., Tanigawa, M. and Watanabe, T. (2004). [Effect of time of ovulation on fertilization after intrabursal transfer of spermatozoa \(ITS\): improvement of a new method for artificial insemination in mice.](#) *Theriogenology* 62(8): 1417-1429.
8. Stone, B. J., Steele, K. H. and Fath-Goodin, A. (2015). [A rapid and effective nonsurgical artificial insemination protocol using the NSET device for sperm transfer in mice without anesthesia.](#) *Transgenic Res* 24(4): 775-781.