

猪体外受精

Pig In Vitro Fertilization

樊娜娜, 欧阳振, 李昊, 赖良学*

中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州, 广东

*通讯作者邮箱: lai_liangxue@gibh.ac.cn

引用格式: 樊娜娜, 欧阳振, 李昊, 赖良学. (2022). 猪体外受精. *Bio-101* e1010967. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010967.

How to cite: Pan, N. N., Ouyang, Z, Li, H. and Lan, L. X. (2022). Pig In Vitro Fertilization. *Bio-101* e1010967. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010967. (in Chinese)

摘要

猪等大动物采用体内冲取法获得受精卵代价昂贵, 即使经超数排卵, 一头母猪仅能获得 20-30 枚受精卵。而体外成熟卵母细胞可以大量获得, 采用体外受精的方式, 可以获得大量的受精卵。

关键词: 猪卵母细胞, 精子, 体外受精

材料与试剂

1. 四孔板 (NUNC)
2. 培养皿 (NUNC)
3. 2.5×2.0mm 玻璃管 (WPI)
4. BSA (Sigma, catalog number: A8022)
5. NaHCO₃ (Sigma, catalog number: S-8875)
6. Na-Pyruvate (Sigma, catalog number: 4562)
7. HEPES (Na-Salt) (Sigma, catalog number: H3784)
8. HEPES (Acid) (Sigma, catalog number: H4034)
9. L-Glutamine (Sigma, catalog number: G-7029)
10. TCM 199 [10x] (Sigma, catalog number: M0650)
11. H₂O (Sigma, catalog number: W1503) .

12. NaCl (Sigma, catalog number: S-5886)
13. KCl (Sigma, catalog number: P-4504)
14. NaH₂PO₄ (Sigma, catalog number: S-5011)
15. MgSO₄ (Sigma, catalog number: M-2343)
16. CaCl₂·2H₂O (Sigma, catalog number: C-7902)
17. Na Lactate (Sigma, catalog number: L7900)
18. Caffein (Sigma, catalog number: C-0750)
19. KH₂PO₄ (Sigma, catalog number: P-5655)
20. MgSO₄·7H₂O (Sigma, catalog number: M-1880)
21. Ca.(Lactate)₂·5H₂O (Fisher, catalog number: C110-500)
22. Hypotaurine (Sigma, catalog number: H-1384)
23. NEAA (Sigma, catalog number: M7145)
24. EAA (Sigma, catalog number: B-6766)
25. Gentamicin (Gibco, catalog number: 15710-064)
26. 75% 酒精 (安徽安特生物化学有限公司)
27. DPBS (Gibco D8537)
28. 0.9% 生理盐水 (衡阳制药有限公司)
29. 石蜡油 (Sigma, catalog number: M5310)

仪器设备

1. 培养箱 (THERMO-3111)
2. 超净工作台 (瑞智净化)
3. 体式显微镜 (NIKON-SMZ645)
4. 显微镜加热台 (THERMO)
5. 移液枪 (EPPENDORF)

实验步骤

1. 轻轻混合新鲜精子。
2. 用 70%乙醇消毒装精子的袋子和剪刀，用纸巾擦干后，在袋子一端剪开一个小口。

3. 将精子移入离心管中。
4. 1100 rpm (300 G) 离心 10 分钟。
5. 去除上清液并添加 2ml 猪精子洗涤液。
6. 用移液器轻轻重悬精子。
7. 1100 rpm (300 G) 离心 10 分钟。
8. 重复 5-7 次。
9. 去除上清，并添加 2 ml 猪 HEPES 洗涤液，重悬精子。
10. 1100 rpm (300 G) 离心 10 分钟。
11. 去除上清，并添加猪 HEPES 洗涤液至 500 μ l。
12. 用血细胞计数板对精子进行精确计数。
13. 调整精子密度为 40000 精子/300 μ l。
14. 将装有精子的离心管 45 度角放置于培养箱中 2 小时。
15. 体内或者体外成熟的猪卵母细胞，用透明质酸酶消化去掉周围的卵丘细胞。
16. 将去卵丘的卵母细胞转移到猪受精液中洗涤 3 次。
17. 将洗涤好的卵母细胞和稀释好的 15 μ l 精子转移到平衡好的受精液中，轻轻混合，每孔卵母细胞不超过 80 枚。
18. 将精子和卵母细胞在培养箱中共孵育 4-6 小时。
19. 将受精的卵母细胞在胚胎培养液中洗涤三遍后转移入胚胎培养液 PZM-3，于培养箱中（5%CO₂、饱和湿度、38.5℃）继续培养。
20. 受精卵培养 48 小时后观察卵裂率，7 天检查囊胚率。

结果与分析

受精卵培养 48 小时卵裂率为 80%左右，7 天囊胚率为 20%左右。

失败经验

体外受精容易形成多精受精，需要控制精卵比例。

溶液配方

1. 猪精子洗涤液

- 1 mg/ml BSA
- 0.9% NaCl
2. 猪 HEPES 洗涤液
 - 0.084 g NaHCO_3
 - 0.11 g Na-Pyruvate
 - 2.0824 g HEPES (Na-Salt)
 - 1.0724 g HEPES (Acid)
 - 0.073 g L-Glutamine
 - 50 ml Medium 199 [10x]
 - 450 ml H_2O
3. 猪受精液
 - 2.63 g NaCl
 - 448 mg KCl
 - 30 mg NaH_2PO_4
 - 1.05 g NaHCO_3
 - 301 mg MgSO_4
 - 1.192 g HEPES-acid
 - 0.011 g Na-Pyruvate
 - 0.05 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 570 μl Na Lactate
 - 25 mg Gentamicin
 - 0.0121 g Caffeine
 - 1.5 g BSA
 - 494.3 ml H_2O
4. 胚胎培养液 PZM-3
 - 108.00 mM NaCl
 - 10 mM KCl
 - 0.35 mM KH_2PO_4
 - 0.40 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 25.07 mM NaHCO_3
 - 0.2 mM Na-Pyruvate
 - 2.0 mM $\text{Ca}(\text{Lactate})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

1.0 mM L-Glutamine
 5.0 mM Hypotaurine
 10 ml/L NEAA
 20 mg/mL EAA
 0.05 mg/mL Gentamicin
 3 mg/ml BSA

致谢

1. 感谢国家重点研发计划“干细胞与转化研究”专项提供经费支持。

参考文献

1. 吕明. (2013). 甲基- β -环化糊精对猪体外受精的影响研究. 东北农业大学硕士毕业论文
2. 卢晟盛. (2014). 影响猪体外受精因素的研究. 广西大学博士毕业论文