

食蟹猴超数排卵与卵母细胞采集流程

Superovulation and Oocyte Collection

王燕、许玉婷、李春杨、孙强*

中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心，中国科学院，上海

*通讯作者邮箱: qsun@ion.ac.cn

引用格式: 王燕, 许玉婷, 李春杨, 孙强. (2023). 食蟹猴超数排卵与卵母细胞采集流程. *Bio-101* e1010982.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010982.

How to cite: Wang, Y., Xu, Y. T., Li, C. Y., and Sun, Q. (2023). Superovulation and Oocyte Collection. *Bio-101* e1010982. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010982. (in Chinese)

摘要: 卵泡和卵母细胞的发育与成熟要经过极其复杂的生理过程，整个过程需要受内分泌激素和细胞因子等多个系统的调节。并且在食蟹猴的每个生理周期，自然成熟的卵母细胞仅 1-2 枚，远不能满足基因编辑等实验研究的需求。因此，需要对实验猴采用超数排卵的方法获取大量成熟的卵母细胞，用于实验研究。应用外源促性腺激素诱发母猴卵巢的多个卵母细胞同时发育到成熟卵泡，然后利用手术的方法获得成熟或接近成熟的卵母细胞的方法称为超数排卵，简称“超排”。超数排卵是辅助生殖技术的关键环节，最早，研究者采用来自体内的激素，如从绝经期妇女的尿液和血液中提纯的促性腺激素等，成功进行了猴超数排卵研究。但是，这些天然激素具有较高的免疫源性，且含促黄体激素，常常影响超排效果和动物重复利用价值。重组人促性腺激素是 20 世纪 80 年代末开始用于人类辅助生殖的首选药品，它是利用生物技术合成的生物制剂，给辅助生殖带来很好的超排结果；降低了猴的应激反应，并增加动物的重复利用率。但是，其价格昂贵，国际上仅有几家生产商的产品被认可。在常规超排中，1 只猴的激素药品费用大约在 2500-3000 元。

卵母细胞采集方法有手术取卵、腹腔镜系统取卵、超声介导下取卵，我们实验室利用腹腔镜系统进行取卵，因为腹腔镜手术创伤小，动物伤口愈合快，痛苦少，卵子采集比较彻底，术后动物腹腔几乎不会粘连。

关键词: 激素，超数排卵，腹腔镜，食蟹猴

材料与试剂

试剂

1. NaCl (Sigma-Aldrich, catalog number: S7653)
2. KCl (Sigma-Aldrich, catalog number: P5405)
3. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, catalog number: C7902)
4. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, catalog number: M2670)
5. NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, catalog number: S8282)
6. NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, catalog number: S5761)
7. HEPES (Sigma-Aldrich, catalog number: H3375)
8. D-Glucose (Sigma-Aldrich, catalog number: G7528)
9. Sodium Pyruvate (Sigma-Aldrich, catalog number: P5280)
10. Sodium lactate (60% syrup) (Sigma-Aldrich, catalog number: L4263)
11. BSA (absin, catalog number: abs9156)
12. Penicillin-streptomycin (100X) (gibco, catalog number: 15070-063)
13. Calcium lactate pentahydrate (Sigma-Aldrich, catalog number: C8356)
14. Glutamine (Sigma-Aldrich, catalog number: G8540)
15. Phenol Red (Sigma-Aldrich, catalog number: P0290)
16. Estradiol (Sigma-Aldrich, catalog number: E2758)
17. FBS (gibco)
18. CMRL Medium 1066 (gibco, catalog number: 11530-037)
19. Progesterone (Sigma-Aldrich, catalog number: P6149)

一、超数排卵

1. 1 ml 带针头注射器 (一次性)
2. 氯化钠注射液/100 ml:0.9 g 上海长征富民金山制药有限公司
3. 重组人促卵泡激素注射液 (果纳芬) 450 IU/0.75 ml 英国 Merck Serono Europe Ltd.
4. 重组人绒毛膜促性腺激素注射液 (艾泽) 250 μg /0.5 ml 英国 Merck Serono Europe Ltd.

二、腹腔镜系统取卵法

1. 15 ml 离心管 (Corning, catalog number: 430791)
2. 18-G 卵泡吸取针 (Olympus, catalog number: G19715)
3. 移液枪 (Eppendorf)
4. 40 μ m 过滤器 (FALCON, catalog number: 352340)
5. 口吸管 (北京正天, catalog number: BJ-40)
6. 不可吸收缝合线 (2-0)
7. 可吸收性外科缝线 (3-0)
8. 手术器械包 (抓钳、气腹针、戳卡、眼科剪、镊子、持针钳、止血钳、圆针、三棱针。以上物品高压灭菌备用。)
9. 3.5 cm 培养皿 (Coring, catalog number: 430165)
10. 6 cm 培养皿 (Coring, catalog number: 430166)
11. 10 cm 培养皿 (Coring, catalog number: 430167)
12. 75%酒精
13. 碘酒
14. 舒泰 50 维克贸易 (上海) 有限公司 3597133073812
15. 硫酸阿托品注射液 (上海禾丰制药有限公司)
16. 注射用青霉素钠/80 万单位 华北制药股份有限公司
17. 布洛芬
18. 矿物油 (Sigma, catalog number: M8410)
19. 肝素钠 (上海三杰, catalog number: 091201)
20. Hyaluronidase (Sigma, catalog number: H3884)
21. 高纯氮
22. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium with HEPES (TH3) (见溶液配方表 1)
23. CMRL-1066 (见溶液配方表 2)

仪器设备

一、超数排卵

1. 4°冰箱

2. B 超仪 ACUSON NX3 Elite 西门子

二、腹腔镜系统取卵法

1. 气腹机 (OLYMPUS UHI-3)
2. 高辉度光源装置 (OLYMPUS CLH-250)
3. 振荡器 (Kylin-Bell Lab Instruments, catalog number: QH-600)
4. 负压吸引泵 (Cook K-MAR-5200)
5. 管式加热器 (Cook)
6. 体视显微镜 (Olympus, model: SZX7)
7. 培养箱 (Thermo Scientific, model: Forma 3111、Forma 371)
8. 摄像系统 (OLYMPUS OTV-SC2)
9. 显示屏 (SONY)

实验步骤

一、超数排卵流程

1. 制定详细的超排计划，取得所在单位动物实验管理委员会批准，组织安排好相关人员。
2. 制定超排方案：从月经周期的第 3 天晚上开始，见血当天算第 1 天(1~3 天均可)，每天注射 2 次 18.75 IU 果纳芬，2 次激素注射间隔时间在 10~12 小时，注射 8 天，第 11 天晚上注射 1000 IU hCG。hCG 处理 33-37 h 时，使用腹腔镜观察整个腹腔和卵巢超排情况，利用负压吸引系统从卵巢中吸取直径大于 3 mm 的卵泡，获得卵母细胞。
3. 挑选实验猴，根据动物档案挑选年龄在 3-8 岁、体重 3-5 kg、距上一次取卵时间间隔大于三个月的猴做卵供体，并且该猴必须健康状况良好。
4. 激素保存及配制，配制好的激素液体放置 4 °C 环境存放 3 天，否则冻存在 -20 °C 冰箱中，避免反复冻融，不要轻易替换激素的批号和厂商，否则应从新检测超排的效果。
5. 激素注射过程中，注意核对猴号及激素剂量，每次肌肉注射量要达到 0.5 ml，如有漏液要及时补给。

6. B超辅助建议在超排的第6~8天进行，卵泡直径大于3 mm 数量大于4个时，可继续超排和hCG处理，否则停止超排，节省时间和药品。

二、腹腔镜系统取卵法（图1-图5）

1. 实验猴准备

- a. 实验动物手术前禁食禁水12 h，以免手术时因麻醉造成动物呕吐窒息或取卵困难。
- b. 麻醉：舒泰50，剂量4-6 mg/kg，肌肉注射。
- c. 麻醉后给药：阿托品0.1 mg/kg，皮下注射；青霉素10万单位/kg，肌肉注射。
- d. 被毛：上至肚脐上方3 cm处，下至腹股沟处，将整个肚皮的毛剔除干净。
- e. 保定：麻醉后的实验猴以头低臀高的姿势放置手术台上，然后将四肢分别用绷带固定在手术台的四个支架上。
- f. 消毒：先用1.8-2.2%碘酊对术部进行消毒（腹部剃毛区全部消毒），待碘酊干燥后，用75%的酒精脱碘三次。
- g. 在无菌条件下，铺上一次性无菌洞巾，暴露术区。

2. 手术方法

- a. 气腹针以45度角于脐轮上缘1 cm处插入腹腔，接气腹机，进气速度不超过1 L/min,腹腔内压力不超过24 mmHg。
- b. 待腹部鼓起皮肤无褶皱后，拔掉气腹针，用眼科剪沿气腹针针眼向肚脐方向剪0.5cm的切口，提起脐上皮肤，将戳卡先斜后垂直慢慢插入腹腔，拔出套管芯，接通光源及显示屏，缓慢插入腹腔镜。
- c. 气腹针在右侧腹股沟上约2 cm处插入，用气腹针拨开附着在卵巢上的大网膜或者脂肪，使左右两侧卵巢暴露。
- d. 拔出气腹针，用眼科剪沿气腹针针眼向腹股沟方向剪0.3 cm的切口，提起腹部皮肤，将戳卡沿切口慢慢插入腹腔，拔出套管芯，换成抓钳插入腹腔。
- e. 把抓钳分口至最大，沿卵巢滑至卵巢根部夹紧托起，活动抓钳观察是否抓牢。抓牢后，吸卵人员打开负压吸引泵，在实验猴腹部抓钳的对侧插入18G吸卵针，将卵泡液吸入提前预热好的含2.5%肝素钠的TH3取卵液中，放置于15 ml离心管内。

- f. 待 3 mm 以上卵泡吸完后，拔出吸卵针，撤离抓钳，抽出腹腔镜，打开戳卡排气阀，待腹腔内气体排出后，拔出戳卡。
- g. 采用结节缝合方法缝合术口，第一步用可吸收肠线将内膜缝合；第二步用不可吸收丝线将皮肤缝合。术口消毒后将动物送回饲养笼内。
- h. 及时将采集好的卵泡液送到实验室，进行后续实验。

腹腔镜取卵示意图：

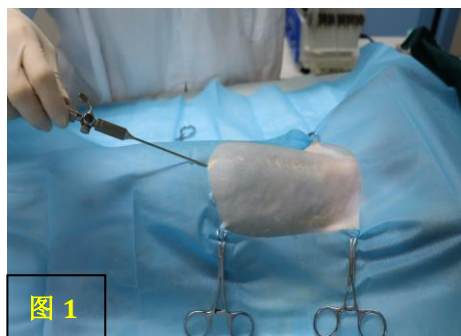


图 1. 将气腹针插入腹部供气.

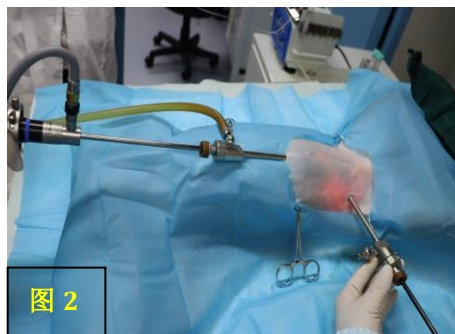


图 2. 插入戳卡，接通光源、显示屏，抓钳.



图 3. 腹腔镜介导吸卵.

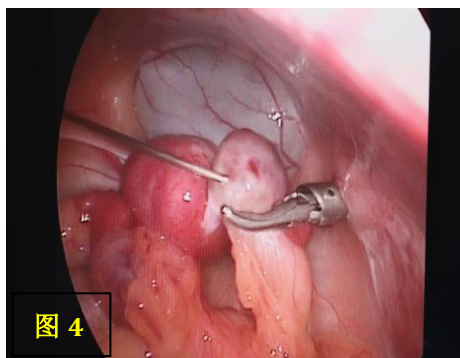


图 4. 吸卵针插入卵泡内.



图 5. 吸卵针

卵母细胞的收集（图 6-图 8）

- 取卵结束后，向卵泡液混合物中加入 1 ml 浓度为 2 mg/ml 透明质酸酶的 TH3 溶液，使用移液枪吹吸以消化颗粒细胞。用 40 μm 的细胞过滤器过滤卵泡混合液，以去除血液和颗粒细胞，卵母细胞留在过滤器网膜上。
- 将细胞滤器翻转后使用约 10 ml TH3 培养基向干净的 6 cm 培养皿中冲洗，以收集过滤器网膜上的卵母细胞。
- 用口径约 200 μm 的口吸管在体视显微镜下捡取卵母细胞。将卵母细胞收集在盖满矿物油的 CMRL-1066 培养基中，移入 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。

卵母细胞收集示意图：



图 6. 细胞过滤器过滤卵泡混合液.



图 7. 显微镜下收集卵母细胞.



图 8. 卵母细胞.

术后护理

手术后，将由专业的兽医人员进行日常护理，首先给动物保温，直至动物完全清醒，活动正常。术后三天内，每天观察动物精神状况及伤口情况，并每天注射一次镇痛药克洛芬（1 mg/kg）以及青霉素（10 万 IU/kg），第四天停药。

注意事项

1. 超排之前再次确认该猴是否有月经。
2. 打 hCG 时，双方确认猴号，确保无误。
3. 术后动物冬天注意保暖，放置于空调房内。
4. 动物放回笼内时取侧卧位，确认动物麻醉苏醒后再离开。
5. 为防止血液凝固，将采集卵泡液的 15 ml 离心管装入振荡混合器，在抽吸过程开始后，使用振荡混合器匀速摇晃。
6. 所有取卵用的培养液需提前 30 分钟预热至 37℃。

溶液配方

1. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium with HEPES (TH3) (表 1)

表 1. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium with HEPES (TH3) 配制表

成分	/100ml	/50ml	备注
NaCl	3.329 ml	1.665 ml	200 mg/ml stock
KCl	239 μ l	119.5 μ l	100 mg/ml stock
CaCl ₂ ·2H ₂ O	294 μ l	147 μ l	100 mg/ml stock
MgCl ₂ ·6H ₂ O	102 μ l	51 μ l	100 mg/ml stock
NaH ₂ PO ₄	48 μ l	24 μ l	100 mg/ml stock
NaHCO ₃	210.6 mg	105.3 mg	
HEPES	240 mg	120 mg	
D-Glucose	90 mg	45 mg	
Sodium Pyruvate	12 mg	6 mg	
Sodium lactate (60% syrup)	0.17 ml	85 μ l	
BSA	300 mg	150 mg	
penicillin-streptomycin (100X)	1 ml	500 μ l	
Phenol Red (0.01%)	10 μ l	5 μ l	
pH	7.4		

2. CMRL-1066 (表 2)

表 2. CMRL-1066 配制表

	/10 ml
CMRL-1066	
10% FBS	1 ml
Sodium Pyruvate	0.4 mg
Glutamine	1.5 mg
Calcium lactate	5.5 mg
Estradiol	1 μ l
Progesterone	750 μ l