

猴胞浆内单精子注射

Intracytoplasmic Sperm Injection of Monkeys

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: gsun@ion.ac.cn

引用格式: 王燕, 许玉婷, 李春杨, 孙强. (2023). 猴胞浆内单精子注射. *Bio-101* e1010985. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010985.

How to cite: Wang, Y., Xu, Y. T., Li, C. Y., and Sun, Q. (2023). Intracytoplasmic Sperm Injection of Monkeys. *Bio-101* e1010985. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010985. (in Chinese)

摘要: 胞浆内单精子注射 (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI), 是指通过显微操作技术将单个精子注入卵母细胞胞浆内, 从而使卵母细胞受精的一种辅助生殖技术。与传统的体外受精相比, ICSI 对精子活力、数量及受精能力的要求较低, 在临床上是第 2 代“试管婴儿”的关键技术。在科研领域, ICSI 可结合其他生物工程技术, 制备基因编辑动物模型。此外 ICSI 也是精子冷冻复苏构建受精胚胎的重要辅助手段。本文详细描述了猴胞浆内单精子注射的操作方法及流程。

关键词: 精子, 卵母细胞, 受精, 辅助生殖

材料与试剂

1. 3.5 cm 培养皿 (CORNING, catalog number: 430165)
2. 3.5 cm 操作皿 (FALCON, catalog number: 353001)
3. Borosilicate Glass (B100-75-10)
4. 矿物油 (Sigma, catalog number: M8410)
5. 口吸管 (北京正天, catalog number: BJ-40)
6. 移液枪 (Eppendorf)
7. 15 ml 离心管 (Corning, catalog number: 430791)
8. 一次性使用无菌注射器带针 (KDL 1ml)
9. PVP (Sigma, catalog number: PVP360)
10. 水银

11. TH3 液（见溶液配方）
12. T3 液（见溶液配方）
13. HECM9aa 培养液（见溶液配方）
14. NaCl（Sigma-Aldrich, catalog number: S7653）
15. KCl（Sigma-Aldrich, catalog number: P5405）
16. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （Sigma-Aldrich, catalog number: C7902）
17. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ （Sigma-Aldrich, catalog number: M2670）
18. NaH_2PO_4 （Sigma-Aldrich, catalog number: S8282）
19. NaHCO_3 （Sigma-Aldrich, catalog number: S5761）
20. HEPES（Sigma-Aldrich, catalog number: H3375）
21. D-Glucose（Sigma-Aldrich, catalog number: G7528）
22. Sodium Pyruvate（Sigma-Aldrich, catalog number: P5280）
23. Sodium lactate (60% syrup)（Sigma-Aldrich, catalog number: L4263）
24. BSA（absin, catalog number: abs9156）
25. penicillin-streptomycin (100X)（gibco, catalog number: 15070-063）
26. PVA（Sigma-Aldrich, catalog number: P8136）
27. HCl（沪试, catalog number: 7647-01-0）
28. Taurine（Sigma-Aldrich, catalog number: T8691）
29. Asparagine（Sigma-Aldrich, catalog number: A4159）
30. Cysteine（Sigma-Aldrich, catalog number: C7352）
31. Histidine（Sigma-Aldrich, catalog number: H6034）
32. Lysine（Sigma-Aldrich, catalog number: L5501）
33. Proline（Sigma-Aldrich, catalog number: L5607）
34. Serine（Sigma-Aldrich, catalog number: S4311）
35. Aspartic acid（Sigma-Aldrich, catalog number: A8949）
36. Glycine（Sigma-Aldrich, catalog number: G8790）
37. Glutamic acid（Sigma-Aldrich, catalog number: G8415）
38. Glutamine（Sigma-Aldrich, catalog number: G8540）
39. Pantothenate（Sigma-Aldrich, catalog number: P5155）

40. Phenol Red (Sigma-Aldrich, catalog number: P0290)

仪器设备

1. 培养箱 (Thermo Scientific, model: Forma 3111、Forma 371)
2. 拉针仪 (Sutter Instrument, model: P97)
3. 断针仪 (Narishige, model: MF-900)
4. 倒置显微镜 (Olympus, model: IX-73)
5. 体视显微镜 (Olympus, model: SZX7)
6. 一对显微操作臂 (Narishige)
7. 微量注射器 (Narishige IM-9B)
8. 离心机 (Eppendorf centrifuge, model: 5702)
9. 压电冲击驱动系统 (Prime Tech)

实验步骤

实验流程

1. 超排母猴及获取卵母细胞;
2. 猴子精子的采集与获能处理;
3. 完成注射, 将卵子移入培养碟中放置培养箱培养;
4. 做好详细记录。

单精注射步骤

一、精子获能处理

1. 将采集的精子液化 15-20 min, 取液化好的精子上清加入到 15 ml 离心管内;
2. 在精子离心管内加入 4 ml 的 TH3, 轻轻吹打, 1,800 rpm, 离心 5 分钟;
3. 离心完后去上清, 再加入 4 ml 的 TH3, 轻轻吹打, 1,800 rpm, 离心 5 分钟;
4. 离心完后去上清, 再加入 4 ml 的 T3, 轻轻吹打, 1,800 rpm, 离心 5 分钟;
5. 离心完后去上清, 再加入 2 ml 的 T3, 轻轻吹打, 1,800 rpm, 离心 5 分钟;
6. 离心完后等待精子上游, 上游 3 分钟;
7. 上游后取中层的精子, 在培养皿内制备精子滴, 盖上矿物油, 放入培养箱待用。

二、单精子显微注射

1. 将 TH3 显微注射操作皿做好预热：取 200 μ l TH3 液，在显微操作碟内制备 4-5 滴 TH3 液滴和一个柱状 TH3 液滴，再做一个 10% PVP 的液滴，每滴体积 15-20 μ l，并覆盖矿物油；
2. 将 HECM9aa 培养皿做好预热：取 200 μ l HECM9aa 培养液，在培养皿内制备 10-13 个液滴，每滴体积约 15-20 μ l，并覆盖矿物油。
3. 用拉针仪将 1 mm 外径的薄壁硼硅酸毛细玻璃管（B100-75-10）拉制成需要的内外径后，在断针仪上断成外径为 100-110 μ m 和内径为 15-20 μ m，打弯成 20-30 度的持卵针；
4. 用拉针仪将 1 mm 外径的薄壁硼硅酸毛细玻璃管（B100-75-10）拉制成需要的内外径后，在断针仪上断成外径为 7-8 μ m 和内径为 5-6 μ m，打弯成 20-30 度的精子注射针；
5. 用 1 ml 注射器从注射针的末端装入 1-2 mm 水银待用；
6. 将制备的显微注射皿放置于载物台上，从低倍视野开始观察整个显微操作滴；
7. 将持卵针安装于操作仪左侧的 IM9B，缓慢深入注射滴中，并调整与操作皿底部水平；
8. 将注射针安装于操作仪右侧的 piezo 压电冲击驱动系统的微注射器上，缓慢深入注射滴中，并调整与操作皿底部水平，保持与持卵针在同一水平线；
9. 用胚胎转移管将一组 MII 期卵母细胞转移到操作皿 TH3 液滴中，同时将处理的 3-5 μ l 获能精子加到另一个 TH3 液滴内；
10. 镜下在 10% PVP 内清洗注射针并调整注射针到精子滴中，用注射针尖轻击精子尾部来制动精子后，将精子尾先头后吸入注射针内，移动注射针到放置卵母细胞的注射滴中（当注射针内的精子用完后，重复此步骤）；
11. 用持卵针抓取并固定 MII 期卵母细胞，并调整第一极体在六点或十二点的方向，注射针利用脉冲震荡刺穿破透明带，将精子推到注射针口后通过脉冲震荡辅助注射入卵母细胞内，以尽量少的液体吐出精子；（见图 1、图 2）

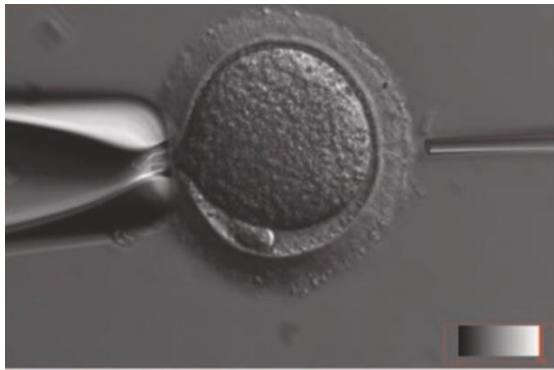


图 1. 极体在约 6 点方向，脉冲震荡刺穿破透明带



图 2. 精子推到注射针口，准备进行注射

12. 完成注射后，持卵针放开卵母细胞；
13. 重复上述操作直至完成所有的 MII 期卵母细胞的精子注射，将胚胎转移到 HECM9 aa 培养液中在 37 °C，5% CO₂ 培养箱中培养；
14. 培养箱中培养六个小时以上，在显微镜下检查原核形成情况，出现两个原核的胚胎视为正常受精。（见图 3）



图 3. 受精卵，箭头所指处为两原核位置

注：本文以 7 只供体数，共获取 103 枚卵母细胞进行 ICSI，其中有 91 枚正常受精，受精率达 88%。（见表 1）

表 1. ICSI 数据统计

供体数	注射卵母细胞数	受精数	受精率
1#	6	5	
2#	20	14	
3#	2	2	
4#	20	19	
5#	5	5	
6#	27	25	
7#	23	21	
总计	103	91	88%

溶液配方

1. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium with HEPES (TH3)（表 2）

表 2. 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. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium without HEPES (T3) (表 3)

表 3. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium without HEPES (T3) 配制表

成分	/100ml	/10ml	备注
NaCl	3.329 ml	333 μ l	200 mg/ml stock
KCl	239 μ l	23.9 μ l	100 mg/ml stock
CaCl ₂ ·2H ₂ O	294 μ l	29.4 μ l	100 mg/ml stock
MgCl ₂ ·6H ₂ O	102 μ l	10.2 μ l	100 mg/ml stock
NaH ₂ PO ₄	48 μ l	4.8 μ l	100 mg/ml stock
NaHCO ₃	210.6 mg	21.06 mg	
Glucose	90 mg	9 mg	
Sodium Pyruvate	12 mg	1.2 mg	
Sodium lactate (60% syrup)	0.17 ml	17 μ l	
BSA	300 mg	30 mg	
penicillin-streptomycin (100X)	1 ml	100 μ l	
Phenol Red (0.01%)	10 μ l	1 μ l	
pH	7.4		

3. HECM-9 (表 4)

表 4. HECM-9 配制表

成分	/100ml	终浓度	
NaCl	0.6639 g	113.6 mmol/L	
KCl	0.0224 g	3 mmol/L	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.0279 g	1.9 mmol/L	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.0102 g	0.5 mmol/L	
NaHCO ₃	0.2100 g	25 mmol/L	
Sodium lactate (60% syrup)	0.0504 g	4.5 mmol/L	
PVA	0.01 g	0.1 mg/ml	
1 mol/L HCl	0.14 ml	1.4 mmol/ml	
11 AA with Pantothenate	1 ml		
100X AA stock			
成分	MW	100X 母液浓度	终浓度
Taurine	125	50 mmol/L	0.5 mmol/L
Asparagine	132	1 mmol/L	0.01 mmol/L
Cysteine	121	1 mmol/L	0.01 mmol/L
Histidine	155	1 mmol/L	0.01 mmol/L
Lysine	146	1 mmol/L	0.01 mmol/L
Proline	115	1 mmol/L	0.01 mmol/L
Serine	105	1 mmol/L	0.01 mmol/L
Aspartic acid	133	1 mmol/L	0.01 mmol/L
Glycine	75	1 mmol/L	0.01 mmol/L
Glutamic acid	147	1 mmol/L	0.01 mmol/L
Glutamine	146	20 mmol/L	0.2 mmol/L
Pantothenate	238	0.3 mmol/L	3 μmol/L