

猴胚胎 mRNA 胞浆注射

Cytoplasmic Injection of mRNA In Monkey Embryos

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). 猴胚胎 mRNA 胞浆注射. *Bio-101* e1010986. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010986.

How to cite: Wang, Y., Xu, Y. T., Li, C. Y., and Sun, Q. (2023). Cytoplasmic Injection of mRNA In Monkey Embryos. *Bio-101* e1010986. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010986. (in Chinese)

摘要: 利用显微操作仪将 mRNA 直接注射到受精卵的细胞质中, 称为 mRNA 胞浆注射。相比于原核注射, 胞浆注射的操作更加简便。结合低成本和易于设计的 CRISPR/Cas 技术, mRNA 胞浆注射可以实现高效的基因编辑。在猴受精卵中注射 sgRNA/Cas9 mRNA 混合液, 可以得到基因编辑的非人灵长类动物模型, 为人类基因疾病的研究起到了重要的作用。

关键词: mRNA, 胞浆, 基因编辑

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. Borosilicate Glass With Filament (BF100-78-10)
5. 矿物油 (Sigma, catalog number: M8410)
6. 口吸管 (北京正天, catalog number: BJ-40)
7. 移液枪及枪头 (Eppendorf)
8. TH3 液 (见溶液配方)
9. HECM9aa 培养液 (见溶液配方)

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. IM300 Microinjector（Narishige）
7. 一对显微操作臂（Narishige）
8. 微量注射器（Narishige IM-9B）

实验步骤

实验流程

1. 超排母猴及获取卵母细胞；
2. 单精注射获取受精卵；
3. 进行胚胎胞质内 RNA 注射，完成注射后，将胚胎移入培养碟中放置培养箱培养；
4. 根据培养发育情况，将胚胎移植入受体体内；
5. 做好详细记录。

mRNA 注射

1. 将 TH3 显微注射皿做好预热：取 200 μ l TH3 液，在微操作碟内制备 10-13 TH3 液滴，每滴体积约 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（BF100-78-10）拉制成需要的注射针，在断针仪上打弯 20-30 度；
5. 将制作好的注射针倒扣在待注射的 sgRNA 中，以虹吸法吸入；
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 上，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 IM300 上，调整注射压力为 30 psi、平衡压力 0.1-0.3psi,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. 单精注射完成后胚胎培养六个小时以上，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；
10. 用胚胎转移管将一组受精卵转移到操作皿中，操作尽可能在 20-30 min 内完成；
11. 高倍镜下观察合子状态，确信观察到双原核而且形态良好；
12. 用左侧持卵针抓取并固定合子后，推动右侧注射针透过透明带，进入卵胞质中，进行注射。观察注射针尖端是否通畅，若不通畅，将注射针在持卵针上轻轻碰击以增大注射针尖的直径，调整合适的注射压力；
13. 完成注射后，将注射针从合子中迅速撤出，持卵针放开合子；
14. 所有合子注射完毕后，应当立即移回 HECM9aa 培养液，置于 37 °C，5% CO₂ 培养箱培养，等待胚胎移植。

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. HECM-9 (表 2)

表 2. 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