



# 获能培养液等因素对遗传工程小鼠冻融 精子体外受精率的影响

左琴<sup>1</sup>, 范涛<sup>1</sup>, 张翠平<sup>2</sup>, 杨文东<sup>2</sup>, 王劲松<sup>1</sup>, 范昌发<sup>1</sup>, 刘佐民<sup>1</sup>, 贺争鸣<sup>1</sup>, 李保文<sup>1</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院, 国家啮齿类实验动物种子中心, 北京 100050;  
2. 北京百奥赛图基因生物技术有限公司, 北京 100076)

**【摘要】** 目的 探讨遗传工程小鼠精子冷冻、复苏及体外受精率的效果, 建立简便、经济的遗传工程小鼠保种体系。方法 采用精子冷冻、体外受精和胚胎移植技术, 比较了精子获能培养液、雄鼠周龄及精子冻存液等因素对于遗传工程小鼠精子冷冻保存的影响。结果 用CPA精子冻存液冷冻保存精子, 精子复苏后用PM精子培养液获能培养, 体外受精率在82.49%~91.43%, 而HTF精子培养液的体外受精率为14.46%~27.38%, 同品系间差异极显著( $P < 0.01$ ); 10~35周龄的雄鼠精子均能成功冷冻、受精, 移植后产仔; 使用R18S3, CPM, CPA三种不同精子冻存液冷冻遗传工程小鼠精子, 复苏后采用PM精子培养液体外受精, 受精率分别是75.85%、88.89%和94.27%, 移植后得到阳性小鼠; 体外受精后的胚胎成功冷冻保存, 移植后产仔。结论 采用CPA精子冻存液冷冻保存精子, 精子复苏后用PM精子培养液体外受精, 能够更有效地保存遗传工程小鼠。

**【关键词】** 精子; 冷冻保存; 体外受精; 胚胎移植; 遗传工程小鼠

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 01-0045-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.001.008

## Effects of preincubation medium and other factors affecting *in vitro* fertilization rate of post-thawed genetically engineering mouse spermatozoa

ZUO Qin<sup>1</sup>, FAN Tao<sup>1</sup>, ZHANG Cui-ping<sup>2</sup>, YANG Wen-dong<sup>2</sup>, WANG Jin-song<sup>1</sup>, FAN Chang-fa<sup>1</sup>,  
LIU Zuo-min<sup>1</sup>, HE Zheng-ming<sup>1</sup>, LI Bao-wen<sup>1</sup>

(1. Laboratory Animal Resource Center, National Institutes Food and Drug Control, Beijing 100050, China;  
2. Beijing Biocytogen Co., Ltd, Beijing 100076, China)

**【Abstract】 Objective** To discuss the effect of *in vitro* fertilization (IVF) and mouse sperm cryopreservation, to establish a simple and economic frozen system for the genetically engineering mice preservation. **Methods** Sperm from genetically engineering mice were cryopreserved, IVF was performed using post-thawed sperm, then embryo transfer, to compare the effects of cryopreservation medium, age of male mice and sperm preincubation medium. **Results** Using CPA as sperm cryopreservation medium, when PM was used thawed-sperm preincubation in IVF, the fertility rates were from 82.49% to 91.43%, when HTF was used thawed-sperm preincubation in IVF, the fertility rates were from 14.46% to 27.38%, there

**【基金项目】** 国家科技支撑计划(2013BAK11B00)。

**【作者简介】** 左琴(1975-), 女, 副研究员, 硕士, 研究方向: 实验动物遗传与保种。

**【通讯作者】** 李保文(1967-), 男, 副主任技师, 研究方向: 实验动物管理与GLP, E-mail: libaowen2003@aliyun.com; 贺争鸣(1957-), 男, 研究员, 研究方向: 微生物学和免疫学, E-mail: zhengminghe57@163.com。

was a significant difference between PM and HTF sperm preincubation medium; 10 to 35 weeks male genetically engineering mice sperm were succeed cryopreservation, and positive mice were procreated after 2-cell embryos were transferred; R18S3、CPM and CPA was used to freeze sperm, the fertility rates were 75.85%、88.89% to 94.27%, positive mice were procreated after 2-cell embryos were transferred; 2-cell embryos after IVF were freed, then thawed and positive mice were procreated after 2-cell embryos were transferred. **Conclusion** Using CPA as sperm cryopreservation medium, when PM was used thawed-sperm preincubation in IVF, genetically engineering mice sperm were succeed cryopreservation.

**【Key words】** Sperm; Cryopreservation; In vitro fertilization; Embryo transfer; Genetically engineering mice

CRISPR-Cas 技术的发展,有效补充了锌指核酸酶技术(ZFN)、胚胎干细胞打靶和TALEN等制作动物模型方法,将会更有效、更快地研发出遗传工程小鼠<sup>[1]</sup>。随着这些基因工程技术的不断发展和完善,遗传工程小鼠越来越多的应用于生命科学研究中,已渗透到医学、发育生物学、遗传学、动物育种学等各个领域。得到的遗传工程小鼠模型在繁殖建系过程中,由于遗传漂变和空间、人力、物力等问题,对其配子细胞进行有效的冷冻保存有实际应用价值,而且也便于运输和进行国际间的交流<sup>[2-3]</sup>。因此,对保存大量的遗传工程小鼠而言,精子冷冻保存是一种简单而有效的方式<sup>[4]</sup>。精子冷冻保存和体外受精技术结合可以用于大多数品系产生大量的胚胎,进行繁殖生产和种系的扩群。

C57BL/6 近交系小鼠是最常用于遗传工程小鼠制作的背景小鼠,但其精子在复苏后的成活率和体外受精率较低,成为冷冻保种的一个瓶颈,Nakagata 等改进了 C57BL/6 小鼠冻精复苏后的获能培养,提高了 IVF 生产遗传工程小鼠的效率<sup>[5]</sup>。

本实验按照 Nakagata 改进的试剂和方法对不同遗传工程小鼠的精子冻存和体外受精进行了初步研究和探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器和试剂

CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo 8000DH,美国)、体视显微镜(Nikon SMZ624,日本)、液氮罐(Taylor-Wharton HC-35,美国)、麦管封口机(Cryologic HAS-1,美国);孕马血清(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)(均购于宁波第二激素厂,中国)、KSOM 培养液(Millipore MR-106-D,美国)、CPM 精子冻存液(JASKON LABORATORY,美国)、R18S3 精子冻存液、CPA 精子冻存液、HTF 培养液和 PM 精子培养液、CARD MEDIUM 培养液(日本熊本大学动物资源研发中心赠送)。PCR 检测所用试剂(购于宝生物工程(TaKaRa)大连有限公司,中国),引物由北京诺

赛基因研究公司合成。

### 1.2 实验动物

遗传工程小鼠(均以 C57BL/6J 近交系小鼠为背景)来自本单位和北京百奥赛图公司研发制作, KM、C57BL/6J 小鼠由本单位自供,饲养于国家啮齿类实验动物种子中心【SCXK(京)2009-0017】,繁育和实验环境均为屏障系统。本实验在中国食品药品检定研究院实验动物伦理委员会监督下进行。

### 1.3 精子冷冻和复苏

按照 Nakagata 方法冷冻精子和复苏<sup>[5]</sup>。颈椎脱臼处死雄鼠,取出附睾尾,在体式显微镜下除净附睾尾上的脂肪和血液后,将附睾尾放入 120 μLCPM、R18S3 或 CPA 精子冻存液液滴的培养皿中,用维纳斯剪剪开附睾尾,将培养皿放到 37℃ 恒温板上平衡 3 min,且每隔 1 min 轻轻晃动培养皿,以便精子从改为从附睾尾游出。取精子悬浮液在培养皿上做 10 个液滴,每滴 10 μL,用 0.25 mL 麦管先装入 0.1 mL HTF 溶液,间隔 1.5 cm 的空气段,装入 10 μL 精子悬浮液,最后将麦管两端都热封口,连续装好 10 根麦管后,将所有麦管放在液氮蒸汽上预冷 10 min 后沉入液氮中,1~2 月后解冻复苏。

在复苏前,将麦管从液氮中取出,在 37℃ 水浴锅中平衡 10 min,将 10 μL 精子悬浮液加入 90 μL HTF 或 PM 培养液中,放入 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 30 min。

### 1.4 体外受精

IVF 操作按文献描述<sup>[5]</sup>,对 4 周龄 C57BL/6J 雌鼠间隔 48 h 腹腔注射 PMSG 和 hCG 进行超数排卵。在 hCG 注射 14~15 h 后,一次颈椎脱臼处死 3 只雌鼠,快速取出输卵管,放到已经覆盖石蜡油的 HTF 或 CARD MEDIUM 受精滴。在显微镜下用眼科镊和解剖针将卵丘细胞复合体(COCs)从膨大部释放。将 COCs 引入 90 μL HTF 液滴中。将 10 μL 新鲜或复苏的精子悬浮液加入覆盖有石蜡油的有 COCs 的受精液滴,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。在培养 5~6 h 后,用 HTF 液滴(100 μL)将受精卵清洗 3

次。此时,用相差显微镜可以观察到原核的形成。在受精 24 h 后,挑选出发育正常的 2-细胞期胚胎,放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,待冻存或胚胎移植。体外受精率的计算是用 2 细胞胚胎数量除以总的受精卵数量乘以 100。

**1.5 胚胎冷冻和复苏**

采用简易玻璃化冷冻-解冻法冻存胚胎和复苏胚胎<sup>[6]</sup>。将待冻存的 2-细胞胚胎置于 1mol/L DMSO 液滴中静置数分钟,用微量移液器吸取 5 μL 含有胚胎的 DMSO 于冷冻管中,在 0℃ 恒温器中平衡 5 min,再加入 45 μL DAP213 溶液,0℃ 下再次平衡 5 min,放到液氮中保存。

复苏方法是,将冻存管从液氮中取出,室温下静置约 30 s,加入 0.9 mL 37℃ 预热的 0.25 mol/L 蔗糖溶液,将有胚胎的溶液移入 35 mm 培养皿,在显微镜下回收复苏胚胎,观察记录结果;将状态良好的 2-细胞胚移入 KSOM 培养液,放于 CO<sub>2</sub> 培养箱培养,待移植。

**1.6 胚胎移植和后代检测**

采用输卵管内移植法<sup>[7]</sup>,结扎 KM 雄鼠与正常 KM 雌鼠以 1:1 合笼,翌日检查阴栓,见栓者为假孕 0.5 d,2 细胞胚胎移植至假孕 0.5 d 雌鼠的输卵管内,两侧输卵管各移植 10 ~ 15 个胚胎,出生后统计其产仔率。在仔鼠离乳前剪尾进行 PCR 检测。

**1.7 数据处理**

应用 SPSS 统计软件,采用  $\chi^2$  检验进行结果分析。

**2 结果**

**2.1 精子复苏后获能培养液的影响**

选取 12 周龄 A、B、C、D 四种遗传工程雄鼠和

C57BL/6J 近交系雄鼠,用 CPA 为精子冻存液进行精子冷冻,冷冻精子复苏后采用 HTF 或 PM 培养液培养获能,加入有卵母细胞的受精液滴进行体外受精,翌日统计 2 细胞胚胎数量(表 1)。四种遗传工程小鼠和 C57BL/6J 小鼠的冻精复苏后,用 HTF 培养获能,其体外受精率分别是 25.32%、14.46%、26.32%、18.48% 和 27.38%,而使用 PM 培养获能体外受精率分别是 91.43%、84.56%、88.89%、89.95% 和 82.49% ( $P < 0.01$ )。使用 HTF 培养获能明显低于用 PM 培养获能。

**2.2 雄鼠周龄对精子冻存的影响**

选取 10、15、20、25、30、35 周龄同种纯合遗传工程雄鼠,用 CPA 冷冻保存精子,用 PM 进行复苏精子的培养,进行体外受精和 2 细胞胚胎移植。从表 2 可见,10 ~ 35 周龄的雄鼠精子冻存,复苏后 20 周龄雄鼠精子体外受精率最高,是 92.75%,35 周龄雄鼠精子体外受精率最低,是 59.30%,胚胎移植后产仔。

**2.3 精子冻存液对复苏影响结果**

选取 12 周龄同种杂合遗传工程雄鼠,分别用 R18S3、CPM 和 CPA 精子冻存液进行精子冻存,解冻复苏后和 C57BL/6J 雌鼠体外受精并移植。CPA 精子冻存液的效果最好,精子复苏后体外受精率达 94.27%,R18S3 冻存液冻存的精子复苏后体外受精率是 75.85%(表 3)。

**2.4 遗传工程小鼠体外受精后胚胎冷冻保存**

对 5 种遗传工程小鼠冷冻精子复苏进行体外受精,获得的 2 细胞胚胎进行冷冻保存,复苏后胚胎移植,检测其冷冻效果。胚胎的复苏率在 66.00% ~ 89.33% 间,胚胎移植后产仔,在检测后得到阳性小鼠(表 4)。

表 1 精子解冻复苏后获能液对受精率的影响

Tab. 1 Effects of sperm preincubation medium on the fertility of frozen/thawed sperm

雄鼠品系 Strain of male mice	精子获能培养液 Sperm preincubation medium	受精液 IVF medium	受精卵数 No. of zytotes	2 细胞胚胎数(%) No. of 2-cell embryos(%)
A	HTF	HTF	158	40(25.32)
	PM	CARD MEDIUM	210	192(91.43)**
B	HTF	HTF	166	24(14.46)
	PM	CARD MEDIUM	149	126(84.56)**
C	HTF	HTF	190	50(26.32)
	PM	CARD MEDIUM	198	176(88.89)**
D	HTF	HTF	184	34(18.48)
	PM	CARD MEDIUM	199	179(89.95)**
C57BL/6J	HTF	HTF	168	46(27.38)
	PM	CARD MEDIUM	217	179(82.49)**

注: \*\* 表示差异极显著性, \* 表示差异显著性。

Note: \*\* very significant difference, \* significant difference.

表 2 雄鼠周龄对精子冻存复苏的影响

Tab. 2 Effects of age of male mice on the fertility of frozen/thawed sperm

雄鼠周龄 Age of male mice (weeks)	受精卵数 No. of zygotes	2 细胞胚胎数 (%) No. of 2-cell embryos (%)	移植胚胎数 No. of transfer embryos	产仔数 (%) No. of live young (%)
10	149	126 (84.56)	120	29 (24.17)
15	198	176 (88.89)	99	35 (35.35)
20	138	128 (92.75)	108	23 (21.30)
25	198	173 (87.37)	142	31 (21.83)
30	441	327 (74.15)	124	8 (6.45)
35	199	118 (59.30)	83	11 (13.25)

表 3 精子冻存液对精子冷冻复苏的影响

Tab. 3 Effects of sperm cryopreservation medium on the fertility of frozen/thawed sperm

精子冻存液 Age of male mice (weeks)	受精卵数 No. of zygotes	2 细胞胚胎数 (%) No. of 2-cell embryos (%)	移植胚胎数 No. of transfer embryos	产仔数 (%) No. of live young (%)	阳性小鼠数 No. of positive mice
R18S3	236	179 (75.85)	111	37 (33.33)	13
CPM	198	176 (88.89)	150	32 (21.33)	18
CPA	227	214 (94.27)	120	30 (25.00)	14

表 4 遗传工程小鼠胚胎冷冻复苏移植结果

Tab. 4 Result of frozen/thawed 2-cell embryos of genetically engineered mouse strains

保存代码 ID	冷冻胚胎数 No. of frozen 2-cell embryos	复苏胚胎数 (%) No. of thawed 2-cell embryos	移植胚胎数 No. of transfer embryos	产仔数 (%) No. of live young (%)	阳性小鼠数 No. of positive mice
1	150	118 (78.67)	72	34 (47.22)	8
2	150	112 (74.67)	60	11 (18.33)	2
3	150	99 (66.00)	60	25 (41.67)	6
4	150	134 (89.33)	90	13 (14.44)	4
5	150	121 (80.67)	60	26 (43.33)	7

### 3 讨论

对于科研工作中研发的大量遗传工程小鼠,较为珍贵,有进行种子资源保存的必要性,确立简便、快捷、经济的保种方法有较高的实用性。本次试验通过体外受精效果的比较,以 CPA 为精子冻存液,冻存精子复苏后采用 PM 培养液培养后进行体外受精,对于以 C57BL/6 为背景的遗传工程小鼠有较好的保存效果。

#### 3.1 冷冻精子复苏培养液和体外受精液的改进

C57BL/6 近交系小鼠作为最常用于遗传工程小鼠制作的背景小鼠,其精子在冻存复苏后的受精率非常低<sup>[8-9]</sup>。Takeo 等<sup>[5]</sup>改进了精子冷冻保存和体外受精技术,在冷冻精子复苏后的获能培养中,添加 MBCD 配制成精子获能培养液 PM 显著增加了体外受精率。MBCD 可以形成亲脂性物质,促进精子细胞膜胆固醇的释放,诱导了精子获能,增加了精子受精力<sup>[10]</sup>,同时提出在体外受精液中添加还原型 GSH 将增加体外受精率,还原型 GSH 增加了胚

胎透明带的自由硫醇并刺激透明带放大<sup>[10]</sup>。本实验中用 HTF 和 PM 分别进行冷冻精子复苏后培养,结果表明 PM 培养液的使用极大提高的以 C57BL/6 小鼠为背景的遗传工程小鼠冷冻精子的体外受精率。

#### 3.2 适合冻存的雄鼠周龄范围

遗传工程小鼠在制作完成后,由于种群数量极少,在短期内不易扩繁其种群,为了避免遗传漂变、饲养空间限制等的影响,需要尽快进行保存,精子冷冻保存是较为有效的保存方式之一。精子冷冻保存对所保种的雄鼠周龄是有要求的,在进行精子冷冻和体外受精时,都要求雄鼠要达到性成熟和体成熟,本实验对小鼠的周龄范围做了实验,在活体保种中通常使用 10 周龄以上的小鼠进行繁殖基础上,选择了 10~35 周龄雄鼠,从实验结果来看那,10~35 周龄的雄鼠精子都可以成功冷冻保存并且在复苏后产仔。多数文献报道精子冷冻的周龄在 12~20 周龄<sup>[8]</sup>,但品系间有差异,陆晔等报道了 10~20 周龄的 KM 小鼠精子成功冷冻并在复苏后

产仔<sup>[11]</sup>。

### 3.3 精子冻存液的选择

目前,小鼠使用的精子冻存液均是以棉籽糖和脱脂奶按比例混合为基础液配制,对市面上可以购买到的 R18S3、CPM 和 CPA 三种冻存液比较,表明 CPA 的效果最好,但是 CPM 和 CPA 的价钱较为昂贵,R18S3 也可以达到保种的目的。

### 3.4 胚胎冷冻

小鼠的胚胎冷冻是较为成熟的保种方式,相对于精子冷冻而言,胚胎冷冻需要大量的动物,在遗传工程小鼠种群较小的前提下,精子冷冻更为实用。但精子冷冻在复苏后需要进行体外受精的准备,而胚胎冷冻可以复苏后直接进行胚胎移植,两种方式各有其优缺点,对于保种单位两种冷冻保种方式是相互补充的。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Dali Li, Zhongwei Qiu, Yanjiao Shao, *et al.* Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, Aug ; 31(8): 681 - 3. Doi : 10.1038/nbt.2661.
- [ 2 ] Landel CP. Archiving mouse strains by cryopreservation[J]. *Lab Anim(NY)*, 2005, 34(4): 50 - 57.
- [ 3 ] Shaw JM, Nakagata N. Cryopreservation of transgenic mouse

lines[J]. *Methods Mol Biol.*, 2002, 180: 207 - 208.

- [ 4 ] Takeo T, Nakagata N. Mousesperm cryopreservation and effective embryo production using cryopreserved C57BL/6 mouse sperm [J]. *J Mamm Ova Res*, 2010, 27: 70 - 78.
- [ 5 ] Takeo T, Nakagata N. Reduced Glutathione Enhances Fertility of Frozen/Thawed C57BL/6 mouse sperm after Exposure to Methyl-Beta-Cyclodextrin [ J ]. *J Biol Reprod*, 2011, 85: 1066 - 1072.
- [ 6 ] Nakao K, Nakagata N, Katsuki M. Simple and efficient procedure for cryopreservation of mouse embryos by simple vitrification[J]. *Exp Anim*, 1997, 46: 231 - 234.
- [ 7 ] 中泻直己. マウスにおける经卵管壁卵管内胚移植の試み [J]. *实验动物*, 1992, 41: 387 - 388.
- [ 8 ] Sztejn JM, Farley JS, Mobraaten LE. In vitro fertilization with cryopreserved of inbred mouse sperm[J]. *J Biol Reprod*, 2000, 63: 1774 - 1780.
- [ 9 ] 刘牧,张一云,高珊,等. C57BL/6J 等近交系小鼠精子冷冻研究进展[J]. *黑龙江动物繁殖*, 2010, 6(18): 1 - 9.
- [ 10 ] Takeo T, Hoshii T, Kondo Y, Nakagata N, *et al.* Methyl-Beta-Cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells[J]. *J Biol Reprod*, 2008, 78: 546 - 551.
- [ 11 ] 陆晔,唐一岷,刘丽均,等. 昆明小鼠精子冷冻的研究(简报) [J]. *实验生物学报*, 2004, 1(37): 59 - 62.

[ 修回日期 ] 2014-12-03