



利用超数排卵技术进行优化 C57BL/6J 小鼠的生物净化体系

冯 颖¹, 王芊芊¹, 陆文昊², 曹敏梁¹

(1. 浙江大学实验动物中心, 杭州, 浙江 310058; 2. 台州医院生殖中心, 台州, 浙江 317000)

【摘要】 目的 以近交系 C57BL/6J 小鼠为实验对象, 通过注射不同剂量的孕马血清促性腺激素 (PMSG) 和人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 对小鼠进行超数排卵、体外受精和胚胎移植, 确定最佳超排剂量, 从而完善以 C57BL/6J 小鼠为背景的转基因小鼠的生物净化体系。**方法** 将 5 周龄的 C57BL/6J 雌鼠进行 5 IU、10 IU、7.5 IU、15 IU 四个剂量组的超数排卵, 通过超数排卵与剖宫取胎、胚胎移植两种净化方法相结合, 确定 C57BL/6J 小鼠的净化方法所需的最佳剂量。**结果** 剖宫取胎方法中, 注射 5 IU 剂量组的 C57BL/6J 小鼠超排后合笼见栓率最高, 为 $(89.00 \pm 19.05)\%$, 产仔数和见栓率与其它三组均差异不显著; 胚胎移植方法中, 10 IU 剂量组平均卵母细胞数为 30.33 ± 0.89 枚, 平均体内 2-细胞胚胎数为 23.78 ± 0.19 枚, 均显著高于其它三组。**结论** 剖宫取胎法生物净化时, 5 IU 剂量组可以提高 C57BL/6J 小鼠的交配成功率; 胚胎移植法生物净化时, 10 IU 剂量组可以获得最多的体内和体外 2-细胞胚胎, 为 C57BL/6J 小鼠最佳超排剂量。

【关键词】 C57BL/6J 小鼠; 超数排卵; 胚胎移植; 生物净化

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 06-0012-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.006.003

Use of optimized superovulation conditions for C57BL/6J mouse purification

FENG Ying¹, WANG Qian-qian¹, LU Wen-hao², CAO Min-liang¹

(1. Laboratory Animal Center Of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Reproductive Center of Taizhou Hospital, Taizhou 317000)

【Abstract】 Objective To define the best dose of PMSG/hCG for superovulation and optimize the biological purification system for genetic-modified mice of C57BL/6J background, we injected different dose of PMSG/hCG to promote superovulation, and carried out in vitro fertilization and embryo transplantation. **Methods** 5-week old female C57BL/6J mice were injected with 4 different doses (5 IU, 7.5 IU, 10 IU and 15 IU, respectively) of PMSG/hCG. Then the mice were mated with wild type male mice and embryos were obtained by cesarean section. In another approach, oocytes of superovulated mice were fertilized in vitro and then transplanted into surrogate female mice. **Results** In the cesarean section group, the highest rate of pregnancy was $89.00 \pm 19.05\%$ in the 5 IU injection group. But the difference compared with other groups was not statistically significant. In the embryo transplantation group, the average number of oocytes from 10 IU injection group was 30.33 ± 0.89 , and the average number of 2-cell embryo was 23.78 ± 0.19 , significantly higher than those in the other three groups. **Conclusions** Administration of 5 IU PMSG/hCG will improve mating efficiency in cesarean section-based purification of C57BL/6J mice. 10 IU

PMSG/hCG is the best dose for superovulation of C57BL/6J mice. The number of 2-cell embryos is maximized when 10 IU PMSG/hCG is used in the embryo transplantation.

【Key words】 C57BL/6J mouse; Superovulation; Embryo transplantation; Purification

C57BL/6J 近交系小鼠以其特有的生理学特性,被广泛用于制作转基因小鼠。在转基因小鼠制备、饲养及品系共享等过程中,容易造成病原微生物的感染。这些病原体不仅对实验结果产生干扰,对人类的健康也产生极大的威胁。因此,拥有标准化的 SPF 级实验小鼠是相关研究的基础,而感染小鼠通过生物净化方法达到 SPF 级标准是目前唯一有效的技术手段,生物净化方法主要包括剖宫取胎和胚胎移植。剖宫取胎操作相对简单,但存在净化不彻底和难以计算最佳剖宫时间等弊端;而胚胎移植则需要掌握扎实的胚胎移植技术。本实验以 C57BL/6J 野生型雌鼠为实验对象,对其注射不同剂量的孕马血清促性腺激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)进行超数排卵后,与剖宫取胎和胚胎移植两种方法相结合,通过比较分析平均卵母细胞数、平均胚胎数、受精率、见栓率、胚胎移植成活率,为生物净化提供优化方案。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

4 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雌鼠 108 只,18 ~ 22 g,均来源于上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK(沪)2007-0005],按照 SFP 级标准饲养于浙大实验动物中心屏障系统,自由饮水,室温(20 ± 2)℃,光照 12 h/d,(8:00 ~ 20:00),经过 1 周的适应性饲养。

1.2 仪器与试剂

超净工作台,CO₂ 恒温培养箱(Thermo),体式解剖镜(Olympus SZ61),养皿(35 mm, 60 mm, Corning),酒精灯,相差显微镜(Nikon SM2645),镊子,口吸式移卵管;注射用血促性素(PMSG)、注射用绒促性素(HCG)购自宁波市三生药业有限公司,其余试剂均为 Sigma 公司产品。

1.3 动物实验

1.3.1 试验分组:5 周龄的 C57BL/6J 雌鼠 108 只,根据剖宫取胎、体外和体内胚胎移植三种方法分为三个试验,每个试验四个剂量组,每组各 12 只,重复 3 次。

1.3.2 小鼠超排:下午 4 点,四组分别腹腔注射 5 IU、7.5 IU、10 IU、15 IU 的 PMSG,48 h 后分别注射

相同剂量的 HCG。试验一:四组雌鼠注射 HCG 后,与同系性成熟雄鼠合笼,次日验阴栓并记录,18 d 后进行剖宫取胎进行统计;试验二:四组雌鼠注射 HCG 15 h 后,收集卵母细胞,进行体外受精及 2-细胞胚胎移植;试验三:四组雌鼠注射 HCG 后,与同系性成熟雄鼠合笼,次日验阴栓并记录,1.5 d 后获取体内 2-细胞胚胎并进行移植。

1.3.3 培养基准备:采卵前 1 d,用直径 35 mm 培养皿做 HTF 培养滴,石蜡油覆盖,放入 37℃,含 5% CO₂ 培养箱中培养 12 h。

1.3.4 精子采集:取交配过的性成熟 C57BL/6J 雄鼠 1 只,颈椎脱臼处死,剪下附睾的上体部,用注射针刺破,挤出精子团放入 HTF 培养滴中,CO₂ 培养箱中放置 1 h 再行体外受精。

1.3.5 卵母细胞的收集:用颈椎脱臼法处死小鼠,剖宫取出输卵管放入盛有 M2 培养液的表面皿中,显微镜下放入矿物油中,找到输卵管膨大部,用解剖针稍刺破膨大部,将卵母细胞团引出,并导入到 HTF 培养基液滴中。

1.3.6 体外授精(IVF):将培养 1 h 的精子悬浮液镜下检查精子活力和精子数量,用移液器吸取精液 10 μL(约含精子 200 个/μL)放入培养滴中,加入卵母细胞(50 ~ 100)个,培养皿放 CO₂ 培养箱中培养 6 h 后,用预热过的 HTF 培养滴清洗受精卵两次,再放回 CO₂ 箱中过夜培养。

1.3.7 早期胚胎的形态学评价:培养 24 h 后的受精卵做镜检,统计 2-细胞胚胎,未受精卵及异常卵。其中,2-细胞胚胎和未受精卵形态正常,具有完整的透明带,不含空泡和碎片,胞质明亮均一,属于质量好的卵;由于精子的活力,受精能力等原因,造成了一部分卵未受精,颜色发暗并带有胞质颗粒的卵判定为死亡卵;胞质内含有碎片、部分胞质溶解判定为畸形卵;死亡卵和畸形卵都属于异常卵。挑出正常发育的 2-细胞胚胎,移植备用。

1.3.8 体内 2-细胞胚胎收集:在供体鼠见栓 1.5 d 后,将其颈椎脱臼处死,剪下双侧输卵管,在超净工作台用口吸管吸取约 0.2 mL 的 M2 培养液,一端插入输卵管的伞口,将胚胎冲出。在镜下收集形态正常且透明带完整的 2-细胞期胚胎,放入新鲜的 M2 培养滴中,移植待用。

1.3.9 假孕小鼠的准备:将 SPF 级 ICR 雌鼠与 ICR 结扎雄鼠 1:1 合笼,第二日验栓,有阴栓的作为受体鼠。所有实验均在浙江大学实验动物中心屏障系统内完成。

1.3.10 2-细胞胚胎移植:用口吸管吸 25 枚胚胎,末端再吸一个指示性的小气泡。受体小鼠用戊巴比妥麻醉,剃掉小鼠背左侧小面积被毛,75% 酒精消毒,透过皮肤看到脂肪垫的位置剪一个纵向切口,拉出脂肪垫,牵引出卵巢、输卵管和子宫。用脂肪夹夹住脂肪垫,固定好卵巢和输卵管。解剖镜下,在输卵管的喇叭口与壶腹部之间用维纳斯剪刀剪一小口,再将移卵针朝壶腹部方向插入输卵管中,将所有胚胎吹入左侧输卵管。以输卵管中可见指示小气泡作为胚胎全部吹入的标志。将脂肪垫、卵巢、输卵管一起放回腹腔中,缝合肌肉和皮肤。多余胚胎进行冷冻保存。

2 结果

2.1 剖宫取胎实验结果

四组剂量超排后,通过剖宫取胎实验结果见表 1。从表中可知,5IU 剂量组见栓率最高,见栓率和平均产仔数均差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 体外胚胎的获得及其胚胎移植结果

四组剂量超排后,体外胚胎的获得以及移植结果见表 2。从表 2 可知,4 组剂量超排后平均卵母细胞数、异常卵率差异显著($P < 0.05$)。其中,注射 10 IU 实验组平均卵母细胞数为(30.33 ± 0.89)枚,显著高于其它 3 组,5 IU 组的(23.44 ± 0.51)枚、7.5 IU 组的(23.33 ± 0.67)枚,显著高于 15 IU 组的(17.33 ± 0.34)枚;5 IU 剂量的异形卵率最低,为($3.79\% \pm 0.81\%$),与 7.5 IU 剂量组($5.24\% \pm$

0.84%)差异不显著,与 10 IU、15 IU 组均差异显著,15 IU 剂量的异形卵率最高,为($8.37\% \pm 0.92\%$),与其它 3 组均差异显著。四个剂量组的体外受精率差异不显著($P > 0.05$);体外受精平均 2-细胞胚胎数显著差异($P < 0.05$),10 IU 组最高为 18.78 ± 0.39 枚,与其它三组均差异显著,5 IU 组和 7.5 IU 组差异不显著,15 IU 组最低,为 13.00 ± 0.33 枚,均显著低于其它三组;同时,将四组剂量超排后获得的卵母细胞进行体外受精,将获得的 2-细胞胚胎进行移植,产仔率均差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 体内 2-细胞胚胎的获得及其胚胎移植结果

四组剂量超排后,体内 2-细胞胚胎的获得及其胚胎移植结果见表 3。从表中看出,平均胚胎数差异显著($P > 0.05$),移植后产仔率差异不显著($P > 0.05$)。其中,10 IU 组获得的平均胚胎数最多,为 18.00 ± 0.50 枚,与其它 3 组均存在显著差异;其次是 5 IU 组,也显著高于其它两组,而 7.5 IU 组和 15 IU 组之间差异不显著。

表 1 四组剂量超数排卵后剖宫取胎的结果

Tab. 1 Results of cesarean section after superovulation in the 4 groups of different PMSG/hCG doses

剂量 (IU) Doses (IU)	见栓数 Number of mice with plug	见栓率 (%) Efficacy of plug formation	平均产仔数 Average number of neonatal mice
5	8	89.00 ± 19.05^a	10.38 ± 0.10^a
7.5	6	55.67 ± 19.63^a	10.72 ± 0.25^a
10	6	66.67 ± 33.50^a	11.27 ± 0.25^a
15	4	44.33 ± 19.63^a	10.83 ± 0.76^a

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

Note: Different letters behind the same column values indicate significant difference ($P < 0.05$). The same in following tables.

表 2 四组剂量超数排卵后体外胚胎的获得及其移植的结果

Tab. 2 Results of embryos obtained after in vitro fertilization and transplantation of oocytes from superovulation in the four groups of different PMSG/hCG doses

剂量 (IU) Doses (IU)	平均卵母细胞数 Average number of oocytes	异常卵率 (%) Efficiency of abnormal oocytes	受精率 (%) Efficacy of fertilization	平均胚胎数 Average number of embryos	移植产仔 (%) Efficiency of production
5	23.4 ± 0.51^a	3.79 ± 0.81^a	83.25 ± 0.61^a	18.78 ± 0.39^a	40.00 ± 4.00^a
7.5	23.33 ± 0.67^a	5.24 ± 0.84^{ab}	84.00 ± 0.40^a	18.67 ± 0.67^a	41.33 ± 2.31^a
10	30.33 ± 0.89^b	5.85 ± 0.46^b	83.60 ± 0.88^a	23.78 ± 0.19^b	42.66 ± 6.11^a
15	17.33 ± 0.34^c	8.37 ± 0.92^c	82.39 ± 1.34^a	13.00 ± 0.33^c	38.67 ± 2.3^a

表 3 四组剂量超数排卵后体内胚胎的获得及其移植的结果

Tab. 3 Embryos obtained in vivo and transplantation after superovulation in the four groups of different PMSG/hCG doses

剂量 (IU) Doses (IU)	见栓数 Number of mice with plug	平均胚胎数 Average number of embryos	移植产仔率 (%) Efficacy of production
5	8	13.66 ± 0.57 ^a	37.33 ± 2.31 ^a
7.5	7	9.38 ± 1.76 ^b	37.67 ± 5.69 ^a
10	7	18.00 ± 0.50 ^d	40.00 ± 4.00 ^a
15	5	8.00 ± 0.50 ^{bc}	38.33 ± 3.50 ^a

3 讨论

随着 C57BL/6J 转基因小鼠动物模型的广泛应用,其生物净化工作也日渐频繁。传统的剖宫取胎法容易导致垂直传播的病毒净化失败,但由于操作比较简单,在不具备胚胎移植技术的条件下也是一种选择。本文尝试通过超排的方法达到人工控制发情。通过比较,虽然小鼠的见栓率和平均产仔数没有显著差异,但注射 5 IU 剂量组的小鼠交配后见栓率最高,该剂量适用于 C57BL/6J 背景鼠进行剖宫取胎生物净化,提高其受孕率。因为高剂量的激素对小鼠的内分泌会造成一定的紊乱,导致交配的失败。因此,只要激素能激发小鼠发情,使它交配成功,激素量越少越好。实验中发现,超排后合笼的小鼠有一部分见栓却没怀孕,有研究者发现大鼠相似的现象^[1]。这主要是由于超排后,雌性动物体内会出现高水平的雌二醇-17 β ,从而刺激输卵管的运动性,加速了胚胎的迁移,导致胚胎过早暴露于不适合其发育的内环境,造成胚胎大量丢失^[2],不利于受精卵的发育和妊娠^[3]。

相对剖宫取胎,采用胚胎移植法手术时间可控性强,可最大限度避免病毒经胎盘感染仔鼠,仔鼠成活率高^[4],但它需要大量的胚胎,而胚胎的获得分体内和体外胚胎。如果有较多生殖状态好的转基因雄鼠,可超排野生型雌鼠与转基因雄鼠交配,获得体内 2-细胞胚胎进行移植。本次试验中,注射 10 IU 组获得的体内胚胎数最多,为最佳剂量。但这种方法需要较多的转基因雄鼠,而且一次冲出的胚胎数量受限,一般建议采用 IVF。当雄鼠不多或者状态不好的情况下,更能体现出体外受精的优势。只需一只雄鼠,超排大量野生型雌鼠,一次获得大量的卵进行 IVF,获得大量的体外受精胚,基本能一次完成净化工作,节约成本,提高效率。本次注射 10 IU 剂量组能获得最多的

卵母细胞,这与部分文献报道有所差异^[5-7],可能与所用激素、小鼠周龄不同以及品系间存在个体差异有关^[8]。本文仅就注射不同剂量的激素对 C57BL/6J 小鼠进行超排,初步探讨超排在 C57BL/6J 小鼠生物净化体系中的应用,但是超数排卵是一系列极为复杂的生理过程,影响因素很多^[9-10],其对胚胎发育和质量的影响目前仍然说法不一^[11-13],有待今后进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Goh HH, Yang XF, Tain CF, et al. Oogenesis, fertilization and early embryonic development in rats. I. Dose-dependent effects of pregnant mare serum gonadotrophins [J]. Ann Acad Med Singapore, 1992, 21(4):443-450.
- [2] Ishigame H, Medan MS, Watanabe G, et al. A new alternative method for superovulation using passive immunization against inhibin in adult rats [J]. Biol Reprod, 2004, 71:236-243.
- [3] 张家骅. 家畜生殖内分泌学[M]. 北京:中国教育文化出版社, 2004:155-166.
- [4] 刘丽均, 郁丽丽, 朱权凤, 等. 生物工程技术在实验小鼠生物净化上的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(11):63-66.
- [5] 徐平. 不同日龄小鼠的超排、体外授精及二细胞胚胎移植的比较研究(简报) [J]. 实验生物学报, 2001, 34(3):253-255.
- [6] Tsunode Y, Soma T, Sugie T. Frogen storage of rabbits and hamster embryos [A]/Zell marker H. Frogen stroage of laboratory animals [M]. New York: Gustave Fisecher Verlag, Stuttgart. 1981:129-138.
- [7] Bogolyubova NA, Bogolyubova IO. Actin localization in nuclei of two-cell mouse embryos [J]. Cell Tissue Biol. 2009, 5:417-422.
- [8] Eum JH, Park JK, Lee WS, et al. Long-term liquid nitrogen vapor storage of mouse embryos cryopreserved using vitrification or slow cooling [J]. Fertil Steril. 2009, 91(5):1928-1932.
- [9] Hassan AS, Hou J, Wei W, et al. Expression of two novel transcripts in the mouse definitive endoderm [J]. Gene Expr Patterns, 2010, 10(2-3):127-134.
- [10] Wang Z, Xu L, He F. Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2 [J]. Fertil Steril, 2010, 93(8):2729-2733.
- [11] Bourgain C, Devroey P. The endometrium in stimulated cycles for IVF [J]. Hum Reprod Update, 2003, 9(6):515-522.
- [12] Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice [J]. Hum Reprod, 2001, 16(2):221-225.
- [13] Combelles CM, Albertini DF. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. [J]. Biol Reprod, 2003, 68(3):812-821.

[修回日期]2014-04-10