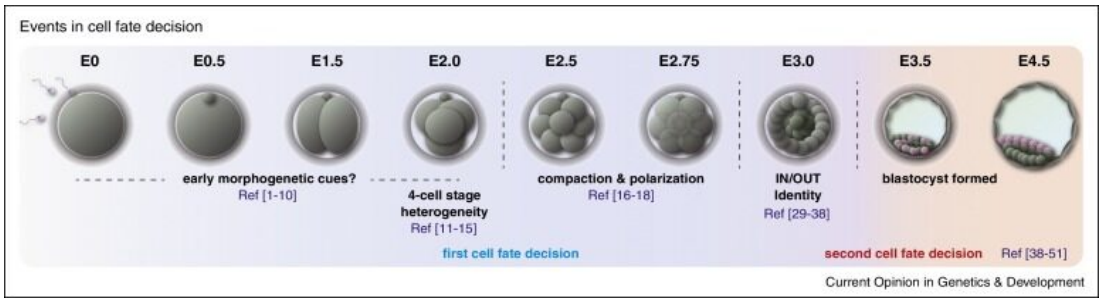
【小鼠大学问】手把手教你采集小鼠受精卵

小鼠受精卵（早期胚胎）采集在基因工程小鼠的制备和保种中都是非常重要的步骤。只有采集到足够数量和质量的受精卵，才能更有效地进行显微注射、胚胎移植或冻存复苏，保证获得高质量的子代小鼠。

那么受精卵到底是怎么采集的呢？今天我们就来介绍一下1细胞期与2细胞期胚胎的收集方法。

哺乳动物的受精过程发生在输卵管内，小鼠胚胎进入子宫着床时间大约为4天左右。因此，需要在配种后或受精后的适当时间从超排供体收集不同时期的胚胎。

小鼠受精后4.5天内早期胚胎发育的过程：



[图片来自：Genetics & Development]

人、小鼠、大鼠胚胎发育阶段对应时间点：

Carnegie Stage		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Human	Days	1	2-3	4-5	5-6	7-12	13-15	15-17	17-19	20	22	24	28	30	33	36	40	42	44	48	52	54	55	58
Mouse	Days	1	2	3	E4.5	E5.0	E6.0	E7.0	E8.0	E9.0	E9.5	E10	E10.5	E11	E11.5	E12	E12.5	E13	E13.5	E14	E14.5	E15	E15.5	E16
Rat	Days	1	3.5	4-5	5	6	7.5	8.5	9	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14	14.5	15	15.5	16	16.5	17	17.5

Note these Carnegie stages are only approximate day timings for average of embryos. **Links:** Carnegie Stage Comparison

[图片来自：https://embryology.med.unsw.edu.au]

受精卵获得的方法分自然排卵、激素诱发排卵和体外受精三种方法。我们今天介绍的是诱发排卵（超排）后采集受精卵的方法。

诱发排卵（超排）后采集受精卵的方法

雌鼠超排与合笼

超排

不同背景的小鼠超排周龄都是不同的，剂量也是不同的。那以常用的C57小鼠为例，超排周龄为3-4周龄。当达到超排周龄后，向雌小鼠腹腔内注射5个国际单位(IU)的孕马血清促性腺激素(PMSG)，然后约46-48h

后再注射5 IU的人绒毛膜促性腺激素(hCG)，12h后即可诱发排卵。

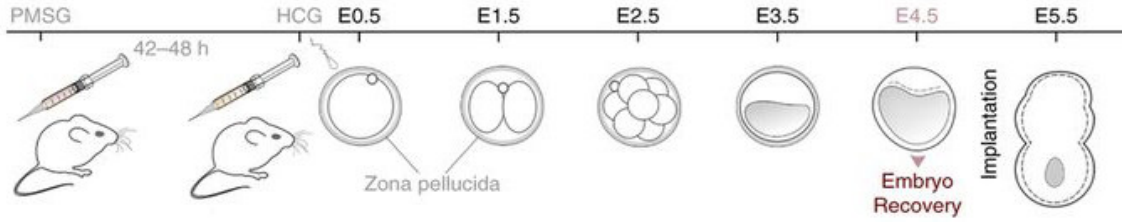


图1. 雌鼠超排与受精卵早期发育时间轴。[图片来自：Ivan Bedzhov, et al. In vitro culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages. Nature Protocols volume 9, pages 2732–2739 (2014)]

合笼

1） 雌小鼠给予hCG后与成熟雄性小鼠进行合笼。雄鼠交配一般是在夜晚发生，交配过程中建议不换笼，交配过的雄小鼠，间隔一周后才进行下次交配。

2） 交配后过夜易见小鼠的阴道栓。

1-cell期胚胎采集

输卵管切开

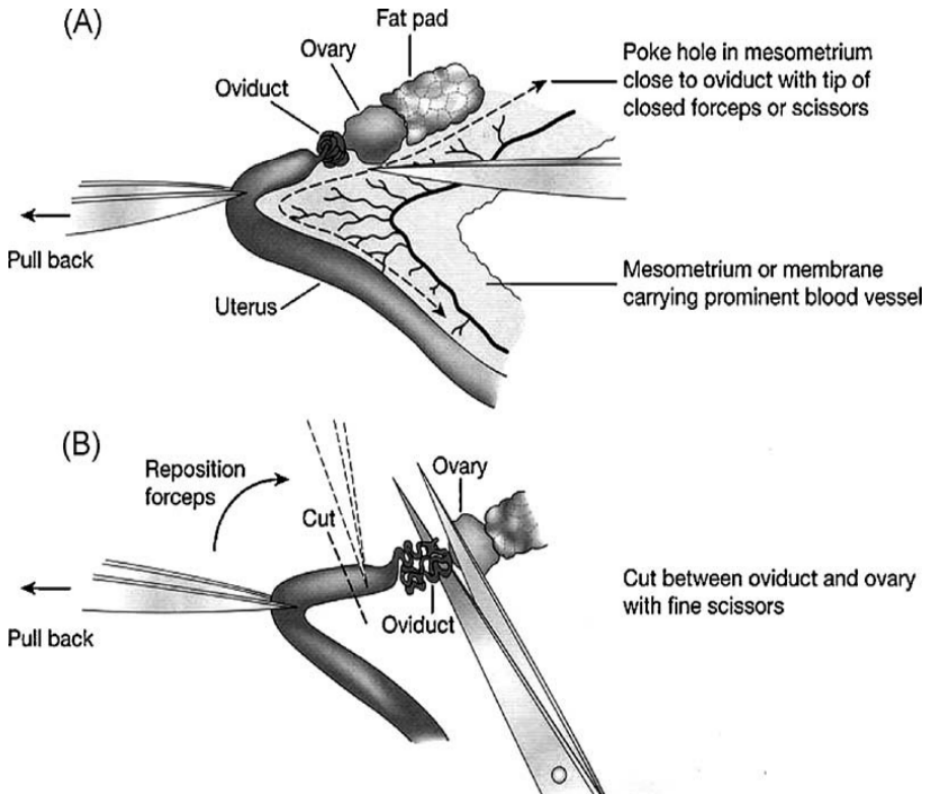
1） 通过断颈快速处死见栓0.5天的小鼠。

2） 将小鼠背部靠尾部剃毛并用70%的乙醇彻底涂搽手术部位。

3） 用眼科镊捏紧正中线皮肤，用外科剪剪出一个横切口，钝性分离皮肤与肌肉，充分暴露背侧腰部肌肉。

4）卵巢位于脊柱两侧隐约可见的白色脂肪团的下方，用眼科镊拎起脂肪团上腹膜，眼科剪在此处开一小口，用镊子夹住脂肪垫，轻轻地将子宫、输卵管、卵巢拉出体腔。

5） 用眼科镊将输卵管、卵巢和脂肪团拉伸，用眼科剪在输卵管和卵巢之间剪开，重新定位眼科镊的位置，然后在靠近输卵管的子宫部剪开，将断离的输卵管放入预先准备好的小玻璃皿中的 M2 液滴中。对另一侧输卵管重复上面操作。



[图片来自：D. Rizos a, et al. Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. Theriogenology 73 (2010) 777–785]

离体输卵管内受精卵的收集与处理

1） 用眼科镊撕开输卵管膨大的壶腹部，即看到包绕受精卵的丘细胞团。游离的受精卵慢慢流出，也可以用镊子轻轻挤压输卵管将受精卵推出裂口。

2） 全部卵群取出后，将其转移到一个约 200ul 的液滴中，加入 10-15ul 的 500U/ml 透明质酸酶（hyaluronidase）消化颗粒细胞，约30秒-1分钟，必要时用毛细管吹打卵群数次。如颗粒细胞全部脱落，则开始清洗步骤；如仍有部分未脱落则再等待数十秒直到全部脱落。

3） 洗涤：用玻璃细管（直径约120um-250um，即大于一个受精卵的直径而小于二个受精卵的直径）把受精卵在新的 M2 液滴中转移五次，洗去颗粒细胞、残渣及透明质酸酶，将洗好的受精卵转移到覆盖有矿物油（可防止污染同时防止培养基水分蒸发影响pH）的 M16 液滴（在 5%CO2、37℃培养箱中平衡过夜，保证正确 pH 值）中，再放入 5%CO2、37℃培养箱中备用。

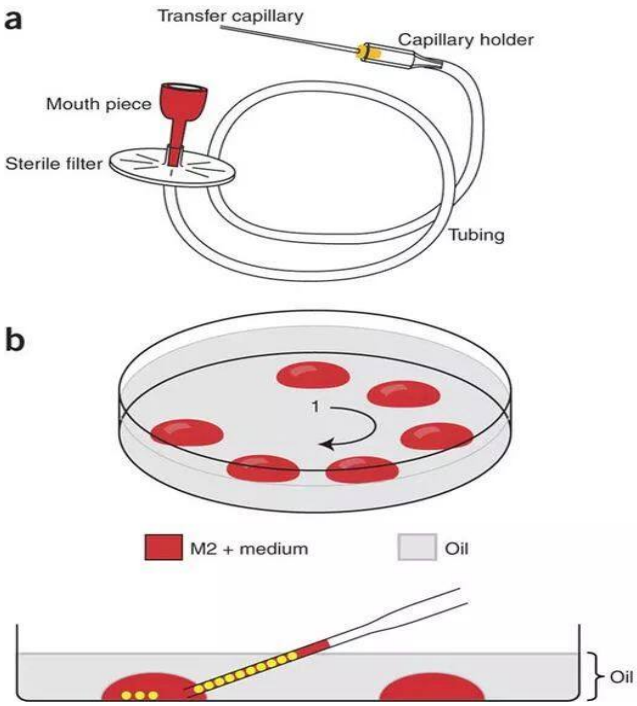


图3. (a) Scheme illustrating pipetting device for handling and reimplanting zygotes. (b) Six drops of M2 medium placed in dish, indicating drop 1. Drops are overlaid with mineral oil by carefully flooding the dish from the center.

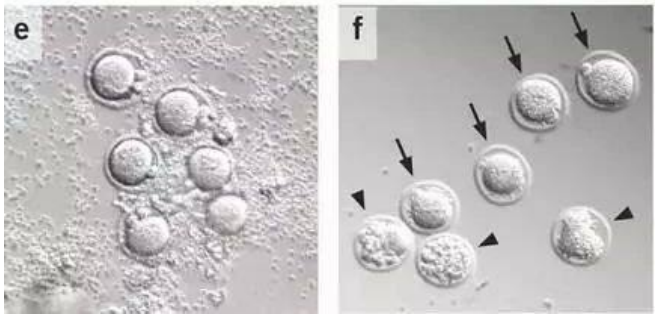


图4. (e) Zygotes harvested with follicular cumulus cells, (f) after successive treatments with hyaluronidase (normal zygotes, arrows; degenerated zygotes, arrowheads).

2-cell期胚胎采集的时间

与1-cell期胚胎的采集不同之处在于：

1） 使用见栓1.5天的供体雌鼠。

2） 将断离的输卵管放入预先准备好的小玻璃皿中的 M2 液滴中后，使用吸有 M2 的注射器配钝口的4#针头，插入输卵管，仅冲洗输卵管部分，收集胚胎。并将胚胎洗涤干净，洗去血细胞及残渣等，将洗好的胚胎转移到覆盖有矿物油的 M16 液滴中，再放入 5%CO2、37℃ 培养箱备用。

M2 和 M16培养基

M2与M16都是化学成份明确的培养基（chemically defined medium；CDM）。CDM含胚胎需要、能维持和胚胎生长发育，分裂繁殖的化学成分：多种盐离子、能量物质、生长因子、动物白蛋白或含蛋白等大分子的各种动物血清。

标准的M16在上世纪70年代初定型，现已商业化，是世界各地实验室仍常用于小鼠胚胎实验的一种CDM。M2是在M16基础上添加了HEPES(4-羟乙基哌嗪乙磺酸)。利用HEPES可适当延长培养基和其中培养物在自然环境下(二氧化碳培养箱外)的使用时间。因其可较长时间维持一定的pH平衡，便于自然环境下操作应用。M2更适于小鼠等动物在采集卵母细胞，或胚胎在相对较长时间的体外操作等环节应用。

化学成份	M16 (mmol/L)
NaCl	95.00
KCL	4.80
KH_2PO_4	1.20
$NaHCO_3$	25.00
$CaCL_2$	1.70
$MgSO_4$	1.20
Na-lactate	23.00
Na-pyruvate	0.33
Glucose	5.60
BSA(mg/ml)	4.00
Osmolarity (mOsm)	290

表1. Comparison of M16. [来自：GAO Shan, et al. Culturing of Mouse and Rat Preimplantation Embryos in Various Chemically Defined Media. China Biotec]